



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 352 183**

51 Int. Cl.:

C12N 15/31 (2006.01)

C07K 14/34 (2006.01)

C12P 13/06 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00122057 .3**

96 Fecha de presentación : **11.10.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1096010**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2001**

54

Título: **Secuencias de nucleótidos que codifican la exportación de aminoácidos ramificados, un procedimiento para su aislamiento y su utilización.**

30

Prioridad: **27.10.1999 DE 199 51 708**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2011

73

Titular/es: **EVONIK DEGUSSA GmbH**
Rellinghauser Strasse 1-11
45128 Essen, DE
FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GmbH

72

Inventor/es: **Kennerknecht, Nicole;**
Sahm, Hermann;
Pfefferle, Walter y
Eggeling, Lothar

74

Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 352 183 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).

Secuencias de nucleótidos que codifican la exportación de aminoácidos ramificados, un procedimiento para su aislamiento y su utilización

5

DESCRIPCIÓN

Son objeto del invento unas secuencias de nucleótidos que codifican la exportación de aminoácidos ramificados, un procedimiento para su detección y su aislamiento y un procedimiento para la producción por fermentación de aminoácidos ramificados mediante utilización de bacterias corineformes, en las que son sobreexpresados unos genes que codifican la exportación de aminoácidos ramificados.

15 **Estado de la técnica**

Los aminoácidos ramificados L-isoleucina, L-valina y L-leucina encuentran utilización en la industria farmacéutica, en la medicina humana y en la nutrición de animales.

20 Es conocido el hecho de que ciertos aminoácidos ramificados pueden ser producidos por fermentación de cepas de bacterias corineformes, en particular de *Corynebacterium glutamicum*. A causa de la gran importancia, se está trabajando constantemente en el
25 mejoramiento de los procedimientos de producción. Unos mejoramientos de los procedimientos pueden concernir a unas medidas técnicas de fermentación tales como p.ej. una agitación y un abastecimiento con oxígeno, o a la composición de los medios nutritivos, tal como p.ej. la
30 concentración de azúcares durante la fermentación, o el tratamiento para dar la forma del producto mediante p.ej. una cromatografía con intercambio de iones o las

propiedades intrínsecas de rendimiento del microorganismo propiamente dicho.

Para el mejoramiento de las propiedades de rendimiento de estos microorganismos se utilizan unos
5 métodos de mutagénesis, selección y elección de mutantes. De esta manera se obtienen unas cepas, que son resistentes frente a unos antimetabolitos tales como p.ej. el compuesto análogo a isoleucina hidroxamato de isoleucina (Kisumi M, Komatsubara S, Sugiura M, Chibata I
10 (1972) Journal of Bacteriology 110: 761-763), el compuesto análogo a valina 2-tiazol-alanina (Tsuchida T, Yoshinaga F, Kubota K, Momose H (1975) Agricultural and Biological Chemistry, Japan 39: 1319-1322), o el compuesto análogo a leucina α -aminobutirato (Ambe-Ono Y,
15 Sato K, Totsuka K, Yoshihara Y, Nakamori S (1996) Bioscience Biotechnology Biochemistry 60: 1386-1387), o que son auxótrofos para unos metabolitos importantes en regulación y producen aminoácidos ramificados (Tsuchida T, Yoshinaga F, Kubota K, Momose H, Okumura S (1975)
20 Agricultural and Biological Chemistry; Nakayama K, Kitada S, Kinoshita S (1961) Journal of General and Applied Microbiology, Japan 7: 52-69; Nakayama K, Kitada S, Sato Z, Kinoshita (191) Journal General and Applied Microbiology, Japón 7: 41-51).

25 Desde hace algunos años se emplean asimismo unos métodos de la técnica de ADN recombinante para el mejoramiento de las cepas de *Corynebacterium* que producen aminoácidos ramificados, mediante el recurso de que se amplifican unos genes individuales para la biosíntesis de
30 los aminoácidos ramificados, y se investiga la repercusión sobre la producción de aminoácidos ramificados. Unos artículos recopilativos a este respecto

se encuentran, entre otras, en la cita de Kinoshita ("Glutamic Acid Bacteria" [Bacterias productoras de ácido glutámico] en: *Biology of Industrial Microorganisms*, Demain y Solomon (coordinadores de edición), Benjamin Cummings, Londres, Reino Unido, 1985, 115-142), Hilliger (BioTec 2, 40-44 (1991)), Eggeling (Amino Acids 6: 261-272 (1994)), Jetten y Sinskey (Critical Reviews in Biotechnology 15, 73-103 (1995)), Sahm y colaboradores (Annals of the New York Academy of Science 782, 25-39 (1996)), y Eggeling y colaboradores, *Journal of Biotechnology* 56: 168-180 (1997)).

En el documento de solicitud de patente alemana DE 195 48 222 A se divulgan el gen *lysE* de *Corynebacterium glutamicum* que codifica una proteína exportadora de lisina, así como un procedimiento para la producción de aminoácidos, en particular de L-lisina.

Por Eggeling y colaboradores: "The fruits of molecular physiology: engineering the L-isoleucine biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum*" [Los frutos de la fisiología molecular: ingeniería genética de la ruta de biosíntesis de L-isoleucina en *Corynebacterium glutamicum*] *Journal of Biotechnology*, tomo 56, n° 3, 28 de agosto de 1997, páginas 167-182, se supone ciertamente la existencia de una exportadora de isoleucina y proponen el mejoramiento de las cepas de *Corynebacterium glutamicum*, que producen isoleucina, mediante aumento de la exportación de isoleucina, pero allí no se describe la proteína exportadora propiamente dicha.

Hermann T. y colaboradores: "Mechanism and Regulation of isoleucine excretion in *Corynebacterium glutamicum*" [Mecanismo y regulación de la excreción de isoleucina en *Corynebacterium glutamicum*] *Applied and*

Environmental Microbiology, tomo 62, n° 9, septiembre de 1996, páginas 3238-3244 mencionan ciertamente que unos péptidos que contienen aminoácidos, no son catabolizados en *C. glutamicum*, y, por consiguiente, tienen que ser exportados para el crecimiento de la bacteria sobre un medio que contiene péptidos. Sin embargo, ellos no describen explícitamente que unas bacterias corineformes con defecto en la exportación de isoleucina, a las que se les añadieron unos péptidos que contenían isoleucina, muestran un mal crecimiento.

Misión del invento

Los autores del invento se han planteado la misión de poner a disposición unas medidas técnicas nuevas para realizar una mejorada producción por fermentación de aminoácidos ramificados.

Descripción del invento

Los aminoácidos ramificados encuentran aplicación en la industria farmacéutica, en la medicina humana y en la nutrición de animales. Por lo tanto, existe un interés general en poner a disposición unos nuevos procedimientos mejorados para la producción de aminoácidos ramificados.

Cuando en lo sucesivo se mencionen "aminoácidos ramificados", por este concepto se han de entender en particular L-isoleucina, L-valina o L-leucina.

Son objeto de la descripción unos polinucleótidos aislados, que contienen por lo menos una de las secuencias de polinucleótidos, que se escogen entre el conjunto que se compone de

- a) un polinucleótido, que es idéntico por lo menos en un 70 % al polinucleótido que codifica un

polipéptido, que contiene por lo menos una secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 3 o 5,

b) un polinucleótido que codifica un polipéptido, que contiene una secuencia de aminoácidos, que es idéntica por lo menos en un 70 % a una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 3 o 5,

c) un polinucleótido, que es complementario con respecto a los polinucleótidos de a) o b), y

d) un polinucleótido, que contiene por lo menos 15 bases consecutivas de las secuencias de polinucleótidos de a), b) ó c).

Es objeto de la descripción asimismo un ADN de manera preferida recombinante, replicable en microorganismos corineformes, con la procedencia de Corynebacterium, que contiene por lo menos las secuencias de nucleótidos que codifican los genes brnF y/o brnE, expuestas en la SEQ ID No. 1 y en la SEQ ID No. 6.

Es asimismo un objeto del invento un ADN replicable, que contiene:

(i) las secuencias de nucleótidos, que se exponen en SEQ ID No. 1 o en SEQ ID No. 6 que codifican los genes brnE y/o brnF, o

(ii) por lo menos una secuencia, que corresponde a las secuencias (i) dentro del marco de la degeneración del código genético, o

(iii) por lo menos una secuencia, que se hibrida con la secuencia complementaria con respecto a las secuencias (i) o (ii), y eventualmente

(iv) unas mutaciones con sentido de función neutra en (i).

Otros objetos son

unos polinucleótidos, que contienen por lo menos una de las secuencias de nucleótidos, escogidas entre el conjunto formado por las SEQ ID No. 1, 2, 4 o 6, unos polinucleótidos que codifican unos polipéptidos, que
5 contienen por lo menos una de las secuencias de aminoácidos, como se exponen en SEQ ID No. 3 o 5, un vector, que contiene el o los polinucleótido(s) de acuerdo con la reivindicación 1, o la secuencia de ADN representada en SEQ ID No. 1 o en SEQ ID No. 6,
10 y unas bacterias corineformes que sirven como células anfitrionas, y que contienen el vector.

Objeto del invento son, de acuerdo con las reivindicaciones 20 a 29:

Unos polinucleótidos aislados, que se escogen entre el
15 conjunto que se compone de

- a) un polinucleótido que codifica un polipéptido, que posee la función de una proteína exportadora para un aminoácido ramificado y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 3 ó 5,
- 20 b) un polinucleótido que codifica un polipéptido, que posee la función de una proteína exportadora para un aminoácido ramificado y una secuencia de aminoácidos, que es idéntica por lo menos en un 90 % a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 3 ó 5, y
- 25 c) un polinucleótido, que es complementario con respecto a los polinucleótidos de a) o b).

Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 20, que tiene la secuencia de nucleótidos SEQ ID No. 2, un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 20 que
30 codifica la secuencia de aminoácidos con la SEQ ID No. 5, un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 20, con la secuencia de nucleótidos SEQ ID No. 4,

un polinucleótido de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 20 a 24, con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 1 o 6, unos vectores, que contienen un polinucleótido de acuerdo
5 con una o varias de las reivindicaciones 20 a 24, bacterias corineformes o *Escherichia coli*, que contienen el vector de acuerdo con la reivindicación 25, las bacterias corineformes, que contienen amplificado en su cromosoma el polinucleótido aislado de acuerdo con una
10 de las reivindicaciones 20 a 24, son una parte componente de la descripción, bacterias corineformes de acuerdo con la reivindicación 26, caracterizadas porque se trata de *Corynebacterium glutamicum*,
15 bacterias corineformes de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 26 hasta 27, caracterizadas porque se trata de una cepa, que produce un aminoácido ramificado, un cebador de oligonucleótidos o una sonda de oligonucleótidos, que contiene por lo menos 15
20 nucleótidos consecutivos, escogidos entre SEQ ID No. 4 o la secuencia de nucleótidos que es complementaria con respecto a ésta.

Son objeto de la descripción asimismo unos polinucleótidos, que se componen esencialmente de una
25 secuencia de polinucleótidos, que son obtenibles por escrutinio mediante una hibridación de un correspondiente banco de genes, que contienen los genes completos con las secuencias de polinucleótidos correspondientes a SEQ ID No. 1, 2, 4 o 6, con una sonda, que contiene las
30 secuencias de los polinucleótidos mencionados de acuerdo con SEQ ID No. 1, 2, 4 o 6, o un fragmento de éstas, y un aislamiento de las mencionadas secuencias de ADN.

Las secuencias de polinucleótidos de acuerdo con la descripción son adecuadas, como sondas de hibridación para ARN, ADNc y ADN, con el fin de aislar en su longitud total a los ADNc que codifican las proteínas exportadoras de isoleucina, leucina o valina, y de aislar a tales ADNc o genes, que tienen una alta similitud de la secuencia con la del gen brnF y/o brnE.

Las secuencias de polinucleótidos de acuerdo con la descripción son adecuadas además como cebadores, con cuya ayuda se puede producir, con una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el ADN de unos genes que codifican las proteínas exportadoras de isoleucina, leucina o valina.

Tales oligonucleótidos que sirven como sondas o cebadores, contienen por lo menos 30, de manera preferida por lo menos 20, de manera muy especialmente preferida por lo menos 15 nucleótidos consecutivos. Asimismo, se adecuan unos oligonucleótidos que tienen una longitud de por lo menos 40 o 50 pares de bases.

El concepto "aislado" significa separado de su entorno natural.

El concepto de "polinucleótido" se refiere en términos generales a polirribonucleótidos y a polidesoxirribonucleótidos, pudiéndose tratar de ARN o ADN no modificados o de ARN o ADN modificados.

Por el concepto de " polipéptidos" se entienden unos péptidos o unas proteínas que contienen dos o más aminoácidos unidos por enlaces peptídicos.

Los polipéptidos de acuerdo con la descripción poseen la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID No. 3 y/o 5, y la actividad biológica del transporte de aminoácidos ramificados. A éstos pertenecen también aquéllos que son idénticos por lo menos en un 70 % a los

polipéptidos de acuerdo con SEQ ID No. 3 y/o 5, que tienen de manera preferida una identidad por lo menos de un 80 %, y en especial por lo menos de un 90 % hasta 95 % con los polipéptidos de acuerdo con SEQ ID No. 3 y/o 5, y que presentan la mencionada actividad.

Asimismo se describen unos microorganismos corineformes, en particular del género *Corynebacterium*, que han sido transformados mediante la introducción de un vector de acuerdo con la reivindicación 25.

El invento se refiere además a un procedimiento para la producción por fermentación de aminoácidos ramificados mediante utilización de bacterias corineformes, que en particular ya producen los aminoácidos ramificados, y en las que son sobreexpresadas las secuencias de nucleótidos de los genes *brnE* y/o *brnF* que codifican la exportación de los aminoácidos ramificados.

El concepto de "refuerzo" describe en este contexto el aumento de la actividad intracelular en un microorganismo de una o varias enzima(s) (proteína(s)), que es(son) codificada(s) por el correspondiente ADN, mediante el recurso de que, por ejemplo, se aumenta el número de copias del gen o respectivamente de los genes, se utiliza un promotor fuerte o se utiliza un gen que codifica una correspondiente enzima (proteína) con una alta actividad, y eventualmente se combinan estas medidas.

Los microorganismos, que son objeto del presente invento, pueden producir aminoácidos ramificados a partir de glucosa, sacarosa, lactosa, manosa, fructosa, maltosa, melazas, almidones, celulosas o a partir de glicerol y etanol. En este caso, puede tratarse de representantes de bacterias corineformes, en particular

del género *Corynebacterium*. En el caso del género *Corynebacterium* se ha de mencionar en particular la especie *Corynebacterium glutamicum*, que es conocida en el mundo especializado por su capacidad de producir L-
 5 aminoácidos.

Unas cepas adecuadas del género *Corynebacterium*, en particular de la especie *Corynebacterium glutamicum*, son por ejemplo las conocidas cepas de tipo silvestre

Corynebacterium glutamicum ATCC13032
 10 *Brevibacterium flavum* ATCC14067
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

y las mutantes o respectivamente cepas producidas a partir de ellas, que producen aminoácidos ramificados,
 15 tales como, por ejemplo, las cepas que producen isoleucina

Corynebacterium glutamicum ATCC 14309
Corynebacterium glutamicum ATCC 14310
Corynebacterium glutamicum ATCC 14311
 20 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 15168
Corynebacterium ammoniagenes ATCC 6871,

tales como, por ejemplo, las cepas que producen leucina

Corynebacterium glutamicum ATCC 21885
Brevibacterium flavum ATCC 21889
 25 o tales como, por ejemplo, las cepas que producen valina
Corynebacterium glutamicum DSM 12455
Corynebacterium glutamicum FERM-P 9325
Brevibacterium lactofermentum FERM-P 9324
Brevibacterium lactofermentum FERM-BP 1763.

30 Por parte de los autores del invento se consiguió aislar los nuevos genes *brnE* y *brnF* de *Corynebacterium glutamicum*. Para el aislamiento de los genes se produce

en primer lugar una mutante de *Corynebacterium glutamicum* con defecto en el gen *brnE* o *brnF*. Para esto, una adecuada cepa de partida, tal como p.ej. la ATCC14752 o ATCC13032, se somete a un procedimiento de mutagénesis.

5 Unos procedimientos clásicos de mutagénesis son el tratamiento con agentes químicos tales como p.ej. N-metil-N-nitro-N-nitroso-guanidina o la irradiación con rayos UV. Tales procedimientos para la provocación de una mutación son conocidos por lo general y se pueden
10 consultar, entre otras, en la cita de Miller (A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria [Un breve curso de genética bacteriana, un manual de laboratorio y un manual sobre *Escherichia coli* y
15 bacterias relacionadas con ésta] (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)) o en el manual "Manual of Methods for General Bacteriology" [Manual de métodos de bacteriología general] de la American Society for Bacteriology (Washington D.C. EE.UU., 1981).

20 Otro procedimiento de mutagénesis es el método de la mutagénesis con transposones, en el que se aprovecha la propiedad de un transposón de "saltar" dentro de secuencias de ADN y de perturbar o respectivamente desconectar de esta manera la función del correspondiente
25 gen. Ciertos transposones de bacterias corineformes son conocidos en el mundo especializado. Así, a partir de *Corynebacterium xerosis* cepa M82B se aisló el transposón de resistencia frente a eritromicina Tn5432 (Tauch y colaboradores, Plasmid (1995) 33: 168-179) y el
30 transposón de resistencia frente a cloramfenicol Tn5546. Tauch y colaboradores (Plasmid (1995) 34: 119-131 y

Plasmid (1998) 40: 126-139) mostraron que es posible realizar una mutagénesis con estos transposones.

Otro transposón es el transposón Tn5531, que ha sido descrito en la cita de Ankri y colaboradores (Journal of
5 Bacteriology (1996) 178: 4412-4419) y que se empleó a modo de ejemplo en el transcurso del presente invento. El transposón Tn5531 contiene el gen de resistencia frente a kanamicina aph3 y puede ser administrado en forma del vector plasmídico pCGL0040, que se representa en la
10 Figura 1. La secuencia de nucleótidos del transposón Tn5531 es libremente accesible bajo el número de acceso (en inglés "accession number") U53587 en el National Center for Biotechnology Information (Centro nacional para información de biotecnología) (NCBI, Bethesda, MD,
15 EE.UU.).

Después de haberse efectuado una mutagénesis, de manera preferida la mutagénesis con transposones, se busca una mutante con defecto en el gen brnF o brnE. Una mutante con defecto en el gen brnF o brnE es reconocida
20 por el hecho de que ella muestra un buen crecimiento sobre un agar mínimo, pero muestra un mal crecimiento sobre un agar mínimo que había sido suplementado con oligopéptidos que contienen aminoácidos ramificados, tales como p.ej. el dipéptido isoleucil-isoleucina.

25 Un ejemplo de una tal mutante es la cepa ATCC14752brnE::Tn5531.

Una cepa producida del modo antes descrito se puede utilizar entonces para la clonación y la secuenciación de los genes brnF y/o brnE.

30 Para esto, se puede establecer un banco de genes de la bacteria que interesa. El establecimiento de bancos de

genes se ha descrito en los libros de texto y manuales conocidos por lo general.

Como un ejemplo se mencionarán el libro de texto de Winnacker: *Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie* [Genes y clones, una introducción a la tecnología genética] (editorial Verlag Chemie, Weinheim, Alemania, 1990) o el manual de Sambrook y colaboradores: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* [Clonación molecular, un manual de laboratorio] (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un muy conocido banco de genes es el de la cepa W3110 de *E. coli* K-12, que fue establecido en vectores λ por Kohara y colaboradores (Cell 50, 495-508 (1987)). Bathe y colaboradores (Molecular and General Genetics [Genética molecular y general], 252: 255-265, 1996) describen un banco de genes de *C. glutamicum* ATCC13032, que se estableció con ayuda del vector cosmídico SuperCos I (Wahl y colaboradores, 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences [Actas de la Academia Nacional de las Ciencias] USA, 84: 2160-2164) en la cepa NM554 de *E. coli* K-12 (Raleigh y colaboradores, 1988, Nucleic Acids Research [Investigación de ácidos nucleicos] 16: 1563-1575). Para el presente invento se adecuan aquellos vectores, que se replican en bacterias corineformes, de manera preferida en *Corynebacterium glutamicum*. Tales vectores son conocidos a partir del estado de la técnica; como un ejemplo se mencionará el vector plasmídico pZ1, que se ha descrito en la cita de Menkel y colaboradores (Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554). El banco de genes, que se ha obtenido de la manera descrita, se transfiere a continuación mediante una transformación o electroporación a la cepa indicadora con defecto en el

gen brnF o brnE, y se buscan aquellos transformantes, que poseen la capacidad de crecer sobre un agar mínimo en presencia de unos oligopéptidos que contienen aminoácidos ramificados. El fragmento de ADN clonado se puede someter a continuación a un análisis de las secuencias.

En el caso de la utilización de una mutante producida por mutagénesis con Tn5531 de una bacteria corineforme tal como p.ej. la cepa ATCC14752brnE::Tn5531, el alelo brnE::Tn5531 se puede clonar y aislar directamente mediando aprovechamiento del gen aph3 de resistencia frente a kanamicina, que está contenido en ella. Para ello, se utilizan unos conocidos vectores de clonación tales como p.ej. el pUC18 (Norrander y colaboradores, Gene (1983) 26: 101-106 y Yanisch-Perron y colaboradores, Gene (1985) 33: 103-119). Como anfitriones de clonación se adecuan en especial las cepas de E. coli, que son defectuosas en cuanto a restricción y recombinación. Un ejemplo de ellas es la cepa DH5 α mcr, que había sido descrita por Grant y colaboradores (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649). La selección en cuanto a transformantes se efectúa en presencia de kanamicina. El ADN plasmídico de los transformantes obtenidos es secuenciado a continuación. Para ello, se puede utilizar el método de rotura de cadenas con didesoxi, descrito por Sanger y colaboradores (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1977) 74: 5463-5467). De acuerdo con éste, se obtienen los genes que están contenidos secuencia arriba y secuencia abajo del sitio de inserción de Tn5531. Las obtenidas secuencias de nucleótidos se pueden analizar y reunir entonces con unos programas de análisis de

secuencias obtenibles comercialmente, tales como p.ej. el paquete de programas lógicos Lasergene (Biocomputing Software for Windows, de DNASTAR, Madison, EE.UU.) o el paquete de programas lógicos HUSAR (versión 4.0, EMBL, Heidelberg, Alemania).

De esta manera se obtuvieron las nuevas secuencias de ADN de *C. glutamicum* que codifican la exportación de aminoácidos ramificados, y que, en forma de la SEQ ID NO 1, son una parte componente del presente invento. En SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 4 se exponen las regiones codificadoras de los genes *brnF* y *brnE*. En SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 5 se exponen las secuencias de aminoácidos de los productos génicos que resultan a partir de SEQ ID NO 1, o respectivamente de SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 4.

Las secuencias de ADN codificadoras, que resultan a partir de SEQ ID NO 1 por medio de la degeneración del código genético, son asimismo una parte componente de la descripción. De igual manera, unas secuencias de ADN, que se hibridan con SEQ ID NO 1, o con algunas partes de SEQ ID NO 1, constituyen una parte componente de la descripción. En el mundo especializado se conocen además unos intercambios conservativos de aminoácidos, tales como el intercambio de glicina por alanina o el intercambio de ácido aspártico por ácido glutámico en proteínas como unas "mutaciones con sentido" (en inglés "sense mutations"), que no conducen a ninguna modificación fundamental de la actividad de la proteína, es decir que son de función neutra. Además, es conocido que unas modificaciones junto al extremo de N y/o de C de una proteína no perjudican esencialmente a la función de ésta o incluso la pueden estabilizar. Un experto en la especialidad encontrará datos a este respecto, entre

otras, en las citas de Bassat y colaboradores (Journal of Bacteriology 169: 751-757 (1987)), de O'Regan y colaboradores (Gene 77: 237-251 (1989), de Sahin-Toth y colaboradores (Protein Sciences 3: 240-247 (1994)), de
5 Hochuli y colaboradores (Bio/Technology 6: 1321-1325 (1988)) y en conocidos libros de texto de la genética y la biología molecular. Las secuencias de aminoácidos, que resultan de un modo correspondiente a partir de SEQ ID NO 2 o SEQ ID NO 4, son asimismo una parte componente del
10 invento.

Mediando aprovechamiento de la secuencia de nucleótidos que se representa en SEQ ID No. 1, se pueden sintetizar unos cebadores adecuados y éstos se pueden utilizar entonces, con ayuda de la reacción en cadena de
15 la polimerasa (PCR), para amplificar los genes brnF y brnE de diferentes bacterias corineformes y de diferentes cepas. Un experto en la especialidad encuentra instrucciones a este respecto, entre otras referencias, por ejemplo, en el manual de Gait; Oligonukleotide
20 synthesis: a practical approach [Síntesis de oligonucleótidos, un enfoque práctico] (IRL Press, Oxford, Reino Unido, 1984) y en la obra de Newton y Graham: PCR (editorial Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Alemania, 1994). Alternativamente, la
25 secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID No. 1 o unas partes de ésta se pueden utilizar como sonda para la búsqueda de los genes brnF y/o brnE en bancos de genes, en particular de bacterias corineformes. Un experto en la especialidad encuentra instrucciones a este respecto,
30 entre otras referencias, por ejemplo, en el manual "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" (La guía del usuario del sistema DIG para la hibridación en

filtros) de la entidad Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania), y en la de cita de Liebl y colaboradores (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Los fragmentos de ADN que contienen los genes brnE y brnF amplificados de esta manera, son a
5 continuación clonados y secuenciados.

De esta manera, se obtuvo la secuencia de ADN expuesta en SEQ ID No. 6 de los genes brnF y brnE de la cepa ATCC13032, que es asimismo una parte componente del
10 presente invento.

Los autores del invento descubrieron que unas bacterias corineformes, después de una sobreexpresión del gen de exportación brnF y/o brnE, producen aminoácidos ramificados de una manera mejorada.

15 Para la consecución de una sobreexpresión, se puede aumentar el número de copias de los correspondientes genes, o se puede mutar la región de promotor y de regulación o el sitio de fijación a ribosomas, que se encuentra secuencia arriba del gen estructural. De igual
20 manera actúan unos casetes de expresión, que son incorporados secuencia arriba del gen estructural. Por medio de unos promotores inducibles es adicionalmente posible aumentar la expresión en el transcurso de la producción por fermentación de aminoácidos ramificados.
25 Mediante unas medidas técnicas destinadas a la prolongación de la duración de vida útil del ARN-m (mensajero) se mejora asimismo la expresión. Además, mediante evitación de la degradación de la proteína enzimática se refuerza asimismo la actividad enzimática.
30 Los genes o las construcciones artificiales de genes pueden presentarse o bien en plásmidos con diferentes números de copias, o pueden ser integrados en un

cromosoma y amplificados. Alternativamente, se puede conseguir además una sobreexpresión de los correspondientes genes mediante una modificación de la composición de los medios y mediante la conducción de la
5 cultivación.

Un experto en la especialidad encuentra instrucciones a este respecto, entre otras referencias, en las citas de Martin y colaboradores (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), de Guerrero y colaboradores (Gene 138,
10 35-41 (1994)), de Tsuchiya y Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), de Eikmanns y colaboradores (Gene 102, 93-98 (1991)), en el documento de patente europea EP-B 0 472 869, en el documento de patente de los EE.UU. 4.601.893, en las citas de Schwarzer y Pühler
15 (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), de Reinscheid y colaboradores (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), de LaBarre y colaboradores (Journal of Bacteriology 175, 1.001-1.007 (1993)), en la solicitud de patente internacional WO 96/15246, en la cita de
20 Malumbres y colaboradores (Gene 134, 15 - 24 (1993)), en el documento de publicación para información de solicitud de patente japonesa JP-A-10-229891, en las citas de Jensen y Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)), de Makrides (Microbiological Reviews 60: 512-538 (1996) y en conocidos libros de texto de la genética y la biología molecular.

A modo de ejemplo, los genes brnF y/o brnE conformes al invento fueron sobreexpresados con ayuda de ciertos plásmidos. Como plásmidos se adecuan aquéllos que son
30 replicados en bacterias corineformes. Numerosos vectores plasmídicos conocidos, tales como p.ej. el pZ1 (Menkel y colaboradores, Applied and Environmental Microbiology

(1989) 64: 549-554), el pEKEx1 (Eikmanns y colaboradores, Gene 102: 93-98 (1991)) o el pHS2-1 (Sonnen y colaboradores, Gene 107: 69-74 (1991)) se basan en los plásmidos crípticos pHM1519, pBL1 o pGA1. Otros vectores
5 plasmídicos, tales como p.ej. aquéllos que se basan en el pCG4 (documento US-A 4.489.160), o en el pNG2 (Serwold-Davis y colaboradores, FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)), ó en el pAG1 (documento US-A 5.158.891), se pueden utilizar de igual manera.

10 Adicionalmente, para la producción de aminoácidos ramificados puede ser ventajoso sobreexpresar, junto a los nuevos genes brnF y/o brnE, uno o varios genes que codifican otras enzimas de la conocida ruta de biosíntesis de los aminoácidos ramificados, o enzimas del
15 metabolismo anaplerótico o enzimas del ciclo del ácido cítrico.

Así, por ejemplo, para la producción de L-isoleucina, se pueden sobreexpresar

20 • simultáneamente el gen hom que codifica la homoserina deshidrogenasa (Peoples y colaboradores, Molecular Microbiology 2, 63-72 (1988) o el alelo hom^{dr} que codifica una homoserina-deshidrogenasa que es resistente frente a una retroalimentación (en
25 inglés "feed back resistant" (Archer y colaboradores, Gene 107, 53-59 (1991)) o

• simultáneamente el gen ilvA que codifica la treonina deshidratasa (Möckel y colaboradores, Journal of
30 Bacteriology (1992) 8065-8072)) o el alelo ilvA(Fbr) que codifica una treonina deshidratasa, que es resistente frente a una retroalimentación (Möckel y

colaboradores, (1994) Molecular Microbiology 13: 833-842), o

- 5 • simultáneamente los genes *ilvBN* que codifican la acetohidroxiácido sintetasa (Keilhauer y colaboradores, (1993) Journal of Bacteriology 175: 5595-5603), o
- 10 • simultáneamente el gen *ilvD* que codifica la dihidroxiácido deshidratasa (Sahm y Eggeling (1999) Applied and Environmental Microbiology 65: 1.973-1.979), o
- 15 • simultáneamente el gen *pyc* que codifica la piruvato carboxilasa (documento DE-A-19 831 609), o
- 20 • simultáneamente el gen *mgo* que codifica la malato:quinona oxidorreductasa (Molenaar y colaboradores, European Journal of Biochemistry 254, 395 - 403 (1998)

Así, por ejemplo, para la producción de L-leucina, se pueden sobreexpresar

- 25 • simultáneamente el gen *leuA* que codifica la isopropilmalato sintetasa (Pátek y colaboradores, Applied Environmental Microbiology 60 (1994) 133-140) o un alelo que codifica una isopropilmalato sintetasa que es resistente frente a una
- 30 retroalimentación, o

- simultáneamente los genes leuC y leuD que codifican la isopropilmalato deshidratasa (Pátek y colaboradores, Applied Environmental Microbiology 60 (1994) 133-140), o

5

- simultáneamente el gen leuB que codifica la isopropilmalato deshidrogenasa (Pátek y colaboradores, Applied Environmental Microbiology 60 (1994) 133-140), o

10

- simultáneamente los genes ilvBN que codifican la acetohidroxiácido sintetasa (Keilhauer y colaboradores, (1993) Journal of Bacteriology 175: 5595-5603), o

15

- simultáneamente el gen ilvD que codifica la dihidroxiácido deshidratasa (Sahm y Eggeling (1999) Applied and Environmental Microbiology 65: 1.973-1.979), o

20

- simultáneamente el gen mqo que codifica la malato:quinona oxidorreductasa (Molenaar y colaboradores, European Journal of Biochemistry 254, 395 - 403 (1998)).

25

Así por ejemplo, para la producción de L-valina, se pueden sobreexpresar

30

- simultáneamente los genes ilvBN que codifican la acetohidroxiácido sintetasa (Keilhauer y colaboradores, (1993) Journal of Bacteriology 175: 5.595-5.603), o

- simultáneamente el gen *ilvD* que codifica la dihidroxiácido deshidratasa (Sahm y Eggeling (1999) Applied and Environmental Microbiology 65: 1.973-1.979), o
- simultáneamente el gen *mqo* que codifica la malato:quinona oxidoreductasa (Molenaar y colaboradores, European Journal of Biochemistry 254, 395 - 403 (1998)).

Además, para la producción de aminoácidos ramificados puede ser ventajoso, junto a la sobreexpresión de los genes *brnE* y/o *brnF*, desconectar las reacciones secundarias indeseadas (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms" [Cultivo de microorganismos que producen aminoácidos] en: Overproduction of Microbial Products [Sobreproducción de productos microbianos], Krumphanzl, Sikyta, Vanek (coordinadores de edición), Academic Press, Londres, Reino Unido, 1982).

Los microorganismos producidos conforme al invento se pueden cultivar de un modo continuo o discontinuo en el procedimiento batch (cultivación por tandas) o en el procedimiento fed batch (procedimiento de afluencia) o en el procedimiento fed batch repeated (procedimiento de afluencia repetida) con el fin de efectuar la producción de aminoácidos ramificados. Una recopilación acerca de métodos conocidos de cultivación se describe en el libro de texto de Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik [Técnica de bioprocesos 1, introducción en la técnica de los bioprocesos] (editorial

Gustav Fischer, Stuttgart, 1991)) o en el libro de texto de Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen [Biorreactores y disposiciones periféricas] (editorial Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)).

5 El medio de cultivo que se ha de utilizar, debe de satisfacer de una manera apropiada las exigencias de las respectivas cepas. Unas descripciones de medios de cultivo de diferentes microorganismos están contenidas en el manual "Manual of Methods for General Bacteriology"
10 [Manual de métodos para la bacteriología general] de la American Society for Bacteriology (Washington D.C., EE.UU. 1981). Como fuente de carbono se pueden utilizar azúcares e hidratos de carbono, tales como p.ej. glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, melazas, almidones
15 y celulosas, aceites y grasas, tales como p.ej. aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y grasa de coco, ácidos grasos, tales como p.ej. ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes, tales como p.ej. glicerol y etanol, y ácidos orgánicos, tales como
20 p.ej. ácido acético. Estas sustancias se pueden utilizar individualmente o como una mezcla. Como fuente de nitrógeno se pueden utilizar compuestos orgánicos que contienen nitrógeno, tales como peptonas, un extracto de levadura, un extracto de carne, un extracto de malta,
25 agua de maceración de maíz, harina de soja y urea, o compuestos inorgánicos, tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio y nitrato de amonio. Las fuentes de nitrógeno se pueden utilizar individualmente o como una mezcla. Como fuente
30 de fósforo se pueden utilizar ácido fosfórico, dihidrógeno-fosfato de potasio, hidrógeno-fosfato de dipotasio o las correspondientes sales que contienen

sodio. El medio de cultivo debe de contener además unas sales de metales, tales como p.ej. sulfato de magnesio o sulfato de hierro, que son necesarias para el crecimiento. Finalmente, se pueden emplear sustancias de crecimiento esenciales, tales como aminoácidos y vitaminas, adicionalmente a las sustancias arriba mencionadas. Al medio de cultivo se le pueden añadir adicionalmente unos compuestos precursores adecuados. Las mencionadas sustancias empleadas se pueden añadir al cultivo en forma de una tanda única o se pueden alimentar de una manera apropiada durante la cultivación.

Para el control del valor del pH del cultivo se emplean de un modo apropiado compuestos de carácter básico, tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco, o compuestos de carácter ácido, tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Para la represión del desarrollo de espuma se pueden emplear agentes antiespumantes tales como p.ej. ésteres poliglicólicos de ácidos grasos. Para la conservación de la estabilidad de los plásmidos se pueden añadir al medio unas apropiadas sustancias que actúan de un modo selectivo, p.ej. antibióticos. Con el fin de mantener unas condiciones aerobias, se introducen en el cultivo oxígeno o mezclas gaseosas que contienen oxígeno, tales como p.ej. aire. La temperatura del cultivo está situada normalmente en 20°C hasta 45°C y de manera preferida en 25°C hasta 40°C. El cultivo se prosigue durante tanto tiempo hasta que se haya formado una cantidad máxima de aminoácidos ramificados. Esta meta se alcanza normalmente en el transcurso de 10 horas hasta 160 horas.

El análisis de los aminoácidos ramificados se puede efectuar mediante una cromatografía de intercambio de

aniones con una subsiguiente derivatización con ninhidrina, tal como se describe en la cita de Spackman y colaboradores (Analytical Chemistry, 30 (1958) 1190), o se puede efectuar mediante una HPLC de fase inversa, tal como se describe en la cita de Lindroth y colaboradores (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174).

En la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares) (DSMZ, Braunschweig, Alemania) se depositó el siguiente microorganismo según el Convenio de Budapest.

- Escherichia coli cepa GM2929pCGL0040 como DSM 12839

15

Ejemplos

El presente invento se ilustra más detalladamente en lo sucesivo con ayuda de unos Ejemplos de realización.

El aislamiento de un ADN plasmídico procedente de Escherichia coli, así como todas las técnicas para la restricción y los tratamientos de Klenow y con una fosfatasa alcalina se llevaron a cabo según Sambrook y colaboradores: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). La transformación de Escherichia coli, siempre y cuando que no describa otra cosa distinta, se llevó a cabo según Chung y colaboradores (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1989) 86: 2172-2175).

30

Ejemplo 1

Clonación y secuenciación de los genes brnF y brnE de *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752

5 1. Mutagénesis con un transposón

La cepa *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752 se sometió a una mutagénesis con el transposón Tn5531, cuya secuencia se ha depositado bajo el número de acceso U53587 en el banco de datos de nucleótidos del National Center for

10 Biotechnology Information (Bethesda, EE.UU.). A partir de la cepa de *E. coli* GM2929pCGL0040 con defecto en metilasa (*E. coli* GM2929: Palmer y colaboradores, *Gene* (1994) 143: 1-12) se aisló el plásmido pCGL0040, que contiene el transposón compuesto Tn5531 (Ankri y colaboradores,

15 *Journal of Bacteriology* (1996) 178: 4412-4419). La cepa *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752 se transformó mediante una electroporación (Haynes y colaboradores, *FEMS Microbiology Letters* (1989) 61: 329-334) con el plásmido pCGL0040. Los clones, en cuyos casos se había

20 integrado el transposón Tn5531 en el genoma, fueron identificados con ayuda de su resistencia frente a kanamicina sobre placas de agar LBHIS que contenían 15 µg/ml de kanamicina (Liebl y colaboradores, *FEMS Microbiology Letters* (1989) 65: 299-304). De esta manera

25 se obtuvieron 2.000 clones, que se comprobaron en cuanto a un crecimiento retardado en presencia de isoleucil-isoleucina. Para ello, todos los clones fueron transferidos individualmente a placas de agar con medio mínimo CGXII, con y sin isoleucil-isoleucina 3 mM. El

30 medio era idéntico al medio CGXII descrito en la cita de Keilhauer y colaboradores (*Journal of Bacteriology* (1993) 175: 5593-5603), pero contenía adicionalmente 25 µg/ml de

kanamicina y 15 g/l de agar. La composición del medio descrito por Keilhauer y colaboradores se ha representado en la Tabla 1.

5

Tabla 1

Composición del medio CGXII

Componente	Concentración
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20 g/l
Urea	5 g/l
KH_2PO_4	1 g/l
K_2HPO_4	1 g/l
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0,25 g/l
Ácido 3-morfolinopropanosulfónico	42 g/l
CaCl_2	10 mg/l
$\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	10 mg/l
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	10 mg/l
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1 mg/l
CuSO_4	0,2 mg/l
$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,02 mg/l
Biotina	0,2 mg/l
Glucosa	40 g/l
Ácido protocatéquico	30 mg/l

Las placas de agar se incubaron a 30°C y se investigó el crecimiento después de 12, 18 y 24 horas. Se obtuvo una mutante por transposón, que creció sin isoleucil-isoleucina de un modo comparable a la cepa de partida *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752, pero que en presencia de isoleucil-isoleucina 3 mM mostró un crecimiento retardado. Ésta fue designada como ATCC14752brnF::Tn5531.

15

2. Clonación y secuenciación del sitio de inserción de Tn5531 en ATCC14752brnF::Tn5531

Con el fin de clonar el sitio de inserción situado
secuencia abajo del transposón Tn5531, en la mutante
5 descrita en el Ejemplo 1.1 se aisló primeramente el ADN
cromosómico de esta cepa mutante tal como se describe en
la cita de Schwarzer y colaboradores (Bio/Technology
(1990) 9: 84-87) y se cortaron 400 ng de éste con la
endonucleasa de restricción EcoRI. La tanda completa de
10 restricción se ligó en el vector pUC18, que había sido
linealizado asimismo con EcoRI (Norander y colaboradores,
Gene (1983) 26: 101-106) de la entidad Roche Diagnostics
(Mannheim, Alemania). Con toda la tanda de ligación se
transformó la cepa de E. coli DH5 α mcr (Grant y
15 colaboradores, Proceedings of the National Academy of
Sciences of the United States of America (1990) 87: 4645-
4649) mediante una electroporación (Dower y
colaboradores, Nucleic Acid Research (1988) 16: 6127-
6145). Los transformantes, en los que en el vector pUC18
20 los sitios de inserción del transposón Tn5531 se
presentaban clonados, se identificaron con ayuda de su
resistencia frente a carbenicilina y kanamicina, sobre
placas de agar LB que contenían 50 μ g/ml de carbenicilina
y 25 μ g/ml de kanamicina. A partir de tres de los
25 transformantes se prepararon los plásmidos, y mediante un
análisis por restricción se determinaron los tamaños de
los insertos clonados. La secuencia de nucleótidos del
sitio de inserción sobre uno de los plásmidos, que tiene
un inserto con un tamaño de aproximadamente 7,2 kb
30 (kilobases), se determinó según el método de rotura de
cadenas con didesoxi de Sanger y colaboradores
(Proceedings of the National Academy of Sciences of the

United States of America USA (1977) 74: 5463-5467). Para esto, se secuenciaron 1,3 kb del inserto partiendo del siguiente cebador de oligonucleótidos:

5'-CGG GTC TAC ACC GCT AGC CCA GG-3'.

5 Para la identificación del sitio de inserción, que está situado secuencia arriba del transposón, el ADN cromosómico de la mutante se cortó con la endonucleasa de restricción PstI y se ligó en el vector pUC18 linealizado con PstI. La clonación ulterior se llevó a cabo tal como
10 se ha descrito más arriba. La secuencia de nucleótidos del sitio de inserción en uno de los plásmidos, que tiene un inserto con un tamaño de aproximadamente 4,8 kb, se determinó según el método de rotura de cadenas con dideoxi de Sanger y colaboradores (Proceedings of the
15 National Academy of Sciences of the United States of America USA (1977) 74: 5463-5467). Para esto, se secuenciaron 1,6 kb del inserto partiendo del siguiente cebador de oligonucleótidos:

5'-CGG TGC CTT ATC CAT TCA GG-3'.

20 Las secuencias de nucleótidos obtenidas se analizaron y reunieron con el paquete de programas lógicos Lasergene (Biocomputing Software for Windows, de DNASTAR, Madison, EE.UU.). Esta secuencia de nucleótidos se reproduce como SEQ ID NO 1. El análisis estableció la
25 identificación de dos cuadros de lectura abiertos, con unas longitudes de 753 pb (pares de bases) y de 324 pb, que se exponen como SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 4. Los correspondientes genes se designaron como los genes brnF y brnE. Los correspondientes productos génicos abarcan
30 251 y 108 aminoácidos y se exponen como SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 5.

Ejemplo 2

Clonación y secuenciación de los genes brnF y brnE procedentes de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

Los genes brnE y brnF de la cepa ATCC13032 se
5 clonaron en el vector de clonación pUC18 de *E. coli*
(Norrande y colaboradores, Gene (1983) 26: 101-106,
Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). La clonación se
llevó a cabo en dos etapas. Primeramente, mediante una
reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificaron
10 los genes procedentes de *Corynebacterium glutamicum*
ATCC13032 mediante el siguiente cebador de
oligonucleótidos que se deriva de SEQ ID NO 1.

brnE, brnF, -forward (hacia delante):

15 5'-[AGC GCT GTC TGC TTA AGC CTT TTC]-3'

brnE, brnF, -reverse (inverso):

5'-[GCG CGA TCA ATG GAA TCT AGC TTC]-3'

20 La reacción de PCR se llevó a cabo en 30 ciclos en
presencia de 200 μ M de desoxinucleótido-trifosfatos
(dATP, dCTP, dGTP, dTTP), en cada caso 1 μ m del
correspondiente oligonucleótido, 100 ng del ADN
cromosómico de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, 1/10
25 del volumen de un tampón de reacción concentrado a 10
veces y 2,6 unidades de una mezcla estable frente al
calor de las ADN polimerasas Taq y Pwo (Expand High
Fidelity PCR System [Sistema de PCR para expansión con
alta fidelidad] de la entidad Roche Diagnostics,
30 Mannheim, Alemania) en un termociclador (PTC-100, MJ
Research, Inc., Watertown EE.UU.) en las siguientes

condiciones: 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos.

El fragmento amplificado, con un tamaño de aproximadamente 1,3 kb, se ligó entonces a continuación con ayuda del estuche de ligación SureClone Ligation Kit (de Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) según los datos del fabricante, en el sitio de corte con SmaI del vector pUC18. Con toda la tanda de ligación se transformó la cepa DH5 α mcr de E.coli (Grant y colaboradores, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1990) 87: 4645-4649). Los transformantes se identificaron con ayuda de su resistencia frente a carbenicilina, sobre unas placas de agar LB que contenían 50 μ g/ml de carbenicilina. A partir de 8 de los transformantes se prepararon los plásmidos y, mediante un análisis por restricción, se comprobaron en cuanto a la presencia del fragmento de PCR con un tamaño de 1,3 kb, como un inserto. El plásmido recombinante resultante se designó seguidamente como pUC18brnEF.

La secuencia de nucleótidos del fragmento de PCR con un tamaño de 1,3 kb, en el plásmido pUC18brnEF se determinó según el método de rotura de cadenas con dideoxi de Sanger y colaboradores (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1977) 74: 5463-5467). A este fin, se secuenció el inserto completo de pUC18brnEF con ayuda del siguiente cebador de la entidad Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania).

30

Cebador universal:

5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'

Cebador inverso:

5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3'

5 La secuencia de nucleótidos obtenida se ha reproducido como SEQ ID NO 6. La secuencia de nucleótidos obtenida se analizó con el paquete de programas lógicos Lasergene (Biocomputing Software for Windows, de DNASTAR, Madison, EE.UU.).

10

Ejemplo 3

Expresión de los genes brnEF procedentes de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

15 Los genes brnEF se clonaron en el vector de lanzadera (shuttle) pJC1 de *E. coli* - *C. glutamicum* (Cremer y colaboradores, 1990, *Molecular and General Genetics* 220: 478 - 480). La clonación se llevó a cabo en dos etapas. Primeramente, mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificó el gen procedente de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 por medio del siguiente cebador de oligonucleótidos que se deriva de SEQ ID NO 6.

brnEF-forward:

25 5'-GCT CTA GAA CCT TGT CAG CCA GTG CG-3'

brnEF-reverse:

5'-GCT CTA GAA AAA ATC CGC ATC CCC TCA-3'

30 Estos cebadores de oligonucleótidos contenían adicionalmente junto al lado 5' un sitio de reconocimiento por XbaI. La reacción de PCR se llevó a

cabo en 30 ciclos en presencia de 200 μM de desoxinucleótido-trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), en cada caso 1 μM del correspondiente oligonucleótido, 100 ng de un ADN cromosómico de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, 1/10 del volumen de un tampón de reacción concentrado en 10 veces y 2,6 unidades de una mezcla estable frente al calor de las ADN polimerasas Taq y Pwo (Expand High Fidelity PCR System de la entidad Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) en un termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc., Watertown EE.UU.) en las siguientes condiciones: 94°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos. El fragmento amplificado con un tamaño de aproximadamente 1,3 kb, se trató entonces a continuación con la enzima de restricción XbaI según los datos del fabricante Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania), y se ligó con ayuda del estuche Rapid Ligation Kit (de Roche Diagnostics) en el sitio de corte con XbaI del vector pJC1. La cepa DH5 α mc_r de *E.coli* (Grant y colaboradores, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (1990) 87: 4645-4649) se transformó con toda la tanda de ligación. Los transformantes se identificaron con ayuda de su resistencia frente a kanamicina sobre unas placas de agar LB que contenían 50 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina. A partir de 8 de los transformantes se prepararon los plásmidos y, mediante un análisis por restricción, se comprobaron en cuanto a la presencia del fragmento de PCR de 1,3 kb, como un inserto. El plásmido recombinante resultante se designa en lo sucesivo como pJC1brnEF. Mediante una electroporación (Haynes y colaboradores, FEMS Microbiology Letters (1989) 61: 329-334) se introdujeron los plásmidos pJC1 y pJC1brnEF en la

cepa DM368-2 de *Corynebacterium glutamicum* que forma isoleucina. La cepa DM368-2 se ha descrito en el documento EP-B-0.385.940 y se ha depositado en la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Alemania) según el Convenio de Budapest. Los transformantes se identificaron con ayuda de su resistencia frente a kanamicina sobre unas placas de agar LBHIS que contenían 15 µg/ml de kanamicina (Liebl y colaboradores, FEMS Microbiology Letters (1989) 65: 299-304). De esta manera resultaron las cepas DM368-2/pJC1 y DM368-2/pJC1brnEF de *Corynebacterium glutamicum*.

Ejemplo 4

Producción de L-isoleucina con *Corynebacterium glutamicum*

Para la investigación de su formación de isoleucina, las cepas DM368-2/pJC1 y DM368-2/pJC1brnEF se cultivaron previamente en 50 ml del medio Brain Heart Infusion (Infusión de cerebro y corazón) con 50 µg/ml de kanamicina (Difco Laboratories, Detroit, EE.UU.) durante 14 horas a 30°C. A continuación, las células se lavaron dos veces con una solución al 0,9 % (p/v = peso/volumen) de cloruro de sodio y con esta suspensión se inocularon en cada caso 60 ml de medio CGXII de tal manera que la DO₆₀₀ (densidad óptica a 600 nm) fuese de 0,1. El medio era idéntico al medio descrito por Keilhauer y colaboradores (Journal of Bacteriology (1993) 175: 5593-5603, pero contenía adicionalmente 50 µg de kanamicina por ml. La cultivación de ambas cepas se llevó a cabo a 30°C y 130 rpm. Después de 24 y 48 horas, se extrajeron en cada caso muestras y las células se separaron brevemente por centrifugación (durante 5 minutos a 13.000

revoluciones por minuto con una Biofuge pico de la entidad Heraeus (Osterode, Alemania).

La determinación cuantitativa de las concentraciones extracelulares de aminoácidos a partir del material sobrenadante del cultivo se efectuó mediante una HPLC de fase inversa (Lindroth y colaboradores, Analytical chemistry (1979) 51: 1167-1174). Se utilizó un equipo de HPLC de la serie HP1100 (de Hewlett-Packard, Waldbronn, Alemania) con un detector de fluorescencia (G1321A) conectado; la regulación del sistema y la evaluación de los datos se efectuaron con un puesto HP Chem Station (de Hewlett-Packard). 1 µl de la solución de aminoácidos, que se ha de analizar, se mezcló en una derivatización automática en columna preliminar con 20 µl de un reactivo acabado de orto-ftalaldehído y 2-mercapto-etanol (de Pierce Europe BV, Oud-Beijerland, Holanda). Los isoindoles sustituidos con tio, fluorescentes, que resultaron en este caso (Jones y colaboradores, Journal of Chromatography (1983) 266: 471-482), se separaron a través de una columna preliminar combinada (40x4 mm Hypersil ODS 5) y de una columna principal (Hypersil ODS 5, ambas columnas de la entidad CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Alemania) con un programa de gradientes con una fase crecientemente apolar (de metanol). El eluyente polar era acetato de sodio (0,1 M; pH 7,2); el caudal fue de 0,8 ml por minuto. La detección de la fluorescencia de los aminoácidos derivatizados se efectuó a una longitud de onda de excitación de 230 nm y a una longitud de onda de emisión de 450 nm. Las concentraciones de aminoácidos se calcularon a través de una comparación con un patrón externo y con asparagina como patrón interno adicional.

Los resultados se exponen en la Tabla 2.

Tabla 2:

Cepa	L-isoleucina (mM)	
	24 horas	48 horas
DM368-2/pJC1	0,7	1,1
DM368-2/pJC1brnEF	1,4	1,8

5 Figuras:

- Figura 1: Mapa del plásmido pCGL0040, que contiene el transposón Tn5531. El transposón está caracterizado como una flecha no rayada.

10

Los datos de longitudes se han de considerar como datos aproximados. Las abreviaturas y denominaciones utilizadas tienen los siguientes significados:

- EcoRI: endonucleasa de restricción procedente de Escherichia coli
- XbaI: endonucleasa de restricción procedente de Xanthomonas badrii
- ClaI: endonucleasa de restricción procedente de Caryophanum latum
- SalI: endonucleasa de restricción procedente de Streptomyces albus
- ScaI: endonucleasa de restricción procedente de Streptomyces caespitosus
- SmaI: endonucleasa de restricción procedente de Serratia marcescens
- Amp: gen de resistencia frente a ampicilina
- Kan: gen de resistencia frente a kanamicina
- oriBR322: región de replicación del plásmido pBR322

25

PROTOCOLO DE SECUENCIAS

<110> Degussa-Hüls AG
Forschungszentrum-Jülich GmbH

5

<120>Secuencias de nucleótidos que codifican la
exportación de aminoácidos ramificados, un
procedimiento para su aislamiento y su utilización

10 <130> 990128 BT

<140>

<141>

15 <160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20 <211> 1271

<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum ATCC14752

<220>

25 <221> gen

<222> (101) .. (853)

<223> brnF

<220>

30 <221> gen

<222> (853) .. (1176)

<223> brnE

<400> 1

```

gcgcgatcaa tggaaatctag cttcatatat tgcacaatag cctagttgag gtgcgcaaac 60
tggcaacaaa actacccggc aattgtgtga tgattgtagt gtgcaaaaaa cgcaagagat 120
tcattcaagc ctggagggtg cgccatccaa ggcagccctg gaaccagatg ataaaggtta 180
tcggcgctac gaaatcgcgc aaggctctaa aacctccctt gctgcagggt tgggcatgta 240
cccgattggt attgogtttg gtctcttggt tattcaatac ggctacgaat ggtgggcagc 300
cccactgttt tcggcctga ttttcggggg ctccaccgaa atgctggtca tcgccctcgt 360
tgtgggocga gcgcccctgg gcgccatcgc gtcaccaca ttgctggtga acttcogcca 420
cgtattctat gcgttttcat tcccgtgca tgtggtcaaa aacccccatt ccogtttcta 480
ttcggttttc gcgcttatcg acgaagccta cgcagtcact ggggccagge ccgcaggctg 540
gtcggcgctg cgaacttatc caatgcaaat agcgtttcac tcctactggg tattcggcgg 600
tctcaccgga gtggcgatcg cagagttgat tccttttgaa attaagggcc tcgagttcgc 660
cctttgctct ctctttgtca cgctgacttt ggattcctgc cgaacgaaaa agcagatccc 720
ttctctgctg ctgcgagggt tgagcttcac cattgctctt gtggtaatte caggtcagge 780
cetatttgog gcgctgctga tcttcttggg tctggtgacc atccggtact tcttcttggg 840
aaaggctgct aatgacaac tgatttctcc tgtattctcc ttggtgtcgc agtatgtgca 900
gtcattactt ttgcgctccg ggcggttccg ttcttaatcc ttaagccctt acgtaatca 960
caatttgtgg gcaaaaatggc gatgtggatg ccagcaggaa tccttgccat ttgaccgca 1020
tcaacgtttc gcagcaatgc gatagatctg aagactctaa cctttggtct cattgccgtt 1080
gcgattacag tggtgocgca tcttcttggc ggtcgacgca ccttggtgag cgttggcgct 1140
ggcaccatcg tttttgttgg actggtgaat cttttctaaa actgcataaa taacaaaaat 1200
ccgcatgcc tcaatttgaa ggggatgocg attttttaag gaacctagaa aaggcttaag 1260
cagacagcgc t 1271

```

<210> 2

<211> 753

5 <212> ADN

<213> *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752

<220>

<221> CDS

10 <222> (1) .. (753)

<223> brnF

<400> 2

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

```

gtc acg ctg act ttg gat tcc tgc cga acg aaa aag cag atc cct tct 624
Val Thr Leu Thr Leu Asp Ser Cys Arg Thr Lys Lys Gln Ile Pro Ser
      195                200                205

ctg ctg ctc gca ggt ttg agc ttc acc att gct ctt gtg gta att cca 672
Leu Leu Leu Ala Gly Leu Ser Phe Thr Ile Ala Leu Val Val Ile
      210                215                220

ggt cag gcc cta ttt gcg gcg ctg ctg atc ttc ttg ggt ctg ttg acc 720
Gly Gln Ala Leu Phe Ala Ala Leu Leu Ile Phe Leu Gly Leu Leu Thr
      225                230                235                240

atc cgg tac ttc ttc ttg gga aag gct gct aaa 753
Ile Arg Tyr Phe Phe Leu Gly Lys Ala Ala Lys
      245                250

```

<210> 3

<211> 251

<212> PRT

5 <213> *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752

<400> 3

```

Val Gln Lys Thr Gln Glu Ile His Ser Ser Leu Glu Val Ser Pro Ser
  1                5                10                15

Lys Ala Ala Leu Glu Pro Asp Asp Lys Gly Tyr Arg Arg Tyr Glu Ile
      20                25                30

Ala Gln Gly Leu Lys Thr Ser Leu Ala Ala Gly Leu Gly Met Tyr Pro
      35                40                45

Ile Gly Ile Ala Phe Gly Leu Leu Val Ile Gln Tyr Gly Tyr Glu Trp
      50                55                60

Trp Ala Ala Pro Leu Phe Ser Gly Leu Ile Phe Ala Gly Ser Thr Glu
      65                70                75                80

Met Leu Val Ile Ala Leu Val Val Gly Ala Ala Pro Leu Gly Ala Ile
      85                90                95

Ala Leu Thr Thr Leu Leu Val Asn Phe Arg His Val Phe Tyr Ala Phe
      100                105                110

Ser Phe Pro Leu His Val Val Lys Asn Pro Ile Ala Arg Phe Tyr Ser
      115                120                125

Val Phe Ala Leu Ile Asp Glu Ala Tyr Ala Val Thr Ala Ala Arg Pro
      130                135                140

Ala Gly Trp Ser Ala Trp Arg Leu Ile Ser Met Gln Ile Ala Phe His
      145                150                155                160

Ser Tyr Trp Val Phe Gly Gly Leu Thr Gly Val Ala Ile Ala Glu Leu
      165                170                175

Ile Pro Phe Glu Ile Lys Gly Leu Glu Phe Ala Leu Cys Ser Leu Phe
      180                185                190

```

ES 2 352 183 T3

Val Thr Leu Thr Leu Asp Ser Cys Arg Thr Lys Lys Gln Ile Pro Ser
195 200 205
Leu Leu Leu Ala Gly Leu Ser Phe Thr Ile Ala Leu Val Val Ile Pro
210 215 220
Gly Gln Ala Leu Phe Ala Ala Leu Leu Ile Phe Leu Gly Leu Leu Thr
225 230 235 240
Ile Arg Tyr Phe Phe Leu Gly Lys Ala Ala Lys
245 250

<210> 4

<211> 324

<212> ADN

5 <213> *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (324)

10 <223> brnE

<400> 4

atg	aca	act	gat	ttc	tcc	tgt	att	ctc	ctt	gtt	gtc	gca	gta	tgt	gca	48
Met	Thr	Thr	Asp	Phe	Ser	Cys	Ile	Leu	Leu	Val	Val	Ala	Val	Cys	Ala	
1				5					10					15		
gtc	att	act	ttt	gcg	ctc	cgg	gcg	gtt	cgg	ttc	tta	atc	ctt	aag	ccc	96
Val	Ile	Thr	Phe	Ala	Leu	Arg	Ala	Val	Pro	Phe	Leu	Ile	Leu	Lys	Pro	
			20					25						30		
cta	cgt	gaa	tca	caa	ttt	gtg	ggc	aaa	atg	gcg	atg	tgg	atg	cca	gca	144
Leu	Arg	Glu	Ser	Gln	Phe	Val	Gly	Lys	Met	Ala	Met	Trp	Met	Pro	Ala	
		35					40					45				
gga	atc	ctt	gcc	att	ttg	acc	gca	tca	acg	ttt	cgc	agc	aat	gcg	ata	192
Gly	Ile	Leu	Ala	Ile	Leu	Thr	Ala	Ser	Thr	Phe	Arg	Ser	Asn	Ala	Ile	
	50					55					60					
gat	ctg	aag	act	cta	acc	ttt	ggt	ctc	att	gcc	gtt	gcg	att	aca	gtg	240
Asp	Leu	Lys	Thr	Leu	Thr	Phe	Gly	Leu	Ile	Ala	Val	Ala	Ile	Thr	Val	
65					70					75				80		
gtg	gcg	cat	ctt	ctt	ggc	ggt	cga	cgc	acc	ttg	ttg	agc	gtt	ggc	gct	288
Val	Ala	His	Leu	Leu	Gly	Gly	Arg	Arg	Thr	Leu	Leu	Ser	Val	Gly	Ala	
				85					90					95		
ggc	acc	atc	gtt	ttt	gtt	gga	ctg	gtg	aat	ctt	ttc					324
Gly	Thr	Ile	Val	Phe	Val	Gly	Leu	Val	Asn	Leu	Phe					
			100					105								

<210> 5

5 <211> 108

<212> PRT

<213> *Corynebacterium glutamicum* ATCC14752

<400> 5

```

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

```

<210> 6

5 <211> 1271

<212> ADN

<213> Corynebacterium glutamicum ATCC13032

<220>

10 <221> gen

<222> (101) .. (853)

<223> brnF

<220>

15 <221> gen

<222> (853) .. (1176)

<223> brnE

<400> 6

```

gcgcgatcaa tggaatctag cttcatatat tgcacaatag cctagttgag gtgcgcaaac 60
tggcaacaaa actaccggc aattgtgtga tgattgtagt gtgcaaaaaa cgcaagagat 120
tcattcaagc ctggagggtg cgcctccaa ggcagccctg gaaccagatg ataaaggtta 180
tcggcgctac gaaatcgcg aaggtctaaa aacctccctt getgcaggtt tgggcatgta 240
cccgattggt attgcgttt gtctcttgg tattcaatac ggctacgaat ggtgggcagc 300
cccactgttt tccggcctga ttttcgctgg ctccaccgaa atgctggtca tcgcccctgt 360
tgtgggcgca gcgcccctgg gcgccatcgc gctcaccaca ttgctggtga acttccgcca 420
cgtattctat gcgttttcat tcccgtgca tgtggtcaa aacccattg cccgtttcta 480
ttcggttttc gcgcttatcg acgaaacct cgcagtcact gcggccaggc ccgcaggctg 540
gtcggcgtgg cgacttatct caatgcaaat agcgtttcac tcctactggg tattcggcgg 600
tctcaccgga gtggcgatcg cagagtgat tcctttttaa attaagggcc tcgagttcgc 660
cctttgctct ctctttgtca cgtgacttt ggattcctgc cgaacgaaaa agcagatccc 720
ttctctgctg ctgcaggtt tgagcttcac cattgctctt gtggtaatc caggtcaggc 780
cctatttgcg gcgctgctga tcttcttggg tetgttgacc atccggtact tcttcttggg 840
aaaggctgct aatgacaac tgattctcc tgtattctcc ttgttgcgc agtatgtgca 900
gtcattactt ttgcgctccg ggcggttccg ttcttaatcc ttaagccct acgtgaatca 960
caatttgtag gcaaaatggc gatgtggatg ccagcaggaa tccttgccat ttgaccgca 1020
tcaacgtttc gcagcaatgc gatagatctg aagactctaa cctttggtct cattgccgtt 1080

gcgattacag tgggtggcgca tcttcttggc ggtcgacgca ccttggtgag cgttggcgt 1140
ggcaccatcg tttttgttg actggtgaat ctcttctaaa actgcataaa taacaaaaat 1200
ccgatgcc tcaattgaa ggggatgctg attttttaag gaacctagaa aaggcttaag 1260
cagacagcgc t 1271

```

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de L-aminoácidos ramificados por fermentación de bacterias corineformes,
5 caracterizado porque se emplean unas bacterias corineformes, en las que se sobreexpresan los genes brnE y/o brnF, realizándose que el gen brnE codifica un polipéptido, que
10 posee la función de una proteína exportadora para un aminoácido ramificado, y cuya secuencia de aminoácidos es idéntica a SEQ ID No. 5 por lo menos en un 90 %, y que el gen brnF codifica un polipéptido, que posee la función de una proteína exportadora para un aminoácido ramificado, y
15 cuya secuencia de aminoácidos es idéntica a SEQ ID No. 3 por lo menos en un 90 %.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el gen brnE codifica un polipéptido, que comprende la
20 secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 5.

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque el gen brnE comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 4.

25 4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el gen brnF codifica un polipéptido, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 3.

30 5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque el gen brnF comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 2.

6. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque se sobreexpresan el gen brnE y el gen brnF.

5 7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado porque se utiliza un polinucleótido, que comprende la secuencia de nucleótidos desde la posición 101 hasta la 1176 de SEQ ID No. 1.

10 8. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque en el caso de las bacterias corineformes se trata de las del género *Corynebacterium*.

15 9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque en el caso de las bacterias corineformes del género *Corynebacterium* se trata de las de la especie *Corynebacterium glutamicum*.

20 10. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque se emplean unas bacterias corineformes, que ya segregan un aminoácido ramificado.

25 11. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque la sobreexpresión se consigue mediante la utilización de un promotor fuerte.

12. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque la sobreexpresión se consigue mediante un aumento del número de copias.

30 13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado porque

el aumento del número de copias se consigue mediante utilización de un plásmido.

14. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado porque

5 el aumento del número de copias se consigue mediante una amplificación en el cromosoma.

15. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1-14, caracterizado porque

10 para la producción de L-isoleucina se sobreexpresa(n) adicionalmente uno o varios de los gen(es), que se escoge(n) entre el conjunto que se compone de

a) el gen *hom* que codifica la homoserina deshidrogenasa o el alelo *hom^{dr}* que codifica una homoserina deshidrogenasa, que es resistente frente a una retroalimentación,

b) el gen *ilvA* que codifica la treonina deshidratasa, o el alelo *ilvA(Fbr)* que codifica una treonina deshidratasa, que es resistente frente a una retroalimentación,

20 c) los genes *ilvBN* que codifican la acetohidroxiácido sintetasa,

d) el gen *ilvD* que codifica la dihidroxiácido deshidratasa

e) el gen *pyc* que codifica la piruvato carboxilasa, y

25 f) el gen *mqo* que codifica la malato:quinona oxidoreductasa.

16. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1-14,

caracterizado porque

30 para la producción de L-leucina se sobreexpresa(n) adicionalmente uno o varios de los gen(es), que se escoge(n) entre el conjunto que se compone de

- a) el gen leuA que codifica la isopropilmalato sintetasa, o un alelo que codifica una isopropilmalato sintetasa, que es resistente frente a una retroalimentación,
- 5 b) los genes leuC y leuD que codifican la isopropilmalato deshidratasa,
- c) el gen leuB que codifica la isopropilmalato deshidrogenasa
- d) los genes ilvBN que codifican la acetohidroxiácido
10 sintetasa,
- e) el gen ilvD que codifica la dihidroxiácido deshidratasa, y
- f) el gen mqo que codifica la malato:quinona oxidorreductasa.

15 17. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1-14, caracterizado porque para la producción de L-valina se sobreexpresa(n) adicionalmente uno o varios de los gen(es), que se escoge(n) entre el conjunto que se compone de

- 20 a) los genes ilvBN que codifican la acetohidroxiácido sintetasa,
- b) el gen ilvD que codifica la dihidroxiácido deshidratasa, y
- c) el gen mqo que codifica la malato:quinona
25 oxidorreductasa.

18. Procedimiento de acuerdo con por lo menos una de las reivindicaciones 1-17, caracterizado porque se llevan a cabo las siguientes etapas adicionales:

- a) un enriquecimiento del L-aminoácido deseado en el
30 medio o en las células de los microorganismos, y
- b) un aislamiento del L-aminoácido.

19. Procedimiento para el aislamiento del gen brnE o brnF, caracterizado porque como cepas indicadoras se obtienen unas mutantes de una bacteria corineforme, con defecto en este/estos gen(es) y que no crecen, o sólo crecen escasamente, sobre un medio nutritivo que contiene un oligopéptido que contiene isoleucina y/o leucina y/o valina, y

- a) se identifica y aísla el gen brnE o el gen brnF después de haber establecido un banco de genes, o
- 10 b) en el caso de la mutagénesis con un transposón, se selecciona en cuanto al transposón que contiene una resistencia frente a antibióticos, y se obtienen así los genes deseados,

realizándose que el gen brnE codifica un polipéptido, que 15 posee la función de una proteína exportadora para un aminoácido ramificado, y cuya secuencia de aminoácidos es idéntica por lo menos en un 90 % a SEQ ID No. 5, y realizándose que el gen brnF codifica un polipéptido, que posee la función de una proteína exportadora de un 20 aminoácido ramificado, y cuya secuencia de aminoácidos es idéntica por lo menos en un 90 % a SEQ ID No. 3.

20. Polinucleótidos aislados, que se escogen entre el conjunto que se compone de

- a) un polinucleótido que codifica un polipéptido, que 25 tiene la función de una proteína exportadora para un aminoácido ramificado, y que posee la secuencia de aminoácidos que se expone en SEQ ID No. 3 o 5,
- b) un polinucleótido que codifica un polipéptido, que tiene la función de una proteína exportadora para un 30 aminoácido ramificado y que posee una secuencia de aminoácidos, que es idéntica por lo menos en un 90 %

a la secuencia de aminoácidos, que se expone en SEQ ID No. 3 o 5, y

c) un polinucleótido, que es complementario con respecto a los polinucleótidos de a) o b).

5 21. Polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 20, con la secuencia de nucleótidos SEQ ID No. 2.

22. Polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 20 que codifica una secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 5.

10 23. Polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 20, con la secuencia de nucleótidos SEQ ID No. 4.

24. Polinucleótido de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 20 hasta 23, con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 1 o 6.

15 25. Vectores, que contienen un polinucleótido de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 20 hasta 24.

26. Bacterias corineformes o *Escherichia coli*, que contienen el vector de acuerdo con la reivindicación 25.

20 27. Bacterias corineformes de acuerdo con la reivindicación 26, caracterizadas porque se trata de *Corynebacterium glutamicum*.

25 28. Bacterias corineformes de acuerdo una o varias de las reivindicaciones 26 a 27, caracterizadas porque se trata de una cepa, que produce un aminoácido ramificado.

30 29. Cebador de oligonucleótidos o sonda de oligonucleótidos, que contiene por lo menos 15 nucleótidos consecutivos, que se escogen entre SEQ ID No. 4 o la secuencia de nucleótidos que es complementaria con respecto a ésta.

Figura 1:

