



**República Federativa do Brasil**  
Ministério da Indústria, Comércio Exterior  
e Serviços  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0918299-3 B1**

**(22) Data do Depósito: 04/09/2009**

**(45) Data de Concessão: 14/08/2018**



---

**(54) Título: MÉTODO PARA PRODUZIR UM L-AMINOÁCIDO**

**(51) Int.Cl.:** C12P 13/04; C12N 9/04; C12N 15/09

**(30) Prioridade Unionista:** 08/09/2008 JP 2008-229736, 16/02/2009 JP 2009-032839

**(73) Titular(es):** AJINOMOTO CO., INC.

**(72) Inventor(es):** RIE TAKIKAWA; YOSHIHIKO HARA; GEN NONAKA; KAZUHIRO TAKUMI

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 03/03/2011

## “MÉTODO PARA PRODUZIR UM L-AMINOÁCIDO”

### CAMPO TÉCNICO

A presente invenção diz respeito a um método para produzir um L-aminoácido com o uso de um microorganismo, em particular UM método para produzir um L-aminoácido em que dito L-aminoácido seja o ácido L-glutâmico, L-lisina, L-treonina, L-triptofano ou similar. Estes são L-aminoácidos industrialmente úteis, por exemplo, o ácido L-glutâmico útil como um aditivo para condimento, e a L-lisina, a L-treonina e o L-triptofano são úteis como aditivos para a alimentação animal, ingredientes alimentares para a saúde, infusões de aminoácidos, e assim por diante.

### FUNDAMENTOS DA TÉCNICA

Os L-aminoácidos são industrialmente produzidos por fermentação, com o uso de vários microorganismos. Por exemplo, o ácido L-glutâmico é produzido principalmente pela fermentação utilizando-se bactérias produtoras do ácido L-glutâmico das assim chamadas bactérias corineiforme pertencente aos gêneros *Brevibacterium*, *Corynebacterium* ou *Microbacterium*, ou suas cepas mutantes (ver, por exemplo, o documento não patente 1). Como métodos para produzir ácido L-glutâmico pela fermentação com o uso de outros microorganismos, métodos de uso de um microorganismo pertencente ao gênero *Bacillus*, *Streptomyces*, *Penicillium* ou similar (referir-se, por exemplo, ao documento de Patente 1), métodos de uso de um microorganismo pertencente ao gênero *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Candida* ou similar (referir-se, por exemplo, ao documento de Patente 2), métodos de uso de um microorganismo pertencente ao gênero *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Aerobacter aerogenes* (correntemente referido como *Enterobacter aerogenes*) ou similar (referir-se, por exemplo, ao documento de Patente 3), métodos de uso de uma cepa mutante de *Escherichia coli* (referir-se, por exemplo, ao documento de Patente 1), e assim por diante, são conhecidos. Além disso, métodos para produzir o ácido L-

glutâmico com o uso de um microorganismo pertencente aos gêneros *Klebsiella*, *Erwinia*, *Pantoea* ou *Enterobacter*, foram apresentados (referir-se, por exemplo, aos documentos de Patente 2 a 4).

5 Tais métodos para produzir substâncias alvo tais como os L-aminoácidos por fermentação com o uso de um microorganismo como descrito acima, incluem métodos que usam um microorganismo do tipo selvagem (cepa tipo selvagem), métodos de uso de uma cepa auxotrófica derivada de uma cepa do tipo selvagem, métodos de uso de uma cepa mutante de regulação metabólica derivada de uma cepa do tipo selvagem como uma  
10 cepa resistente a um ou mais de vários medicamentos, métodos de uso de uma cepa que é tanto uma cepa auxotrófica quanto da cepa mutante de regulação metabólica, e assim por diante.

Nos últimos anos, as técnicas de DNA recombinantes foram usadas na produção de substâncias alvo mediante fermentação. Por exemplo,  
15 a produtividade do L-aminoácido de um microorganismo pode ser melhorada pela intensificação da expressão de um gene codificando uma enzima biossintética do L-aminoácido (Documentos de Patentes 5 e 6), ou pela intensificação do influxo de uma fonte de carbono dentro de um sistema de biossíntese de L-aminoácido (Documento de Patente 7).

20 Como a glicose desidrogenase, grosseiramente falando, aquelas do tipo dependente de NAD(P) e aquelas do tipo dependente de PQQ (pirroloquinolina quinona) são conhecidas. Além disso, é sabido que estas do tipo dependente de PQQ (EC1.1.5.2) incluem aquelas do tipo solúvel e aquelas do tipo de ligação de membrana, e aquelas do último tipo existem no  
25 espaço periplásmico (espaço entre a membrana externa e a membrana interna) e amplamente existe em enterobactérias. Depois disso, uma glicose desidrogenase que existe em um tal espaço periplásmico e que utiliza PQQ como uma coenzima também é aludida como "GCD".

É sabido que algumas das bactérias tais como *Escherichia coli*

não tem nenhuma capacidade para sintetizar PQQ, que é uma coenzima de GCD, e portanto elas expressam a atividade de GCD apenas quando PQQ é adicionado (Documento não patente 2). Por outro lado, tais bactérias como as bactérias *Pantoea* têm a capacidade de sintetizar PQQ e têm uma holoenzima de GCD.

Como as técnicas que dizem respeito a GCD, um método de produzir celulose a partir de glicose pelo uso de *Gluconobacter xylinus* em que o gene que codifica GCD é deletado (J. Biosci. Bioeng., 99(4), 415-422, 2005), e um método de produzir o ácido [5S,6S]-5,6-diidroxíciclohexa-1,3-dieno-1-carboxílico pelo uso de uma bactéria de *Escherichia* tendo atividade da glicose desidrogenase reduzida, ou uma bactéria de *Escherichia* inerentemente deficiente na atividade de glicose desidrogenase (Documento de Patente 8) são conhecidas.

Entretanto, a influência da redução da atividade GCD de uma bactéria sobre a capacidade de produzir L-aminoácido da bactéria não foi conhecida.

#### Referências da Técnica Anterior

##### Documentos de Patente

Documento de Patente 1: Patente Japonesa Aberta ao Público  
(KOKAI) nº 5-244970

Documento de Patente 2: Patente U.S. nº 3.563.857

Documento de Patente 3: Publicação da Patente Japonesa  
(KOKOKU) nº 32-9393

Documento de Patente 4: Patente Japonesa Aberta ao Público  
nº 2000-189175

Documento de Patente 5: Patente U.S. nº 5.168.056

Documento de Patente 6: Patente U.S. nº 5.776.736

Documento de Patente 7: Patente U.S. nº 5.906.925

Documento de Patente 8: Publicação de Patente Internacional

WO2006/133898

Documentos não patente

Documento não Patente 1: Kunihiko Akashi *et al.*, “*Amino acid fermentation*”, pp.195-215, 1986, Japan Scientific Societies Press

5 Documento não Patente 2: FEMS Microbiol. Lett., 24, 329-333, 1984

## SUMÁRIO DA INVENÇÃO

### OBJETO PARA SER ALCANÇADO PELA INVENÇÃO

Um objeto da presente invenção é prover um microorganismo  
10 pertencente à família *Enterobacteriaceae* e que possa produzir eficientemente um L-aminoácido, e um método para produzir eficientemente um L-aminoácido com o uso de um tal microorganismo.

### MEIOS PARA SE ALCANÇAR O OBJETO

Os inventores da presente invenção conduziram várias  
15 pesquisas a fim de alcançar o objeto acima mencionado e, como um resultado, observaram que uma capacidade para produzir L-aminoácido de uma enterobactéria inerentemente tendo a atividade de GCD foi melhorada modificando-se a enterobactéria de modo que a atividade de GCD fosse reduzida e concluíram a presente invenção.

20 Isto é, a presente invenção provê os seguintes itens:

(1) Um método para produzir um L-aminoácido que  
compreende cultivar uma bactéria que pertence à família da  
*Enterobacteriaceae* e tem uma Capacidade para produzir L-aminoácido em  
um meio para produzir e acumular o L-aminoácido em cultura, e coletar o L-  
25 aminoácido da cultura, em que a bactéria inerentemente tem uma atividade de  
uma glicose desidrogenase que usa pirroloquinolina quinona como uma  
coenzima, mas a bactéria foi modificada de modo que a atividade da glicose  
desidrogenase seja reduzida.

(2) O método como mencionado acima, em que a atividade de

GCD é reduzida pela inativação de um gene *gcd* que codifica a glicose desidrogenase.

5 (3) O método como mencionado acima, em que o gene *gcd* é um DNA que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 2, ou uma variante desta.

(4) O método como mencionado acima, em que o L-aminoácido é selecionado do grupo que consiste de ácido L-glutâmico, L-lisina, L-treonina, L-arginina, L-histidina, L-isoleucina, L-valina, L-leucina, L-fenilalanina, L-tirosina, L-triptofano e L-cisteína.

10 (5) O método como mencionado acima, em que o L-aminoácido é o ácido L-glutâmico ou L-cisteína.

(6) O método como mencionado acima, em que o L-aminoácido é o ácido L-glutâmico, e a atividade ou atividades de um ou mais tipos de enzimas selecionadas do grupo que consiste de citrato sintase, metil citrato sintase, fosfoenolpiruvato carboxilase, e glutamato desidrogenase são intensificadas na bactéria.

20 (7) O método como mencionado acima, em que o L-aminoácido é L-cisteína, e a atividade ou atividades de uma ou mais selecionadas do grupo que consiste de 3-fosfoglicerato desidrogenase, serina acetiltransferase, e o sistema de transporte de sulfato/tiosulfato são intensificados, e/ou a expressão de um gene *yeaS* é intensificada.

25 (8) O método como mencionado acima, em que a bactéria é uma bactéria pertencente a um gênero selecionado dos gêneros *Pantoea*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Morganella*, e *Yersinia*.

#### Efeito da Invenção

Pelo uso do microorganismo da presente invenção, um L-aminoácido tal como ácido L-glutâmico, L-lisina, L-treonina, L-arginina, L-histidina, L-isoleucina, L-valina, L-leucina, L-treonina, L-fenilalanina, L-

tirosina, L-triptofano, ou L-cisteína pode ser eficientemente produzido pela fermentação.

#### Descrição Resumida dos Desenhos

5 A Fig. 1 mostra a estrutura do plasmídeo auxiliar RSF-Red-TER.

A Fig. 2 mostra a construção de plasmídeos auxiliares RSF-Red-TER.

A Fig. 3 mostra a sequência do promotor Pnlp.

#### Formas de Realização para Realizar a Invenção

10 Daqui por diante, a presente invenção será explicada em detalhes.

<1> A bactéria pertencente à família das *Enterobacteriaceae* usadas na presente invenção

15 A bactéria usada na presente invenção é uma bactéria pertencente à família das *Enterobacteriaceae*, que inerentemente tem a atividade de GCD, e tem uma capacidade para produzir L-aminoácido, e é uma bactéria que foi modificada de modo que a atividade de GCD fosse reduzida. A bactéria da presente invenção pode ser obtida modificando-se uma bactéria pertencente à família das *Enterobacteriaceae*, inerentemente  
20 tendo a atividade de GCD, e tendo uma capacidade para produzir L-aminoácido de modo que a atividade de GCD seja reduzida. Alternativamente, a bactéria da presente invenção também pode ser obtida comunicando-se uma capacidade para produzir L-aminoácido a uma bactéria que pertence à família das *Enterobacteriaceae*, e inerentemente tem a  
25 atividade de GCD, mas que foi modificada de modo que a atividade de GCD seja reduzida, ou intensificar a capacidade para produzir L-aminoácido de uma tal bactéria.

O tipo do L-aminoácido não é particularmente limitado, e os exemplos incluem aminoácidos básicos tais como L-lisina, L-ornitina, L-

arginina, L-histidina e L-citrulina, aminoácidos alifáticos tais como a L-isoleucina, L-alanina, L-valina, L-leucina e L-glicina, aminoácidos que sejam ácidos hidroximonoaminocarboxílicos tais como a L-treonina e a L-serina, aminoácidos cíclicos tais como a L-prolina, aminoácidos aromáticos tais como a L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano, aminoácidos contendo enxofre tais como a L-cisteína, L-cistina e L-metionina, e aminoácidos acídicos tais como o ácido L-glutâmico, o ácido L-aspártico, a L-glutamina e a L-asparagina. O ácido L-glutâmico, a L-lisina, a L-treonina e o L-triptofano são especialmente preferidos. O microorganismo da presente invenção pode ter a capacidade de produzir duas ou mais espécies de aminoácidos.

Na presente invenção, o termo “L-aminoácido” inclui L-aminoácidos na forma livre e sais destes, tais como sulfatos, cloridretos, carbonatos, sais de amônio, sais de sódio, e sais de potássio destes.

Na presente invenção, uma bactéria tendo uma capacidade para produzir L-aminoácido refere-se a uma bactéria tendo uma capacidade para produzir um L-aminoácido e excretá-lo em um meio, quando a bactéria é cultivada no meio. A bactéria é preferivelmente uma bactéria tal que possa acumular 0,5 g/L ou mais, mais preferivelmente 1,0 g/L ou mais, de um L-aminoácido alvo no meio.

As bactérias usadas como uma cepa precursora da bactéria da presente invenção a ser modificada de modo que a atividade de GCD seja reduzida, e métodos para comunicar ou intensificar uma capacidade para produzir L-aminoácido serão exemplificados abaixo.

#### <2-1> Bactéria da presente invenção

A bactéria da presente invenção é uma bactéria pertencente à família das *Enterobacteriaceae*.

A família das *Enterobacteriaceae* abrange bactérias pertencentes aos gêneros de *Escherichia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Photorhabdus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*,

*Morganella*, *Yersinia*, e assim por diante. Em particular, as bactérias classificadas na família *Enterobacteriaceae* de acordo com a taxonomia usada pela base de dados da NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=91347>)

5 são preferidas.

Uma “bactéria pertencente ao gênero *Escherichia*” significa que a bactéria é classificada no gênero *Escherichia* de acordo com a classificação conhecida por uma pessoa habilitada na técnica da microbiologia, embora a bactéria não seja particularmente limitada a estas. Os  
10 exemplos da bactéria pertencente ao gênero *Escherichia* incluem, mas não são limitados a, *Escherichia coli* (*E. coli*).

Os exemplos da bactéria pertencente ao gênero *Escherichia* incluem, por exemplo, as bactérias dos grupos descritos no trabalho de Neidhardt *et al.* (Neidhardt F. C. Ed., 1996, *Escherichia coli* and *Salmonella*:  
15 *Cellular and Molecular Biology*/Segunda Edição, pp. 2477-2483, Tabela 1, American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.). os exemplos específicos incluem a *Escherichia coli* W3110 (ATCC 27325), *Escherichia coli* MG1655 (ATCC 47076) derivadas da cepa protótipo do tipo selvagem K12, e assim por diante.

20 Estas cepas são disponíveis, por exemplo, da American Type Culture Collection (Endereço: P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, United States of America). Isto é, os números de acesso são dados a cada uma das cepas, e as cepas podem ser encomendadas usando-se estes números. Os números de acesso das cepas são listadas no catálogo da American Type  
25 Culture Collection.

Os exemplos das bactérias *Enterobacter* incluem, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes*, e assim por diante. Especificamente, as cepas exemplificadas na Patente Européia Aberta ao Público Nº 952221 podem ser usadas. Em anos recentes, algumas bactérias de

*Enterobacter agglomerans* foram reclassificadas como *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*, ou *Pantoea stewartii*, com base na análise de sequência de nucleotídeo do 16S rRNA etc. O microorganismo pode pertencer ao gênero *Enterobacter* ou *Pantoea* contanto que o microorganismo seja é classificado na família *Enterobacteriaceae*.

As cepas exemplares do gênero *Enterobacter* incluem a cepa *Enterobacter agglomerans* cepa ATCC 12287.

As cepas exemplares das bactérias *Pantoea* incluem *Pantoea ananatis*, *Pantoea stewartii*, *Pantoea agglomerans*, e *Pantoea citrea*. Os exemplos específicos incluem as seguintes cepas:

*Pantoea ananatis* AJ13355 (FERM BP-6614, Patente Européia Aberta ao Público Nº 0952221)

*Pantoea ananatis* AJ13356 (FERM BP-6615, Patente Européia Aberta ao Público Nº 0952221)

*Pantoea ananatis* AJ13601 (FERM BP-7207, Patente Européia Aberta ao Público Nº 0952221)

Embora estas cepas fossem identificadas e depositadas como *Enterobacter agglomerans* quando elas foram isoladas, elas são correntemente classificadas como *Pantoea ananatis* com base na análise de sequência de nucleotídeo do 16S rRNA etc., como descrito acima.

Os exemplos das bactérias *Erwinia* incluem *Erwinia amilovora* e *Erwinia carotovora*, e os exemplos das bactérias *Klebsiella* incluem *Klebsiella planticola*. Os exemplos específicos incluem as seguintes cepas:

*Erwinia amilovora* ATCC 15580

*Erwinia carotovora* ATCC 15713

*Klebsiella planticola* AJ13399 (FERM BP-6600, Patente Européia Aberta ao Público Nº 955368)

*Klebsiella planticola* AJ13410 (FERM BP-6617, Patente Européia Aberta ao Público Nº 955368).

A bactéria da presente invenção é uma tal enterobactéria como descrita acima, e é uma bactéria pertencente à família das *Enterobacteriaceae* que inerentemente tem a atividade de GCD e tem uma capacidade para produzir L-aminoácido. Uma enterobactéria inerentemente tendo a atividade de GCD significa uma bactéria da qual a cepa selvagem ou a cepa não modificada no gene *gcd* tem a atividade de GCD. Os exemplos de uma tal bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae* incluem bactérias pertencentes a um tal gênero como *Pantoea*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Morganella*, *Yersinia*, *Citrobacter*, e *Proteus*. Mais especificamente, os exemplos incluem as bactérias descritas em Int. J. Syst. Bacteriol., 39(1), 61-67, 1989.

Embora a *Escherichia coli* tenha um gene *gcd* e produza uma apoenzima GCD, ela não tem a capacidade de produzir PQQ. Portanto, ela não tem a atividade de GCD quando PQQ não é adicionada. Entretanto, é sabido que se um certo gene estranho é expressado, uma substância que substitui PQQ é gerada, e a atividade de GCD é expressada (WO2006/133898). Uma bactéria que usualmente não tem a atividade de GCD, mas em um estado que a mesma pode expressar a atividade de GCD como descrito acima, tal como bactérias *Escherichia*, é abrangida no escopo da “enterobactéria inerentemente tendo a atividade de GCD” aludida na presente invenção. A atividade de GCD será explicada mais tarde.

Daqui em diante, os métodos para comunicar uma capacidade para produzir L-aminoácido a tais bactérias como descritos acima, ou métodos para intensificar uma capacidade para produzir L-aminoácido de tais bactérias são descritos.

Para comunicar uma capacidade para produzir um L-aminoácido, métodos convencionalmente utilizados na criação de bactérias corineformes ou bactérias do gênero *Escherichia* (ver “Amino Acid Fermentation”, Gakkai Shuppan Center (Ltd.), 1ª Edição, publicado em 30 de

maio de 1986, pp. 77-100) podem ser usados. Tais métodos incluem a aquisição de um mutante auxotrófico, uma cepa resistente a análogo de L-aminoácido, ou um mutante de regulação metabólica, construção de uma cepa recombinante em que a expressão de uma biossíntese de L-aminoácido é intensificada, e assim por diante. Aqui, na criação de bactérias que produzem L-aminoácido, a uma ou mais propriedades tais como uma mutação auxotrófica, resistência de análogo, ou mutação de regulação metabólica podem ser comunicadas. A expressão da(s) enzima(s) da biossíntese de L-aminoácido pode ser intensificada sozinha ou em combinações de dois ou mais. Além disso, os métodos de comunicar propriedades tais como uma mutação auxotrófica, resistência de análogo, ou mutação de regulação metabólica podem ser combinadas com os métodos de intensificar a biossíntese de enzimas.

Uma cepa mutante auxotrófica, cepa resistente a análogo de L-aminoácido, ou cepa mutante de regulação metabólica com uma capacidade para produzir um L-aminoácido pode ser obtida submetendo-se uma cepa precursora ou cepa do tipo selvagem à mutagênese convencional, tal como exposição aos raios X ou irradiação de UV, ou tratamento com um mutagênico tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, etc., e depois selecionar aqueles que exibem autotrofia, resistência de análogo, ou uma mutação de regulação metabólica e que também têm uma capacidade para produzir um L-aminoácido.

Além disso, a comunicação ou realce de uma capacidade para produzir L-aminoácido também pode ser atingida pelo realce de uma atividade enzimática pela recombinação de gene. Um exemplo do método para intensificar uma atividade enzimática inclui, por exemplo, um método de modificar uma bactéria de modo que a expressão de um gene que codifica uma enzima envolvida na biossíntese de um L-aminoácido é intensificada. Como para o método para intensificar a expressão de um gene, o realce

também pode ser atingido pela introdução de um plasmídeo de amplificação preparado pela introdução de um fragmento de DNA contendo o gene em um plasmídeo apropriado, por exemplo, um vetor plasmídico contendo pelo menos o gene responsável pela replicação e proliferação do plasmídeo em um microorganismo, aumentando o número de cópia do gene no cromossoma pela conjugação, transferência ou semelhante, ou introduzindo uma mutação em uma região promotora do gene (consultar a Publicação de Patente Internacional WO95/34672).

Quando um gene objeto é introduzido no plasmídeo de amplificação anteriormente mencionado ou cromossoma, qualquer promotor pode ser usado para expressar o gene contanto que o mesmo funcione nas bactérias objeto. O promotor pode ser o promotor do próprio gene a ser usado, ou um promotor modificado. A quantidade de expressão do gene também pode ser controlado escolhendo-se adequadamente um promotor que é potente em bactérias corineformes, ou pela fabricação das regiões -35 e -10 do promotor mais próximo a uma sequência de consenso. Tais métodos de intensificar a expressão de um gene de enzima como descrito acima são descritos na Publicação de Patente Internacional WO00/18935, Patente Européia Aberta ao Público Nº 1010755, e assim por diante.

Daqui em diante, métodos específicos para comunicar uma capacidade para produzir L-aminoácido às bactérias e bactérias comunicadas com a capacidade para produzir L-aminoácido são exemplificados abaixo. Embora as seguintes descrições principalmente digam respeito às bactérias de *Escherichia*, os seguintes métodos também podem ser aplicados às enterobactérias usadas para a presente invenção.

#### Bactérias que produzem L-treonina

Os exemplos preferidos de microorganismos tendo capacidade de produzir L-treonina incluem bactérias em que uma ou mais atividades de enzimas do sistema de biossíntese da L-treonina são intensificadas. Os

exemplos de enzimas biossintéticas de L-treonina incluem a aspartocinase III (lysC), aspartate semialdeído desidrogenase (asd), aspartocinase I (thrA), homoserina cinase (thrB), treonina sintase (thrC) codificada pelo operon *thr*, e aspartato aminotransferase (aspartate transaminase) (aspC). Os nomes dos genes que codificam as respectivas enzimas são mencionados nos parênteses depois dos nomes das enzimas (o mesmo deve se aplicar por todo este relatório descritivo). Entre estas enzimas, a aspartate semialdeído desidrogenase, aspartocinase I, homoserina cinase, aspartato aminotransferase, e treonina sintase são exemplos particularmente preferidos.

Os genes que codificam as enzimas biossintéticas da L-treonina podem ser introduzidas em uma bactéria tendo uma capacidade reduzida para decompor treonina. Um exemplo de uma tal bactéria de *Escherichia* tendo uma capacidade reduzida para decompor treonina é a cepa TDH6 que é deficiente na atividade da treonina desidrogenase (Patente Japonesa Aberta ao Público Nº 2001-346578).

As atividades enzimáticas das enzimas biossintéticas de L-treonina são inibidas pelo produto final, L-treonina. Portanto, para construir cepas que produzam L-treonina, é desejável que os genes para as enzimas biossintéticas de L-treonina sejam modificadas de modo que as enzimas sejam dessensibilizadas à inibição de retroalimentação pela L-treonina nas cepas que produzem L-treonina. Os genes *thrA*, *thrB*, e *thrC* anteriormente mencionados constituem o operon da treonina, que forma uma estrutura atenuadora. A expressão do operon da treonina é inibido pela isoleucina e treonina no meio de cultura e também suprimido pela atenuação. Portanto, o operon da treonina pode ser modificado pela remoção da sequência líder na região de atenuação ou no atenuador (reportar-se a Lynn, S. P., Burton, W. S., Donohue, T. J., Gould, R. M., Gumport, R. L, e Gardner, J. F., *J. Mol. Biol.* 194: 59-69 (1987); WO02/26993; WO2005/049808).

O promotor nativo do operon da treonina está presente a

montante do operon da treonina, e pode ser substituído com um promotor não nativo (consultar a WO98/04715), ou um operon da treonina foi modificado de modo que a expressão do gene da biossíntese da treonina fosse controlada pelo repressor e o promotor do fago  $\lambda$  pode ser construído (Patente Européia N<sup>o</sup> 0593792). Além disso, de modo a modificar uma bactéria de modo que ela seja dessensibilizada para a inibição da retroalimentação pela L-treonina, uma cepa resistente ao ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxiisovalérico (AHV) pode ser selecionada.

É preferível que o número de cópia do operon da treonina que é modificado para dessensibilizar a inibição da retroalimentação pela L-treonina possa ser aumentado, ou a expressão do operon da treonina possa ser aumentado ligando-o a um promotor potente em um hospedeiro. O número de cópia também pode ser aumentado, além da amplificação usando um plasmídeo, pela transferência do operon da treonina para um genoma usando um transposon, fago Mu, ou semelhante.

Além de aumentar a expressão dos genes biossintéticos da L-treonina, a expressão dos genes envolvidos no caminho glicolítico, ciclo de TCA, ou cadeia respiratória, dos genes que regulam a expressão destes genes, ou dos genes envolvidos na captação do açúcar também pode ser preferivelmente aumentada. Os exemplos de tais genes incluem os genes que codificam a transidrogenase (pntAB, Patente Européia N<sup>o</sup> 733712), fosfoenolpiruvato carboxilase (pepC, WO95/06114), fosfoenolpiruvato sintase (pps, Patente Européia N<sup>o</sup> 877090), e um gene que codifica a piruvato carboxilase a partir da bactéria corineforme ou bactéria de *Bacillus* (WO99/18228, Patente Européia Aberta ao Público N<sup>o</sup> 1092776 A).

É preferido que a expressão de um gene que comunica resistência à L-treonina ou L-homosserina seja intensificada, ou a resistência à L-treonina ou L-homosserina seja comunicada a um hospedeiro. Os exemplos destes genes incluem o gene *rhtA* (Livshits, V. A. *et al.*, 2003, Res.

Microbiol., 154: 123-135), *rhtB* (Patente Européia Aberta ao Público N<sup>o</sup> 0994190), gene *rhtC* (Patente Européia Aberta ao Público N<sup>o</sup> 1013765), genes *yfiK*, e *yeaS* (Patente Européia Aberta ao Público N<sup>o</sup> 1016710). Os métodos para comunicar resistência à L-treonina a um hospedeiro são descritos na Patente Européia Aberta ao Público N<sup>o</sup> 0994190 e WO90/04636.

Os exemplos de bactérias que produzem L-treonina e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar tais bactérias incluem, porém sem limitar, as cepas pertencentes ao gênero *Escherichia*, tais como *E. coli* TDH-6/pVIC40 (VKPM B-3996) (Patentes U.S. n<sup>os</sup> 5.175.107, Patentes U.S. n<sup>os</sup> 5.705.371), *E. coli* 472T23/pYN7 (ATCC 98081) (Patente U.S. n<sup>o</sup> 5.631.157), *E. coli* NRRL-21593 (Patente U.S. n<sup>o</sup> 5.939.307), *E. coli* FERM BP-3756 (Patente U.S. n<sup>o</sup> 5.474.918), *E. coli* FERM BP-3519 e FERM BP-3520 (Patente U.S. no 5.376.538), *E. coli* MG442 [Gusyatiner *et al.*, *Genetika* (em Russo), 14, 947-956 (1978)], *E. coli* VL643 e VL2055 (Patente Européia Aberta ao Público n<sup>o</sup> 1149911), e assim por diante.

A cepa TDH-6 é deficiente no gene *thrC*, bem como assimilativa a sacarose, e o seu gene *ilvA* tem uma mutação permeável. Esta cepa também tem uma mutação no gene *rhtA*, que comunica resistência à alta concentração de treonina ou de homoserina. A cepa B-3996 contém o plasmídeo pVIC40, que foi obtido pela inserção de o operon *thrA\*BC* que inclui um gene mutante *thrA* no vetor originado de RSF1010. Este gene mutante *thrA* codifica a homoserina aspartocinase desidrogenase I que é substancialmente dessensibilizado pela inibição da retroalimentação pela treonina. A cepa B-3996 foi depositada em 19 de novembro de 1987 no All-Union Scientific Center of Antibiotics (Nagatinskaya Street 3-A, 117105, Moscou, Rússia) sob o número de acesso RIA 1867. A cepa também foi depositada na Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscou, 117545, Rússia) em 7 de abril de 1987, sob o número de acesso VKPM B-3996.

A *E. coli* VKPM B-5318 (Patente Européia nº 0593792) também pode ser usada como uma bactéria que produz L-treonina ou uma cepa precursora para originá-la. A cepa B-5318 é prototrófica com respeito à isoleucina, e um repressor de fago lambda C1 sensível à temperatura e o promotor PR substitui a região reguladora do operon da treonina no plasmídeo pVIC40. A cepa VKPM B-5318 foi depositada como um depósito internacional na Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscou, 117545, Rússia) em 3 de maio de 1990, sob o número de acesso VKPM B-5318.

O gene *thrA* que codifica a homoserina aspartocinase desidrogenase I de *Escherichia coli* foi elucidado (posições dos nucleotídeos 337 a 2799, acesso do GenBank NC\_000913.2, gi: 49175990). O gene *thrA* está localizado entre os genes *thrL* e *thrB* no cromossoma de *E. coli* K-12. O gene *thrB* que codifica a homoserina cinase de *Escherichia coli* foi esclarecido (posições dos nucleotídeos 2801 a 3733, acesso do GenBank NC\_000913.2, gi: 49175990). O gene *thrB* está localizado entre os genes *thrA* e *thrC* no cromossoma de *E. coli* K-12. O gene *thrC* que codifica a treonina sintase de *Escherichia coli* foi esclarecido (posições dos nucleotídeos 3734 a 5020, acesso do GenBank NC\_000913.2, gi: 49175990). O gene *thrC* está localizado entre o gene *thrB* e a matriz de leitura aberta *yaaX* no cromossoma de *E. coli* K-12. Todos os três genes funcionam como um operon de treonina único. Para intensificar a expressão do operon da treonina, a região atenuadora que afeta a transcrição é desejavelmente removida do operon (WO 2005/049808, WO 2003/097839).

Um gene mutante *thrA*, que codifica a homoserina aspartocinase desidrogenase um resistente à inibição da retroalimentação pela treonina, bem como os genes *thrB* e *thrC*, podem ser obtidos como um operon do bem conhecido plasmídeo pVIC40 que se acha presente na cepa VKPM B-3996 de *E. coli* produtora da treonina. O plasmídeo pVIC40 é descrito em

detalhes na Patente U.S. nº 5.705.371.

O gene *rhtA* está presente em 18 min sobre o cromossoma de *E. coli* perto do operon *glnHPQ*, o qual codifica os componentes do sistema de transporte da glutamina. O gene *rhtA* é idêntico ao ORF1 (gene *ybiF*, posições dos nucleotídeos 764 a 1651, número de acesso do GenBank AAA218541, gi:440181) e está localizado entre os genes *pexB* e *ompX*. A unidade expressando uma proteína codificada pelo ORF1 foi designada como o gene *rhtA* (rht: resistência às homosserina e treonina). Igualmente, foi revelado que a mutação de *rhtA23* é uma substituição G-por-A na posição -1 em relação ao códon de partida ATG (EXTRATOS do 17º Congresso Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular em combinação com o Encontro Anual da American Society for Biochemistry and Molecular Biology, São Francisco, Califórnia, em 24 a 29 de agosto de 1997, extrato nº 457, Patente Européia Aberta ao Público nº 1013765).

O gene *asd* de *E. coli* já foi esclarecido (posições dos nucleotídeos 3572511 a 3571408, acesso do GenBank NC\_000913.1, gi:16131307), e pode ser obtido por PCR [reação em cadeia da polimerase; referir-se a White, T. J. *et al.*, *Trends Genet.*, 5, 185 (1989)] utilizando os iniciadores preparados com base na sequência de nucleotídeos do gene. Os genes *asd* de outros microorganismos podem ser obtidos de uma maneira semelhante.

Igualmente, o gene *aspC* de *E. coli* já foi elucidado (posições dos nucleotídeos 983742 a 984932, acesso do GenBank NC\_000913.1, gi:16128895), e pode ser obtido por PCR. Os genes *aspC* de outros microorganismos podem ser obtidos de uma maneira semelhante.

#### BACTÉRIAS PRODUTORAS DA L-LISINA

Exemplos de bactérias produtoras da L-lisina, pertencentes ao gênero *Escherichia*, incluem mutantes tendo resistência a um análogo da L-lisina. O análogo da L-lisina inibe o crescimento de bactérias pertencentes ao

gênero *Escherichia*, porém esta inibição é completa ou parcialmente dessensibilizada quando a L-lisina está presente no meio. Exemplos do análogo da L-lisina incluem, porém sem limitar, a oxalisina, o hidroxamato de lisina, a S-(2-aminoetil)-L-cisteína (AEC), a  $\gamma$ -metil-lisina, a  $\alpha$ -clorocaprolactama, e assim por diante. Os mutantes que têm resistência a estes análogos da lisina podem ser obtidos submetendo-se as bactérias pertencentes ao gênero *Escherichia* a um tratamento de mutagênese artificial convencional. Exemplos específicos de cepas bacterianas úteis para produzir a L-lisina incluem a *Escherichia coli* AJ11442 (FERM BP-1543, NRRL B-12185; ver a Patente U.S. nº 4.346.170) e *Escherichia coli* VL611. Nestes microorganismos, a inibição de retroalimentação da aspartocinase pela L-lisina é dessensibilizada.

Exemplos de bactérias produtoras de L-lisina e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar bactérias que produzem L-lisina também incluem cepas em que a expressão de um ou mais genes codificando uma enzima biossintética de L-lisina é intensificada. Exemplos de tais enzimas incluem, porém sem limitar, a diidrodipicolinato sintase (*dapA*), a aspartocinase (*lysC*), a diidrodipicolinato redutase (*dapB*), diaminopimelato descarboxilase (*lysA*), diaminopimelato desidrogenase (*ddh*) (Patente U.S. no 6.040.160), a fosfoenolpiruvato carboxilase (*ppc*), aspartato semialdeído desidrogenase (*asd*), diaminopimelato epimerase (*dapF*), tetraidrodipicolinato succinilase (*dapD*), succinil diaminopimelato desacilase (*dapE*), e aspartase (*aspA*) (Patente Européia Aberta ao Público Nº 1253195). Entre estas enzimas, a diidrodipicolinato redutase, diaminopimelato descarboxilase, diaminopimelato desidrogenase, fosfoenolpiruvato carboxilase, aspartato aminotransferase, diaminopimelato epimerase, aspartato semialdeído desidrogenase, tetraidrodipicolinato succinilase, e succinil diaminopimelato desacilase são particularmente preferidas. Além disso, as cepas precursoras podem expressar níveis aumentado do gene envolvido na eficiência de energia

(*cyo*) (Patente Européia Aberta ao Público nº 1170376), do gene codificando a nucleotídeo nicotinamida transidrogenase (*pntAB*) (Patente U.S. nº 5.830.716), o gene *ybjE* (WO 2005/073390), ou combinações destes.

Exemplos de cepas precursoras que podem ser usadas para derivar bactérias produtoras de L-lisina também incluem as cepas com atividade reduzida ou eliminada de uma enzima que catalise uma reação para gerar um composto outro que não a L-lisina pela ramificação da via biossintética da L-lisina. Exemplos das enzimas que catalisam uma reação para gerar um composto outro que não a L-lisina mediante ramificação da via biossintética da L-lisina, incluem a homosserina desidrogenase, a lisina descarboxilase (Patente U.S. nº 5.827.698), e a enzima málica (WO 2005/010175).

Os exemplos preferidos de bactérias que produzem L-lisina incluem *Escherichia coli* WC196 $\Delta$ cadA $\Delta$ ldc/pCABD2 (WO2006/078039). A cepa foi construída pela introdução do plasmídeo pCABD2 descrito na Patente U.S. Nº 6.040.160 na cepa WC196 tendo rompido os genes *cadA* e *ldcC*, que codificam a lisina descarboxilase. A cepa WC196 foi cruzada a partir da cepa W3110, que foi derivada de *Escherichia coli* K-12, pela substituição do gene *lysC* do tipo selvagem no cromossoma da cepa W3110 com um gene *lysC* mutante que codifica uma aspartocinase III mutante em que a treonina na posição 352 foi substituída com isoleucina, resultando na dessensibilização da sua inibição da retroalimentação pela L-lisina (Patente U.S. Nº 5.661.012), e conferindo resistência a AEC à cepa resultante (Patente U.S. Nº 5.827.698). A cepa WC196 foi designada *Escherichia coli* AJ13069, depositada no National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology (correntemente National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukubashi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japão) em 6 de dezembro de 1994, e designado

com um número de acesso de FERM P-14690. depois, o mesmo foi convertido a um depósito internacional sob as condições do Tratado de Budapest em 29 de setembro de 1995, e designado com um número de acesso de FERM BP-5252 (Patente U.S. Nº 5.827.698). A cepa WC196 $\Delta$ cadA $\Delta$ ldc por si só também é uma bactéria produtora de L-lisina preferida. O plasmídeo pCABD2 contém um gene *dapA* mutante derivado da *Escherichia coli* e que codifica uma diidro-dipicolinato sintase (DDPS) tendo uma mutação para a dessensibilização para a inibição da retroalimentação pela L-lisina, um gene *lysC* mutante derivado da *Escherichia coli* e que codifica a aspartocinase III tendo uma mutação para a dessensibilização para a inibição da retroalimentação pela L-lisina, o gene *dapB* derivado da *Escherichia coli* e que codifica a diidro-dipicolinato redutase, e o gene *ddh* derivado da *Brevibacterium lactofermentum* e que codifica a diaminopimelato desidrogenase.

15 Bactérias que produzem L-cisteína

A capacidade para produzir L-cisteína de uma bactéria pode ser melhorada intensificando-se a atividade de uma enzima do caminho da biossíntese da L-cisteína ou uma enzima envolvida na produção de um composto que serve como um substrato deste caminho tal como L-serina, por exemplo, a 3-fosfoglicerato desidrogenase, serina acetiltransferase, e assim por diante. A 3-fosfoglicerato desidrogenase é submetida à inibição da retroalimentação pela serina, e portanto a atividade desta enzima pode ser intensificada pela incorporação de um gene *serA* mutante que codifica uma 3-fosfoglicerato desidrogenase mutante para a qual a inibição da retroalimentação é atenuada ou eliminada em uma bactéria.

25 Além disso, a serina acetiltransferase é submetida à inibição da retroalimentação pela L-cisteína. Portanto, a atividade desta enzima pode ser intensificada pela incorporação de um gene *cysE* mutante que codifica uma serina acetiltransferase para a qual a inibição da retroalimentação é atenuada

ou eliminada em uma bactéria. Como o gene que codifica SAT de *Escherichia coli*, *cycE* foi clonado a partir de uma cepa do tipo selvagem e uma cepa mutante de excreção de L-cisteína, e a sua sequência de nucleotídeo foi elucidada (Denk, D. e Boeck, A., J. General Microbiol., 133, 515-525 (1987)). A sequência de nucleotídeo e a sequência de aminoácido codificada pela sequência de nucleotídeo são mostradas nas SEQ ID NOS: 37 e 38.

A capacidade de produzir L-cisteína também pode ser melhorada intensificando-se a atividade do sistema de transporte de sulfato/tiosulfato. O grupo da proteína do sistema de transporte de sulfato/tiosulfato é codificado pelo grupo de gene *cysPTWAM* (Patente Japonesa Aberta ao Público Nº 2005-137369, Patente Européia Nº 1528108).

A capacidade de produzir L-cisteína de uma bactéria também pode ser melhorada aumentando-se a expressão do gene *yeaS* (Patente Européia Aberta ao Público Nº 1016710). A sequência de nucleotídeo do gene *yeaS* e a sequência de aminoácido codificada pelo gene são mostrados nas SEQ ID NOS: 39 e 40, respectivamente. É sabido que as bactérias usam vários códons tais como GTG além de ATG como o códon de partida (<http://depts.washington.edu/agro/genomes/students/stanstart.htm>). Embora o aminoácido que corresponde ao códon inicial gtg é indicado como Val nas SEQ ID NOS: 39 e 40, é altamente possível que o mesmo seja realmente Met.

Os exemplos específicos de bactérias de *Escherichia* tendo capacidade de produzir L-cisteína e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar tais bactérias incluem, mas não limitadas a, bactérias *Escherichia* tais como *E. coli* JM15 transformada com alelos de gene *cysE* diferentes que codificam a serina acetiltransferase resistente à inibição da retroalimentação (Patente U.S. Nº 6.218.168, Pedido de Patente Russa Nº 2003121601), *E. coli* W3110 na qual um gene que codifica uma proteína responsável pela excreção de substâncias citotóxicas é superexpressado (Patente U.S. Nº 5.972.663), a cepa da *E. coli* tendo atividade da cisteína dessulfidrase diminuída (Patente

Japonesa Aberta ao Público Nº 11-155571), e *E. coli* W3110 na qual a atividade do fator de controle transcricional positivo do regulon da cisteína codificada pelo gene *cysB* é aumentado (WO01/27307).

5 A capacidade de produzir L-cisteína de uma bactéria pode ser melhorada pela modificação da bactéria de modo que a atividade da proteína codificada por *yhaM* (daqui em diante também aludido como “YhaM”) seja diminuída. O gene *yhaM* é o mesmo como os genes ECK3099, b4470 e *yhaN*, e também foi chamado de b3109 ou b3108 no passado.

10 Os exemplos de bactérias *Pantoea* tendo capacidade de produzir L-cisteína incluem uma cepa de *Pantoea ananatis* modificada de modo que a atividade de cisteína dessulfidrase seja reduzida, e uma cepa de *Pantoea ananatis* tendo um gene que codifica uma serina acetiltransferase mutante para a qual a inibição da retroalimentação pela L-cisteína é reduzida. Os exemplos de cepas precursoras para a criação de tais bactérias que  
15 produzem L-cisteína incluem a cepa de *Pantoea ananatis* AJ13355, a cepa SC17, e a cepa SC17(0). A cepa AJ13355 é uma cepa isolada do solo em Iwata-shi, Shizuoka-ken, Japão como uma cepa que pode proliferar em um meio de pH baixo contendo ácido L-glutâmico e uma fonte de carbono, e a cepa SC17 é uma cepa selecionada como uma cepa mutante que produz  
20 phlegm baixo a partir da cepa AJ13355 (Patente U.S. Nº 6.596.517). A cepa AJ13355 de *Pantoea ananatis* foi depositada no National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry (correntemente, o National Institute of Advanced Industrial Science and Technology,  
25 International Patent Organism Depository, Address: Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japão) em 19 de fevereiro de 1998 e designada com um número de acesso de FERM P-16644. a mesma foi depois convertida a um depósito internacional sob as condições do Tratado de Budapest em 11 de janeiro de 1999 e designado com um

número de acesso de FERM BP-6614. A cepa SC17(0) é uma cepa construída como uma cepa resistente ao produto de gene  $\lambda$  Red para realizar o rompimento do gene na *Pantoea ananatis* (consultar o Exemplo de Referência 1).

5                   À cepa SC17 foi dado um número privado de AJ416, e depositada no National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Internacional Patent Organism Depository (address: Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japão) em 4 de fevereiro de 2009 como um depósito internacional, e designado com  
10 um número de acesso de FERM BP-11091. A cepa SC17(0) foi depositada na Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM), GNI Genetika (address: Rússia, 117545 Moscou, 1 Dorozhny proezd. 1) em 21 de setembro de 2005 com um número de acesso de VKPM B-9246.

Uma parte da L-cisteína produzida por uma bactéria pode  
15 mudar em L-cistina em um meio pela formação de ligação de dissulfeto. Além disso, como descrito mais tarde, a S-sulfocisteína pode ser gerada pela reação de L-cisteína e ácido tiossulfúrico contidos no meio (Szczepkowski T. W., Nature, vol. 182 (1958)). Além disso, a L-cisteína gerada nas células bacterianas pode ser condensada com uma cetona, aldeído, ou, por exemplo,  
20 ácido pirúvico, que existe nas células, para produzir um derivado de tiazolidina via um hemitiocetal como um intermediário (consultar a Patente Japonesa Nº 2992010). Este derivado de tiazolidina e hemitiocetal pode existir como uma mistura equilibrada. Portanto, a capacidade de produzir L-cisteína não é limitada à capacidade para acumular apenas L-cisteína em um  
25 meio ou células, mas também inclui uma capacidade para acumular, além de L-cisteína, L-cistina ou um derivado desta tal como S-sulfocisteína, um derivado de tiazolidina, ou um hemitiocetal ou uma mistura destes no meio.

#### BACTÉRIAS PRODUTORAS DA L-LEUCINA

Os exemplos de bactérias que produzem L-leucina e as cepas

precursoras para originar bactérias produtoras da L-leucina incluem, sem limitar, as cepas pertencentes ao gênero *Escherichia*, tais como as cepas de *E. coli* resistentes à leucina [por exemplo, a cepa 57 (VKPM B-7386, Patente U.S. nº 6.124.121)] ou análogos de leucina incluindo  $\beta$ -2-tienilalanina, 3-hidroxicoleucina, 4-azaleucina, 5,5,5-trifluoroleucina (Publicação da Patente Japonesa nº 62-34397 e a Patente Japonesa Aberta ao Público nº 8-70879); as cepas de *E. coli* obtidas pelo método de engenharia genética descrito na WO 96/06926; *E. coli* H-9068 (Patente Japonesa Aberta ao Público nº 8-70879), e assim por diante.

10                   A bactéria usada para a presente invenção pode ser melhorada mediante a intensificação da expressão de um ou mais genes envolvidos na biossíntese da L-leucina. Exemplos de tais genes incluem os genes do operon *leuABCD*, um exemplo típico do qual é um gene mutante *leuA* codificando a isopropilmalato sintase dessensibilizada para a inibição da retroalimentação pela L-leucina (Patente U.S. nº 6.403.342). Além disso, a bactéria usada para  
15 a presente invenção pode ser melhorada pela intensificação da expressão de um ou mais genes codificando as proteínas que excretam o L-aminoácido da célula bacteriana. Exemplos de tais genes incluem os genes *B2682* e *b2683* (genes *ygaZH*) (Patente Européia Aberta ao Público nº 1239041 A2).

## 20                   BACTÉRIAS PRODUTORAS DA L-HISTIDINA

Os exemplos de bactérias produtoras da L-histidina e as cepas precursoras para originar bactérias produtoras da L-histidina incluem, sem limitar, as cepas pertencentes ao gênero *Escherichia*, tais como a cepa de *E. coli* 24 (VKPM B-5945, RU2003677); a cepa de *E. coli* 80 (VKPM B-7270, RU2119536); *E. coli* NRRL B-12116 a B12121 (Patente U.S. nº 4.388.405);  
25 *E. coli* H-9342 (FERM BP-6675) e H-9343 (FERM BP-6676) (Patente U.S. nº 6.344.347); *E. coli* H-9341 (FERM BP-6674) (Patente Européia nº 1085087); *E. coli* AI80/pFM201 (Patente U.S. nº 6.258.554) e assim por diante.

Os exemplos de bactérias produtoras da L-histidina e cepas precursoras para originar bactérias produtoras da L-histidina também incluem as cepas em que a expressão de um ou mais genes codificando uma enzima biossintética de L-histidina é intensificada. Exemplos de tais genes incluem os genes que codificam ATP fosforribosiltransferase (*hisG*), fosforribosil AMP ciclohidrolase (*hisI*), fosforribosil-ATP pirofosfohidrolase (*hisIE*), fosforribosil-formimino-5-aminoimidazol carboxamida ribotídeo isomerase (*hisA*), amido-transferase (*hisH*), histidinol fosfato aminotransferase (*hisC*), histidinol fosfatase (*hisB*), histidinol desidrogenase (*hisD*), e assim por diante.

É conhecido o fato de que enzimas biossintéticas de L-histidina codificadas por *hisG* e *hisBHAFI* são inibidas pela L-histidina e, portanto, uma capacidade de produzir L-histidina pode também ser eficientemente intensificada pela introdução de uma mutação conferindo resistência à inibição da retroalimentação no gene de fosforribosiltransferase ATP (*hisG*) (Patentes Russas nºs 2003677 e 2119536).

Exemplos específicos das cepas que tenham uma capacidade de produzir L-histidina incluem *E. coli* FERM P-5038 e 5048 que tenham sido introduzidas com um vetor carregando um DNA codificando uma enzima biossintética de L-histidina (Patente Japonesa Aberta ao Público nº 56-005099), as cepas de *E. coli* introduzidas com um gene para uma exportação de aminoácido (Patente Européia Aberta ao Público nº 1016710), a cepa de 80 doada com sulfaguanidina, DL-1,2,4-triazol-3-alanina, e resistência à estreptomicina (VKPM B-7270, Patente Russa nº 2119536), e assim por diante.

Bactérias que produzem ácido L-glutâmico

Os exemplos de bactérias que produzem o ácido L-glutâmico e as cepas precursoras para derivar bactérias que produzem o ácido L-glutâmico incluem, mas não são limitados às, cepas pertencentes ao gênero *Escherichia*, tal como *E. coli* VL334thrC<sup>+</sup> (Patente Européia Nº 1172433). A *E. coli*

VL334 (VKPM B-1641) é uma cepa auxotrófica em L-isoleucina e L-treonina tendo mutações nos genes *thrC* e *ilvA* (Patente U.S. Nº 4.278.765). Um alelo do tipo selvagem do gene *thrC* foi transferido pelo método de transdução geral usando um bacteriófago P1 cultivado nas células do tipo selvagem da cepa K12 da *E. coli* (VKPM B-7). Como um resultado, uma cepa auxotrófica em L-isoleucina VL334*thrC*<sup>+</sup> (VKPM B-8961) foi obtida.

Os exemplos de bactérias que produzem o ácido L-glutâmico e cepa precursoras para derivar bactérias que produzem o ácido L-glutâmico também incluem, mas não são limitados a, cepas em que a atividade de um ou mais de uma enzima biossintética do ácido L-glutâmico é intensificada. Os exemplos de tais genes incluem os genes que codificam a glutamato desidrogenase (*gdhA*), glutamina sintetase (*glnA*), glutamato sintetase (*gltAB*), isocitrato desidrogenase (*icdA*), aconitato hidratase (*acnA*, *acnB*), citrato sintase (*gltA*), metil citrato sintase (*prpC*), fosfoenolpiruvato carboxilase (*ppc*), piruvato desidrogenase (*aceEF*, *lpdA*), piruvato cinase (*pykA*, *pykF*), fosfoenolpiruvato sintase (*ppsA*), enolase (*eno*), fosfogliceromutase (*pgmA*, *pgmI*), fosfoglicerato cinase (*pgk*), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gapA*), triose fosfato isomerase (*tpiA*), frutose bisfosfato aldolase (*fbp*), fosfofrutocinase (*pfkA*, *pfkB*), glicose fosfato isomerase (*pgi*), e assim por diante. Entre estas enzimas, a glutamato desidrogenase, citrato sintase, fosfoenolpiruvato carboxilase, e metil citrato sintase são preferidas.

Os exemplos de cepas que foram modificadas de modo que a expressão do gene da citrato sintase, do gene da fosfoenolpiruvato carboxilase, e/ou do gene da glutamato desidrogenase seja intensificada incluem aqueles divulgados na Patentes Europeias Abertas ao Público N<sup>os</sup> 1078989, 955368, e 952221.

A capacidade para sintetizar o ácido L-glutâmico de uma bactéria pode ser melhorada intensificando-se a atividade de um enzima

envolvida na cadeia respiratória, por exemplo, uma enzima que oxida o terminal de respiração resistente a ciano (cioA, cioB).

Os exemplos de bactérias que produzem o ácido L-glutâmico e as cepa precursoras para derivar bactérias que produzem o ácido L-glutâmico também incluem as cepas em que a atividade de uma enzima que catalisa a síntese de um composto outro que não o ácido L-glutâmico pelo direcionamento da síntese fora do caminho biossintético do ácido L-glutâmico, ou a atividade de uma enzima que catalisa uma reação de decomposição ou consumo do ácido L-glutâmico, é reduzida ou eliminada. Os exemplos destas enzimas incluem a isocitrato liase (aceA),  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase (sucA), fosfotransacetilase (pta), acetato cinase (ack), acetohidróxi ácido sintase (ilvG), acetolactato sintase (ilvI), formiato acetiltransferase (pfl), lactato desidrogenase (ldh), glutamato descarboxilase (gadAB),  $\gamma$ -glutamil transferase (ggt),  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase (gshA),  $\gamma$ -glutamilputrescina sintetase (ycjK), e assim por diante. As bactérias de *Escherichia* sem a atividade da  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase ou com atividade de  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase reduzida e métodos para obter tais bactérias são descritos nas Patentes U.S. N<sup>os</sup> 5.378.616 e 5.573.945.

Especificamente, estas cepas incluem as seguintes:

20 *E. coli* W3110sucA::Km<sup>r</sup>  
*E. coli* AJ12624 (FERM BP-3853)  
*E. coli* AJ12628 (FERM BP-3854)  
*E. coli* AJ12949 (FERM BP-4881)

25 A *E. coli* W3110sucA::Km<sup>r</sup> é obtida pelo rompimento do gene da  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase (daqui em diante também aludido como o “gene *sucA*”) da *E. coli* W3110. Esta cepa é completamente deficiente em  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase.

Outros exemplos da bactéria que produz o ácido L-glutâmico incluem bactérias *Escherichia* que são resistentes a um antimetabólito do

ácido aspártico. Estas cepas também podem ser deficientes na  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase e incluem, por exemplo, *E. coli* AJ13199 (FERM BP-5807) (Patente U.S. Nº 5.908.768), FFRM P-12379, que adicionalmente é diminuída em uma atividade para decompor o ácido L-glutâmico (Patente U.S. Nº 5.393.671); AJ13138 (FERM BP-5565) (Patente U.S. Nº 6.110.714), e assim por diante.

Os exemplos de bactéria que produz o ácido L-glutâmico de *Pantoea ananatis* incluem a cepa AJ13355 da *Pantoea ananatis* descrita acima.

10 Além disso, os exemplos de uma bactéria que produz o ácido L-glutâmico de *Pantoea ananatis* também incluem bactérias *Pantoea* deficientes na atividade de  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase ( $\alpha$ KGDH) ou tendo a atividade de  $\alpha$ KGDH reduzida. Os exemplos de uma tal cepa incluem AJ13356 (Patente U.S. Nº 6.331.419), que foi derivada pela deleção do gene da subunidade  $\alpha$ KGDH-E1 (*sucA*) em AJ13355, e a cepa SC17sucA (Patente U.S. Nº 6.596.517) que também não tem o gene *sucA*, e foi selecionada de AJ13355 quanto as suas propriedades de produção de *phlegm* baixa. A cepa AJ13356 foi depositada no National Institute of Bioscience and Human-  
20 Technology, Agency of Industrial Science and Technology (correntemente, a agência administrativa independente, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depository (Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japão, código postal: 305-8566)) em 19 de fevereiro de 1998, e designada com um número de acesso de FERM P-16645. Depois, o depósito foi convertido em  
25 um depósito internacional sob as condições do Tratado de Budapest em 11 de janeiro de 1999, e designado com um número de acesso de FERM BP-6616. Embora as cepas AJ13355 e AJ13356 fossem depositadas no depositário anteriormente mencionado como *Enterobacter agglomerans*, elas são aludidas como *Pantoea ananatis* neste relatório descritivo. À cepa SC17sucA foi

designado o número privado de AJ417, e depositada no National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depository em 26 de fevereiro de 2004, sob um número de acesso de FERM BP-08646.

5 Os exemplos de bactérias *Pantoea ananatis* que produzem o ácido L-glutâmico incluem ainda as cepas SC17sucA/RSFCPG+pSTVCB, AJ13601, NP106, e NA1. A cepa SC17sucA/RSFCPG+pSTVCB foi obtida pela introdução do plasmídeo RSFCPG contendo o gene da citrato sintase (gltA), o gene da fosfoenolpiruvato carboxilase (ppsA), e o gene da glutamato desidrogenase (gdhA) derivada da *Escherichia coli*, e o plasmídeo pSTVCB  
10 contendo o gene da citrato sintase (gltA) derivado da *Brevibacterium lactofermentum*, na cepa SC17sucA. A cepa AJ13601 foi selecionada da cepa SC17sucA/RSFCPG+pSTVCB quanto a sua resistência à alta concentração do ácido L-glutâmico em um pH baixo. Além disso, a cepa NP106 foi  
15 derivada da cepa AJ13601 pela eliminação do plasmídeo RSFCPG+pSTVCB. A cepa AJ13601 foi depositada no National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depository (Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japão, código postal: 305-8566) em 18 de agosto de 1999, e designado o número de acesso  
20 FERM P-17516. depois, o depósito foi convertido em um depósito internacional sob as condições do Tratado de Budapest em 6 de julho de 2000, e designado um número de acesso FERM BP-7207. Além disso, a cepa NP106 tendo RSFPFG na qual o gene *gltA* de RSFCPG mencionado acima é substituído com *prpC* (consultar a WO2008/020654, os exemplos  
25 mencionado mais tarde) também é uma bactéria que produz o ácido L-glutâmico preferida.

#### Bactérias que produzem L-fenilalanina

Os exemplos de bactérias que produzem L-fenilalanina e as cepas precursoras que podem ser usadas para derivar bactérias que produzem

L-fenilalanina incluem, mas não são limitadas a, cepas bacterianas da *Escherichia*, tais como *E. coli* AJ12739 (tyrA::Tn10, tyrR) (VKPM B-8197) que carece da corismato mutase-prefenato desidrogenase e o repressor da tirosina (WO03/044191), *E. coli* HW1089 (ATCC 55371) que contém um gene *pheA34* tipo mutante que codifica a corismato mutase-prefenato desidratase tendo sido mutada para ser dessensibilizada para a inibição da retroalimentação (Patente U.S. Nº 5.354.672), *E. coli* MWEC101-b (KR8903681), *E. coli* NRRL B-12141, NRRL B-12145, NRRL B-12146, e NRRL B-12147 (Patente U.S. Nº 4.407.952). Também, as seguintes cepas podem ser usadas para derivar bactérias que produzem L-fenilalanina: *E. coli* K-12 [W3110(tyrA)/pPHAB (FERM BP-3566) que contém genes que codificam a corismato mutase-prefenato desidratase tendo sido mutada para ser dessensibilizada para a inibição da retroalimentação, *E. coli* K-12 [W3110(tyrA)/pPHAD] (FERM BP-12659), *E. coli* K-12 [W3110(tyrA)/pPHATerm] (FERM BP-12662), e *E. coli* K-12 [W3110(tyrA)/pBR-aroG4, pACMAB] (também conhecida como AJ12604 (FERM BP-3579) (Patente Européia Nº 488424 B1). Além disso, as bactérias de *Escherichia* que produzem L-fenilalanina com atividade intensificada da proteína codificada pelo gene *yedA* ou o gene *yddG* também podem ser usadas (Pedidos Publicados da Patente U.S. Nºs 2003/0148473 e 2003/0157667, WO03/044192).

#### Bactérias que produzem L-triptofano

Os exemplos de bactérias que produzem L-triptofano e as cepas precursoras que podem ser usadas para derivar bactérias que produzem L-triptofano incluem, mas não são limitadas às, cepas bacterianas de *Escherichia*, tais como *E. coli* JP4735/pMU3028 (DSM10122) e *E. coli* JP6015/pMU91 (DSM10123) que carecem da triptofanoil-tRNA sintetase codificada por um gene *trpS* mutante (Patente U.S. Nº 5.756.345), *E. coli* SV164 (pGH5) que contém o alelo *serA* que codifica a fosfoglicerato

desidrogenase e o alelo *trpE* que codifica a antranilato sintase, que são dessensibilizados para a inibição da retroalimentação pela serina e triptofano, respectivamente (Patente U.S. Nº 6.180.373), *E. coli* AGX17 (pGX44) (NRRL B-12263), e *E. coli* AGX6(pGX50)aroP (NRRL B-12264) que carece da triptofanoase (Patente U.S. Nº 4.371.614), e *E. coli* AGX17/pGX50,pACKG4-pps em que a capacidade de produzir a fosfoenolpiruvato é intensificada (WO97/08333, Patente U.S. Nº 6.319.696). As bactérias que produzem L-triptofano pertencentes ao gênero *Escherichia* com atividade intensificada da proteína codificada pelo gene *yedA* ou pelo gene *yddG* também podem ser usadas (Pedido Publicado da Patente U.S. Nºs 2003/0148473 e 2003/0157667).

Os exemplos de bactérias que produzem L-triptofano e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar bactérias que produzem L-triptofano também incluem cepas nas quais uma ou mais atividades das seguintes enzimas são intensificadas: antranilato sintase (*trpE*), fosfoglicerato desidrogenase (*serA*), 3-desóxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato sintase (*aroG*), 3-desidroquinato sintase (*aroB*), shiquimato desidrogenase (*aroE*), shiquimato cinase (*aroL*), 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (*aroA*), corismato sintase (*aroC*), prefenato desidratase, corismato mutase, e triptofano sintase (*trpAB*). A prefenato desidratase e a corismato mutase são codificadas pelo gene *pheA* como uma enzima bifuncional (CM-PD). Entre estas enzimas, a fosfoglicerato desidrogenase, 3-desóxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato sintase, 3-desidroquinato sintase, shiquimato desidratase, shiquimato cinase, 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase, corismato sintase, prefenato desidratase, e corismato mutase-prefenato desidratase são particularmente preferidas. A antranilato sintase e a fosfoglicerato desidrogenase ambas sofrem de inibição da retroalimentação pelo L-triptofano e L-serina, e portanto uma mutação que dessensibilize a inibição da retroalimentação pode ser introduzida nos genes que codificam

estas enzimas. Os exemplos específicos de cepas tendo uma tal mutação incluem *E. coli* SV164 tendo um tipo dessensibilizado de antranilato sintase e uma cepa transformante obtida pela introdução de um plasmídeo pGH5 (WO94/08031) contendo um gene *serA* mutante que codifica a fosfoglicerato desidrogenase dessensibilizada para a inibição da retroalimentação na *E. coli* SV164.

Os exemplos de bactérias que produzem L-triptofano e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar bactérias que produzem L-triptofano também incluem as cepas que foram transformadas com o gene contendo o operon triptofano que codifica a antranilato sintase dessensibilizadas na inibição (Patentes Japonesas Abertas ao Público N<sup>os</sup> 57-71397, 62-244382, Patente U.S. N<sup>o</sup> 4.371.614). Além disso, a capacidade de produzir L-triptofano pode ser comunicada intensificando-se a expressão de um gene que codifica a triptofano sintase no operon de triptofano (*trpBA*). A triptofano sintase inclui as subunidades tanto  $\alpha$  quanto  $\beta$ , que são codificadas por *trpA* e *trpB*, respectivamente. Além disso, a capacidade de produzir L-triptofano pode ser melhorada intensificando-se a expressão do operon da isocitrato liase-malato sintase (WO2005/103275).

#### Bactérias que produzem L-prolina

Os exemplos de bactérias que produzem L-prolina e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar bactérias que produzem L-prolina incluem, mas não são limitados às, cepas bacterianas de *Escherichia*, tais como *E. coli* 702ilvA (VKPM B-8012) que carece do gene *ilvA* e pode produzir L-prolina (Patente Européia N<sup>o</sup> 1172433).

A bactéria usada para a presente invenção pode ser melhorada intensificando-se a expressão de um ou mais genes envolvidos na biossíntese de L-prolina. Os exemplos de genes preferidos para bactérias que produzem L-prolina incluem o gene *proB* que codifica a glutamato cinase que é dessensibilizada para a inibição da retroalimentação pela L-prolina (Patente

DE 3127361). Além disso, a bactéria usada para a presente invenção pode ser melhorada intensificando-se a expressão de um ou mais genes que codificam as proteínas responsáveis pela secreção de L-aminoácidos a partir da célula bacteriana. Os exemplos de tais genes são os genes b2682 e b2683 (genes ygaZH) (Patente Européia Aberta ao Público N<sup>o</sup> 1239041 A2).

As bactérias de *Escherichia* que produzem L-prolina incluem as seguintes cepas de *E. coli*: NRRL B-12403 e NRRL B-12404 (Patente GB 2075056), VKPM B-8012 (Pedido de Patente Russo 2000124295), os mutantes de plasmídeo descritos na Patente DE 3127361, mutantes de plasmídeo descritos por Bloom F. R. *et al* (The 15th Miami Winter Symposium, 1983, p. 34), e assim por diante.

#### Bactérias que produzem L-arginina

Os exemplos de bactérias que produzem L-arginina e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar bactérias que produzem L-arginina incluem, mas não são limitados a, cepas bacterianas de *Escherichia*, tais como a cepa 237 de *E. coli* (VKPM B-7925) (Pedido Publicado da Patente U.S. N<sup>o</sup> 2002/058315 A1) e suas cepas derivadas que abrigam a N-acetilglutamato sintase mutante (Pedido de Patente Russo N<sup>o</sup> 2001112869), cepa 382 da *E. coli* (VKPM B-7926) (Patente Européia Aberta ao Público N<sup>o</sup> 1170358 A1), e uma cepa que produz arginina transformada com um gene *argA* que codifica a N-acetilglutamato sintetase (Patente Européia Aberta ao Público N<sup>o</sup> 1170361 A1).

Os exemplos de bactérias que produzem L-arginina e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar bactérias que produzem L-arginina também incluem cepas em que a expressão de um ou mais genes que codificam uma enzima biossintética de L-arginina é intensificada. Os exemplos de tais genes incluem o gene da N-acetilglutamil fosfato redutase (*argC*), o gene da ornitina acetil transferase (*argJ*), o gene da N-acetilglutamato cinase (*argB*), o gene da acetilornitina transaminase (*argD*), o

gene da ornitina carbamoil transferase (argF), o gene da ácido argininossuccínico sintetase (argG), o gene da ácido argininossuccínico liase (argH), e o gene da carbamoil fosfato sintetase (carAB).

#### Bactérias que produzem L-valina

5 Os exemplos de bactérias que produzem L-valina e cepa precursoras que podem ser usadas para derivar bactérias que produzem L-valina incluem, mas não são limitadas às, cepas que foram modificadas para superexpressar o operon *ilvGMEDA* (Patente U.S. Nº 5.998.178). É desejável remover a região no operon *ilvGMEDA* que é requerido para a atenuação de modo que a expressão do operon não seja atenuada pela L-valina produzida. Além disso, o gene *ilvA* no operon é desejavelmente rompido de modo que a atividade de treonina desaminase seja diminuída.

Os exemplos de bactérias que produzem L-valina e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar bactérias que produzem L-valina também incluem mutantes tendo mutações de amino-acil t-RNA sintetase (Patente U.S. Nº 5.658.766). Um exemplo é a *E. coli* VL1970, tendo uma mutação no gene *ileS* que codifica a isoleucina tRNA sintetase. A *E. coli* VL1970 foi depositada na Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscou 117545, Rússia) em 24 de junho de 1988 sob o número de acesso VKPM B-4411.

Além disso, cepas mutantes que requerem o ácido lipóico para crescer e/ou falta de H<sup>+</sup>-ATPase (WO96/06926) também são eficazes para derivar bactérias que produzem L-valina.

#### bactérias que produzem L-isoleucina

25 Os exemplos de bactérias que produzem L-isoleucina e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar bactérias que produzem L-isoleucina incluem, mas não são limitados a, mutantes que são resistentes à 6-dimetilaminopurina (Patente Japonesa Aberta ao Público Nº 5-304969), mutantes que são resistentes aos análogos de isoleucina tais como

tiaisoleucina e hidroxamato de isoleucina, e mutantes que são adicionalmente resistentes à DL-etionina e/ou hidroxamato de arginina (Patente Japonesa Aberta ao Público Nº 5-130882). Além disso, cepas recombinantes transformadas com genes que codificam proteínas envolvidas na biossíntese de L-isoleucina, tais como a treonina desaminase e a acetohidroxato sintase, também são eficazes para derivar bactérias que produzem L-isoleucina (Patente Japonesa Aberta ao Público Nº 2-458, FR 0356739, e Patente U.S. Nº 5.998.178).

#### Bactérias que produzem L-tirosina

Os exemplos de bactérias que produzem tirosina incluem bactérias *Escherichia* com um gene dessensibilizado da prefenato desidratase (tyrA) dessensibilizado para a inibição pela tirosina (Patente Européia Aberta ao Público Nº 1616940).

Quando as bactérias que produzem L-aminoácido anteriormente mencionadas são criadas pela recombinação de gene, os genes a serem usados não são limitados aos genes tendo a informação genética descrita acima ou genes tendo sequências conhecidas, mas também incluem genes tendo mutações conservativas, tais como homólogos ou genes artificialmente modificados, também podem ser usados contanto que as funções das proteínas codificadas não sejam degradadas. Isto é, eles podem ser genes que codificam uma sequência de aminoácido conhecida contendo uma ou mais substituições, deleções, inserções, adições ou semelhante de um ou vários resíduos de aminoácido em uma ou várias posições.

Embora o número dos “vários” resíduos de aminoácido aqui aludidos possam diferir dependendo da posição na estrutura tridimensional ou os tipos de resíduos de aminoácido da proteína, especificamente, a mesma pode ser preferivelmente de 1 a 20, mais preferivelmente de 1 a 10, ainda mais preferivelmente de 1 a 5. A mutação conservativa é uma mutação em que a substituição ocorre mutuamente entre Phe, Trp, e Tyr, se o sítio de

substituição for um aminoácido aromático; entre Leu, Ile e Val, se o mesmo for um aminoácido hidrofóbico; entre Gln e Asn, se o mesmo for um aminoácido polar; entre Lys, Arg e His, se o mesmo for um aminoácido básico; entre Asp e Glu, se o mesmo for um aminoácido ácido; e entre Ser e Thr, se o mesmo for um aminoácido tendo um grupo hidroxila. A mutação conservativa é tipicamente uma substituição conservativa, e as substituições consideradas substituições conservativas incluem, especificamente, a substituição de Ser ou Thr por Ala, substituição de Gln, His ou Lys por Arg, substituição de Glu, Gln, Lys, His ou Asp por Asn, substituição de Asn, Glu ou Gln por Asp, substituição de Ser ou Ala por Cys, substituição de Asn, Glu, Lys, His, Asp ou Arg por Gln, substituição de Gly, Asn, Gln, Lys ou Asp por Glu, substituição de Pro por Gly, substituição de Asn, Lys, Gln, Arg ou Tyr por His, substituição de Leu, Met, Val ou Phe por Ile, substituição de Ile, Met, Val ou Phe por Leu, substituição de Asn, Glu, Gln, His ou Arg por Lys, substituição de Ile, Leu, Val ou Phe por Met, substituição de Trp, Tyr, Met, Ile ou Leu por Phe, substituição de Thr ou Ala por Ser, substituição de Ser ou Ala por Thr, substituição de Phe ou Tyr por Trp, substituição de His, Phe ou Trp por Tyr, e substituição de Met, Ile ou Leu por Val. As substituições, deleções, inserções, adições de aminoácido anteriormente mencionadas, inversões ou semelhante pode ser um resultado de uma mutação que ocorre naturalmente ou uma variação devido a uma diferença individual ou diferença de espécies de um microorganismo a partir dos quais os genes são derivados (mutante ou variante). Tais genes podem ser obtidos, por exemplo, modificando-se uma sequência de nucleotídeo conhecida de um gene pela mutagênese específica de sítio de modo que os resíduos de aminoácido nos sítios específicos da proteína codificada incluem substituições, deleções, inserções, ou adições de resíduos de aminoácido.

Além disso, tais genes tendo mutação(ões) conservativa(s) como descrita(s) acima podem codificar uma proteína tendo uma homologia

de 80% ou mais, preferivelmente 90 % ou mais, mais preferivelmente 95 % ou mais, de modo particularmente preferível 97 % ou mais, com a sequência de aminoácido codificada inteira e tendo uma função equivalente àquela da proteína do tipo selvagem. Neste relatório descritivo, o termo “homologia” também pode ser usado para se referir à “identidade”.

Além disso, códons nas sequências de gene podem ser substituídas com outros códons que são facilmente usados no hospedeiro no qual os genes são introduzidos.

Os genes tendo mutação(ões) conservativas podem ser obtidos pelos métodos habitualmente usados em tratamentos de mutagênese tais como tratamentos com agentes de mutagênese.

Além disso, os genes podem ser um DNA que pode hibridizar com uma sequência complementar de uma sequência de gene conhecida ou uma sonda que pode ser preparadas a partir da sequência complementar sob condições severas e codificam uma proteína tendo uma função equivalente àquela do produto de gene conhecido. As “condições de severidade” aqui aludidas são condições sob as quais um chamado híbrido específico é formado, e um híbrido não específico não é formado. Os exemplos das condições severas incluem aquelas sob as quais DNAs altamente homólogos hibridizam entre si, por exemplo, DNAs não menos do que 80 % homólogos, preferivelmente não menos do que 90 % homólogos, mais preferivelmente não menos do que 95 % homólogos, de modo particularmente preferível não menos do que 97 % homólogos, hibridizam entre si, e DNAs menos homólogos do que acima não hibridizam entre si, ou condições de lavagem uma vez, preferivelmente 2 ou 3 vezes, em uma concentração salina e temperatura que correspondam à lavagem típica da hibridização de Southern, isto é, 1 x SSC, 0,1 % de SDS a 60 °C, preferivelmente 0,1 x SSC, 0,1 % de SDS a 60 °C, mais preferivelmente 0,1 x SSC, 0,1 % de SDS a 68 °C.

Como a sonda, uma parte da sequência que é complementar ao

gene também pode ser usada. Uma tal sonda pode ser preparada pela PCR usando oligonucleotídeos preparados com base na sequência de gene conhecida como iniciadores e um fragmento de DNA contendo as sequências de nucleotídeo como um padrão. Por exemplo, quando um fragmento de DNA tendo um comprimento de cerca de 300 pares de base é usado como a sonda, as condições de lavagem de hibridização podem ser 50 °C, 2 x SSC e 0,1 % de SDS.

As descrições anteriormente mencionadas que dizem respeito a variantes de genes são similarmente aplicadas ao gene *gcd* descrito abaixo.

#### 10 <2-2> Redução da atividade de GCD

Daqui em diante, a modificação de uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae* para reduzir a sua atividade de GCD será explicada.

15 A atividade de GCD significa a atividade que catalisa a seguinte reação.



A atividade de GCD pode ser medida, por exemplo, com base na detecção da geração do DCPIP reduzido através das seguintes reações pela espectrometria a 600 nm (Patente Japonesa Aberta ao Público N<sup>o</sup> 2007-129965).



20 PMS: metossulfato de fenazina

DCPIP: 2,6-diclorofenolindofenol

A frase “modificada de modo que a atividade de GCD seja reduzida” significa que a atividade de GCD por célula da bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae* tornou-se mais baixa do que aquela de uma cepa não modificada, tal como uma cepa do tipo selvagem, da bactéria. Isto significa, por exemplo, que o número das moléculas de GCD por célula é

diminuída comparada com aquela da cepa precursora ou uma cepa do tipo selvagem, ou que a atividade de GCD por molécula é diminuída comparada com aquela da cepa precursora ou uma cepa do tipo selvagem. A atividade de GCD por célula pode ser comparada comparando-se as atividades de GCD em  
5 extratos de célula de uma cepa do tipo selvagem ou precursora e uma cepa modificada cultivada sob a mesma condição. O termo “redução” da atividade inclui o desaparecimento completo da atividade. A bactéria *Pantoea* do tipo selvagem usada como uma referência para a comparação é, por exemplo, a *Pantoea ananatis* AJ13355 (FERM BP-6615), ou semelhante.

10 A redução da atividade de GCD é atingida pela inativação do gene que codifica GCD (*gcd*). A “inativação” do gene *gcd* significa tal modificação do gene pela recombinação do gene ou introdução de uma mutação no gene de modo que a atividade de GCD codificada pelo gene seja reduzida ou eliminada.

15 Os exemplos do gene *gcd* incluem o gene *gcd* de *Pantoea ananatis* tendo a sequência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID NO: 1. A sequência de aminoácido da GCD codificada por este gene *gcd* é mostrada na SEQ ID NO: 2. O gene *gcd* pode ser clonado realizando-se a PCR usando oligonucleotídeos sintéticos sintetizados com base na sequência anteriormente  
20 mencionada e cromossoma de *Pantoea ananatis* como um padrão. Além disso, quando o gene *gcd* é deletado pela recombinação homóloga, um gene que mostra uma homologia mais alta do que um certo nível, por exemplo, 80 % ou mais, preferivelmente 90 % ou mais, mais preferivelmente 95 % ou mais, ao gene *gcd* em um cromossoma também pode ser usado.  
25 Além disso, um gene hibridizável com o gene *gcd* em um cromossoma sob condições severas também pode ser usado. Os exemplos das condições severas incluem, por exemplo, lavagem uma vez, mais preferivelmente lavagem dias ou três vezes, nas concentrações de sal que correspondem a 1 x SSC, 0,1 % de SDS, preferivelmente 0,1 x SSC, 0,1 % de SDS, a 60 °C.

Especificamente, a inativação do gene *gcd* pode ser obtido, por exemplo, pela deleção de uma parte ou da região codificadora inteira do gene *gcd* em um cromossoma, ou inserir uma outra sequência na região codificadora. Estas técnicas também são chamadas de rompimento de gene.

5 O gene *gcd* também pode ser inativado pela diminuição da expressão do gene *gcd* via modificação de uma sequência de controle de expressão tal como um promotor ou sequência de Shine Dargarno (SD) do gene *gcd*, ou semelhante. A diminuição da expressão inclui a diminuição da transcrição e diminuição da tradução. A expressão do gene também pode ser  
10 diminuída pela modificação de uma região que não de tradução outra que não as regiões de controle de expressão.

Além disso, o gene alvo inteiro incluindo as regiões a montante e a jusante do gene alvo em um cromossoma pode ser deletado. Além disso, a inativação do gene *gcd* também pode ser atingida pela  
15 introdução de uma mutação para uma substituição de aminoácido (mutação de sentido errado), um códon de parada (mutação sem sentido), ou uma mutação de mudança de matriz que adiciona ou deleta um ou dois nucleotídeos na ou a partir da região codificadora do gene *gcd* e um cromossoma (Journal of Biological Chemistry, 272: 8611-8617 (1997); Proceedings of the National  
20 Academy of Sciences, USA, 95 5511-5515 (1998); Journal of Biological Chemistry, 266, 20833-20839 (1991)).

A modificação do gene é preferivelmente atingida pela recombinação de gene. Os exemplos específicos do método com base na recombinação de gene incluem deleção de uma sequência parcial ou inteira de  
25 uma sequência de controle de expressão do gene alvo em um cromossoma, por exemplo, uma região promotora, ou uma região codificadora ou uma codificadora não região, e inserção de uma outra sequência nestas regiões.

A modificação de uma sequência de controle de expressão é realizada preferivelmente para um ou mais nucleotídeos, mais preferivelmente

para dois ou mais nucleotídeos, de modo particularmente preferível três ou mais nucleotídeos. Quando uma região codificadora é deletada, a região a ser deletada pode ser uma região de terminal N, uma região interna ou uma região de terminal C, ou ainda a região codificadora inteira, contanto que a função da proteína a ser produzida pelo gene seja reduzida ou deletada. A deleção de uma região mais longa pode usualmente mais seguramente inativar o gene alvo. Além disso, é preferido que as matrizes de leitura a montante e a jusante da região a ser deletada não sejam as mesmas.

Quando uma outra sequência é inserida em uma região codificadora, a sequência pode ser inserida em qualquer região do gene alvo, e a inserção de uma região mais longa pode de modo usual mais seguramente inativar o gene alvo. É preferido que as matrizes de leitura a montante e a jusante do sítio de inserção não sejam as mesmas. A outra sequência não é particularmente limitada contanto que uma sequência que reduza ou delete a função da proteína codificada pelo gene alvo seja escolhida, e os exemplos incluem, por exemplo, um transposon que carrega um gene de resistência a antibiótico, um gene útil para a produção de L-aminoácido, e assim por diante.

Tal modificação de um gene alvo em um cromossoma como descrito acima pode ser atingido, por exemplo, preparando-se um gene tipo deleção em que uma sequência parcial de um gene alvo é deletada de modo que o mesmo não possa produzir uma proteína que pode normalmente funcionar, e transformar uma bactéria com um DNA contendo o gene tipo deleção para causar a recombinação homóloga entre o gene tipo deleção e o gene alvo em um cromossoma e deste modo substituir o gene tipo deleção no lugar do gene alvo no cromossoma. A proteína codificada pelo gene tipo deleção tem uma conformação diferente daquela de uma proteína do tipo selvagem, mesmo se a mesma for produzida, e assim a sua função é reduzida ou deletada. Tal rompimento de gene com base na substituição de gene que

utiliza a recombinação homóloga já foi estabelecida, e existe um método chamado de integração induzida por Red (Datsenko, K. A, e Wanner, B. L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 6640-6645 (2000)), um método de usar um DNA linear tal como um método que utiliza a integração induzida por Red em  
5 combinação com um sistema excisivo derivado do fago  $\lambda$  (Cho, E. H., Gumport, R. I., Gardner, J. F., J. Bacteriol., 184: 5200-5203 (2002)), um método de usar um plasmídeo contendo uma origem de replicação sensível à temperatura ou um plasmídeo capaz da transferência conjugativa, um método de utilizar um vetor suicida não tendo origem de replicação em um hospedeiro  
10 (Patente U.S. Nº 6.303.383, Patente Japonesa Aberta ao Público Nº 05-007491), e assim por diante.

A diminuição na quantidade de transcrição de um gene alvo pode ser confirmado comparando-se a quantidade de mRNA transcrito a partir do gene alvo com aquela em uma cepa do tipo selvagem ou uma cepa não  
15 modificada. Os exemplos do método para medir a quantidade de mRNA incluem a hibridização de Northern, RT-PCR, e assim por diante (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001). Embora a quantidade de transcrição possa ser diminuída em qualquer grau contanto que a mesma diminua comparada com aquela observada em  
20 uma cepa do tipo selvagem ou não modificada, é desejavelmente diminuída a pelo menos 75 % ou menos, 50 % ou menos, 25 % ou menos, ou 10 % ou menos, daquela observada, por exemplo, em uma cepa do tipo selvagem ou não modificada, e é particularmente preferido que o gene não seja expressado de nenhuma maneira.

25 A diminuição na quantidade de uma proteína codificada pelo gene alvo pode ser confirmada pela Western blotting usando anticorpos que se liguem à proteína (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA) 2001). Embora a quantidade da proteína possa ser diminuída em qualquer grau contanto que a mesma diminua

comparada com aquela observada em uma cepa do tipo selvagem ou cepa não modificada, a mesma é desejavelmente diminuída a pelo menos 75 % ou menos, 50 % ou menos, 25 % ou menos, ou 10 % ou menos, daquela observada, por exemplo, em uma cepa do tipo selvagem ou não modificada, e  
5 é particularmente preferido que a proteína não seja produzida de maneira nenhuma (a atividade completamente desapareceu).

Os exemplos do método para diminuir a atividade de GCD incluem, além das técnicas de manipulação genética anteriormente mencionadas, por exemplo, um método de tratar uma enterobactéria tal como  
10 as bactérias *Pantoea* com irradiação ultravioleta ou um mutagene usado para o tratamento de mutagênese habitual tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) ou ácido nitroso, e selecionando uma cepa que apresente atividade de GCD diminuída.

A atividade de GCD também pode ser reduzida reduzindo-se a  
15 capacidade de síntese de PQQ. A capacidade de síntese de PQQ pode ser reduzida, por exemplo, deletando-se uma parte ou todo de pqqABCDEF, que é o operon requerido para a biossíntese de PQQ (J. S. Velterop, P. W. Postma, J. Bacteriology 177(17): 5088-5098 (1995)).

No caso de um microorganismo não tendo a atividade de GCD  
20 tal como *Escherichia coli* e bactérias corineformes, a glicose é captada usando-se um transportador chamado de glicose PTS (sistema de glicose fosfotransferase) ou glicose permease. A PTS é incorporada nas células na forma de glicose 6-fosfato, que liga com a reação de converter PEP (ácido fosfoenolpirúvico) em Pyr (ácido pirúvico). A glicose 6-fosfato é convertida  
25 em frutose-6-fosfato, e metabolizada pelo chamado sistema glicolítico (EMP, caminho de Embden-Myerhof) para gerar ácido pirúvico.

Por outro lado, no caso de um microorganismo tendo a atividade de GCD, a glicose é uma vez convertida em ácido glicônico no espaço periplásmico, depois é incorporada pela gliconato permease, e o ácido

6-fosfoglicônico é gerado da mesma por uma reação de fosforilação.

O ácido 6-fosfoglicônico é metabolizado pelo ciclo da pentose fosfato ou o caminho de Entner-Doudoroff (ED) para gerar gliceraldeído 3-fosfato, ácido pirúvico, e assim por diante.

5                   É sabido que um microorganismo tendo GCD tal como bactérias do ácido acético tem uma característica sacarometabólica peculiar que uma vez converte uma parte da glicose em ácido glicônico no periplasma, e depois a incorpora. Visto que as capacidades do caminho de EMP intracelular, caminho de ED, e ciclo da pentose fosfato são diferentes  
10 dependendo dos microorganismos, é esperado que se GCD é deletado para modificar o sacarometabolismo, o padrão metabólico a jusante do mesmo pode ser mudado.

No caso de *Pantoea ananatis*, é considerado que, em uma temperatura de cultura usual, por exemplo, 34 °C, a glicose não é totalmente  
15 assimilada pela GCD, e uma quantidade considerável da mesma é assimilada pelo PTS. Por outro lado, se a mesma é cultivada em uma alta temperatura, por exemplo, 38 °C, visto que a temperatura ideal da GCD é alta, é esperado que a atividade de GCD seja aumentada, e o consumo de sacarídeo pela GCD aumente. Visto que a *Pantoea ananatis* não tem o caminho de ED, o ácido 6-  
20 fosfoglicônico é desidrogenado pela 6-fosfogliconato desidrogenase, e depois metabolizado pelo ciclo da pentose fosfato. Visto que uma molécula de dióxido de carbono é liberada a partir de uma molécula do ácido 6-fosfoglicônico na desidrogenação pela 6-fosfogliconato desidrogenase, é esperado que se o consumo de sacarídeo pela GCD aumenta, a quantidade de  
25 produção de aminoácido diminui. Além disso, é estimado que se o consumo de sacarídeo pela GCD aumenta devido à cultura em uma alta temperatura, a capacidade do ciclo da pentose fosfato torna-se insuficiente, e metabólitos superabundantes fluem nos caminhos para gerar subprodutos para diminuir a produção de L-aminoácido, como um resultado. É considerado que, na

presente invenção, a liberação de dióxido de carbono e o fluxo excessivo do ciclo da pentose fosfato são eliminados pela redução da atividade de GCD, especialmente quando a cultura é realizada em uma alta temperatura, e portanto a produtividade do L-aminoácido é melhorada.

5 Além disso, é estimado que, também na *Pantoea ananatis* introduzida com o caminho de ED (Patente Japonesa Aberta ao Público Nº 2003-274988), se o consumo de sacarídeo pela GCD aumenta, a produção de L-aminoácido é diminuída devido à liberação de dióxido de carbono no momento da desidrogenação do ácido 6-fosfoglicônico pela 6-fosfogliconato  
10 desidrogenase, e capacidades insuficientes do caminho de ED e ciclo da pentose fosfato. Portanto, é considerado que a produtividade de L-aminoácido seja melhorada pela redução da atividade de GCD também em *Pantoea ananatis* introduzida com o caminho de ED.

A bactéria usada para a presente invenção pode ser uma  
15 bactéria na qual a atividade de GCD é reduzida e em que a atividade para incorporar sacarídeos é ainda intensificada. A atividade para incorporar sacarídeos pode ser intensificada, por exemplo, aumentando-se a atividade da glicose PTS ou glicose permease. Além disso, é sabido que transportadores considerados como membros da superfamília facilitadora maior (MFS,  
20 Griffith, J. K. *et al*, Curr. Opin. Cell Biol., 4(4); 684-95 (1992)) tais como a galactose permease (Flores *et al.*, J Mol. Microbiol. Biotechnol., 2007; 13: 105-116), xilose permease (Patente Européia Aberta ao Público Nº 1807445 A1), e arabinose permease também têm a atividade para a incorporação de glicose etc. Portanto, também em uma bactéria na qual a atividade de GCD é  
25 reduzida, intensificando-se qualquer uma das atividades destes transportadores, a incorporação de sacarídeos tais como glicose também é aumentada, e a produtividade do L-aminoácido é melhorada.

<2> MÉTODO PARA PRODUZIR O L-AMINOÁCIDO DA  
PRESENTE INVENÇÃO

Pelo cultivo do microorganismo da presente invenção em um meio para produzir e acumular um L-aminoácido no meio e coletar o L-aminoácido do meio, um L-aminoácido pode ser produzido.

5 Como o meio usado para o cultivo, um meio típico contendo uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio e sais minerais, assim como nutrientes orgânicos de traço como os aminoácidos e as vitaminas, quando necessário, podem ser usados. Qualquer espécie de fonte de carbono e de fonte de nitrogênio pode ser usada, contanto que elas possam ser utilizadas pela cepa escolhida a ser cultivada.

10 Açúcares tais como glicose, glicerol, frutose, sacarose, maltose, manose, galactose, hidrolisados de amido e melaços podem ser usados como fontes de carbono. Além disso, ácidos orgânicos tais como o ácido acético e o ácido cítrico, e álcoois tais como o etanol, podem também ser usados, cada um isoladamente ou em combinação com outras fontes de  
15 carbono. A amônia, os sais de amônio tais como o sulfato de amônio, o carbonato de amônio, o cloreto de amônio, o fosfato de amônio e o acetato de amônio, sais de ácido nítrico, e assim por diante, podem ser usados como a fonte de nitrogênio. Aminoácidos, vitaminas, ácidos graxos, ácidos nucléico, esses contendo aquelas substâncias tais como peptona, casaminoácido, extrato  
20 de levedura, produto da decomposição da proteína de soja, e assim por diante, podem ser usados como os nutrientes orgânicos de traço. Quando é usada uma cepa mutante auxotrófica que requeira um aminoácido ou similar para seu crescimento, o nutriente requerido pode ser suplementado.

25 Em particular, quando um meio líquido preparado de modo a satisfazer uma condição para precipitar o ácido L-glutâmico é usado, a adição do ácido pantotênico ao meio provê precipitação mais eficiente do ácido L-glutâmico (WO 2004/111258). Como sais inorgânicos, os sais de ácido fosfórico, os sais de magnésio, os sais de cálcio, os sais de ferro, o sal de manganês, e assim por diante, podem ser usados.

A cultura pode ser realizada como uma cultura aeróbica, enquanto a temperatura de fermentação é controlada para ser de 20 a 45 °C, e o pH para ser de 3 a 9. Quando o pH diminui durante a cultura, carbonato de cálcio pode ser adicionado, ou a cultura é neutralizada com uma substância alcalina tal como gás amoníaco. O L-aminoácido alvo é acumulado no meio de cultura após, por exemplo 10 a 120 horas de cultura sob condições tais como descrito acima.

Na presente invenção, embora um L-aminoácido possa ser eficientemente produzido pela cultura em uma temperatura adequada para o cultivo da bactéria, o efeito torna-se particularmente excelente especialmente quando a cultura é realizada em uma temperatura alta. Por exemplo, no caso de bactérias *Pantoea* tais como *Pantoea ananatis*, uma temperatura em torno de 34 °C é usualmente preferida para o seu cultivo. Entretanto, embora a bactéria na qual a atividade de GCD é reduzida mostre capacidade para produzir L-aminoácido mais alta do que aquela de uma cepa não modificada mesmo em uma tal temperatura de cultura, a mesma mostra ainda capacidade melhorada para produzir L-aminoácido, por exemplo, a 36 °C ou 38 °C.

Além disso, a cultura pode ser realizada pela precipitação de ácido L-glutâmico em um meio, pelo uso, como o meio, de um meio líquido ajustado para satisfazer a uma condição sob a qual o ácido L-glutâmico é precipitado. Os exemplos da condição sob a qual o ácido L-glutâmico é precipitado incluem o pH de 5,0 a 4,0, preferivelmente pH de 4,5 a 4,0, mais preferível pH de 4,3 a 4,0, particularmente preferível pH de 4,0.

Quando o ácido L-glutâmico é precipitado no meio, a adição preliminar dos cristais de ácido L-glutâmico ou de L-lisina como cristais sementes podem proporcionar cristalização mais eficiente (Patente Européia nº 1233069, Patente Européia Aberta ao Público nº 1624069).

A coleta do L-aminoácido do caldo de cultura após a cultura pode ser realizada por um método de coleta conhecido. Por exemplo, após as

células terem sido removidas do meio de cultura, o L-aminoácido pode ser coletado mediante concentração do meio para cristalizar o L-aminoácido, por cromatografia de troca de íons, ou similar. Quando a cultura é realizada sob condições de modo que o ácido L-glutâmico seja precipitado, o ácido L-glutâmico que precipita no meio pode ser coletado por centrifugação ou por filtração. Neste caso, o ácido L-glutâmico que dissolve no meio pode ser precipitado e depois separado junto com o ácido L-glutâmico já precipitado.

Quando um aminoácido básico é produzido, a produção pode ser realizada por um método no qual a fermentação seja realizada mediante o controle do pH do meio durante a cultura de modo a ser de 6,5 a 9,0, e do pH do meio após a conclusão da cultura de modo a ser de 7,2 a 9,0, e o controle da pressão no tanque de fermentação durante a fermentação para que seja positiva, ou provendo dióxido de carbono ou um gás misto contendo dióxido de carbono ao meio de modo que exista um período quando os íons de bicarbonato e/ou os íons de carbonato estejam presentes em uma concentração de pelo menos 2 g/litro no meio de cultura durante a cultura, e estes íons de bicarbonato e/ou íons de carbonato sirvam como contra-íons para os cátions principalmente consistindo do aminoácido básico, e o aminoácido básico alvo seja coletado (referir-se à Patente Japonesa Aberta ao Público no 2002-065287, Pedido Publicado da Patente U.S. nº 2002/025564).

O L-aminoácido coletado de acordo com a presente invenção pode conter células bacterianas, componentes de meio, umidade, e metabólitos de subproduto da bactéria além do L-aminoácido objeto. A pureza do L-aminoácido coletado é de 50 % ou mais alta, preferivelmente de 85 % ou mais alta, de modo particularmente preferível 95 % ou mais alto (Patente Japonesa Nº 1214636, Patentes U.S. Nºs 5.431.933, 4.956.471, 4.777.051, 4.946.654, 5.840.358, 6.238.714, Pedido Publicado da Patente U.S. Nº 2005/0025878).

Quando a L-cisteína é produzida pelo método da presente

invenção, a L-cisteína obtida pode ser usada para a produção de derivados de L-cisteína. Os derivados de cisteína incluem metilcisteína, etilcisteína, carbocisteína, sulfocisteína, acetilcisteína, e assim por diante.

Além disso, quando um derivado de tiazolidina de L-cisteína é acumulado no meio, a L-cisteína pode ser produzido pela coleta do derivado de tiazolidina do meio para romper o equilíbrio da reação entre o derivado de tiazolidina e L-cisteína de modo que a L-cisteína é excessivamente produzido. Além disso, quando a S-sulfocisteína é acumulada no meio, a mesma pode ser convertida na L-cisteína pela redução com um agente de redução tal como ditiotreitól.

### EXEMPLOS

Daqui por diante, a presente invenção será explicada mais especificamente com referência aos exemplos.

#### EXEMPLO DE REFERÊNCIA 1

Construção de uma cepa de *Pantoea ananatis* que é resistente ao produto do gene  $\lambda$  Red

Para deletar um gene em *Pantoea ananatis*, foi construída uma cepa receptora para realizar de modo altamente eficiente o método denominado “integração conduzida por Red” ou “integração mediada por Red” [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 6640-6645 (2000)].

Primeiramente, o novo plasmídeo auxiliar RSF-Red-TER, que expressa os genes *gam*, *bet* e *exo* de  $\lambda$  (doravante referidos como “genes  $\lambda$  Red”) foi construído (Figura 1). Os detalhes destes serão descritos no Exemplo de Referência 2.

Este plasmídeo pode ser usado em uma ampla faixa de hospedeiros tendo diferentes fundamentos genéticos. Isto é porque 1) este plasmídeo tem o réplicon do plasmídeo RSF1010 de amplo espectro de hospedeiros (Scholz *et al.*, 1989; Buchanan-Wollaston *et al.*, 1987), o qual é estavelmente mantido por muitos tipos de bactérias Gram-negativas e Gram-

positivas, e ainda células de plantas, 2) os genes  $\lambda$  Red, *gam*, *bet* e *exo*, se acham sob o controle do promotor PlacUV5, o qual é reconhecido pelas RNA polimerases de muitos tipos de bactérias [por exemplo, Brunschwig, E. e Darzins, A., *Gene*, 111, 1, 35-41 (1992); Dehio, M. *et al*, *Gene*, 215, 2, 223-229 (1998)], e 3) o fator de autorregulação P<sub>lacUV5</sub>-lacI e o terminador da transcrição não dependente de  $\rho$  (TrnB) do operon *rrnB* de *Escherichia coli* inferior ao nível de expressão basal dos genes  $\lambda$  Red [Skorokhodova, A. Yu *et al*, *Biotekhnologiya* (Rus.), 5, 3-21 (2004)]. Além disso, o plasmídeo RSF-Red-TER contém o gene levansacarase e, mediante o uso deste gene, o plasmídeo pode ser coletado das células em um meio contendo sacarose.

Em *Escherichia coli*, a frequência de integração de um fragmento de DNA gerado por PCR junto com a região de flaqueio curta provida pelo plasmídeo RSF-Red-TER, é tão elevada quanto a frequência obtida quando do uso do plasmídeo auxiliar pKD46 [Datsenko, K. A., Wanner, B. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 6640-6645 (2000)]. Entretanto, a expressão dos genes  $\lambda$  Red é tóxica à *Pantoea ananatis*. As células transformadas com o plasmídeo auxiliar RSF-Red-TER crescem de forma extremamente lenta em meio LB contendo IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo, 1 mM) e um antibiótico apropriado (25  $\mu$ g/ml de cloranfenicol ou 40  $\mu$ g/ml de canamicina), e a eficiência da recombinação mediada por  $\lambda$  Red é extremamente lenta ( $10^{-8}$ ), se observada sob qualquer condição.

Uma cepa variante de *Pantoea ananatis*, que seja resistente à expressão de todos os três genes  $\lambda$  Red, foi selecionada. Para este fim, o plasmídeo RSF-Red-TER foi introduzido na cepa SC17 de *Pantoea ananatis* (Patente U.S. nº 6.596.517) por eletroporação. Após uma cultura de 18 horas, cerca de  $10^6$  transformantes foram obtidos e, entre estes, 10 clones formaram colônias de grande dimensão, e todo o remanescente formaram colônias extremamente pequenas. Após uma cultura de 18 horas, as grandes colônias

tinham cerca de 2 mm e as colônias pequenas tinham cerca de 0,2 mm. ao passo que as pequenas colônias não cresceram nada, quando a cultura foi estendida até 24 horas, as grandes colônias continuaram a crescer. Uma das cepas mutantes de *Pantoea ananatis* das grandes colônias que foi resistente à expressão de todos os três genes  $\lambda$  Red (*gam*, *bet* e *exo*), foi usada para análise adicional.

O DNA plasmídeo RSF-Red-TER foi isolado de um clone dos clones das grandes colônias, e de vários clones dos clones de colônia pequena, e transformado novamente no *Escherichia coli* MG1655 para se examinar a capacidade do plasmídeo para sintetizar um produto ativo do gene Red. Por uma experiência de controle para integração dependente de Red nos transformantes obtidos, foi demonstrado que apenas o plasmídeo isolado do clone de grandes colônias induziu a expressão dos genes  $\lambda$  Red requeridos para a integração dependente de Red. De modo a pesquisar se a integração mediada por Red ocorrera no clone selecionado de grandes colônias, a eletroporação foi realizada com o uso de um fragmento linear de DNA produzido por PCR. Este fragmento foi projetado de modo contivesse um marcador Km<sup>R</sup> e uma região de flanqueio de 40 pares de base homóloga ao gene *hisD*. Este fragmento é integrado no gene *hisD* de *Pantoea ananatis* no sítio de reconhecimento *Sma*I. Dois clones de colônias pequenas foram usados como controle. A sequência de nucleotídeos do gene *hisD* de *Pantoea ananatis* é mostrada na SEQ ID NO: 3. Para a PCR, os oligonucleotídeos das SEQ ID NOS: 4 e 5 foram usados como iniciadores, e o plasmídeo pMW118-( $\lambda$ att-Km<sup>r</sup>- $\lambda$ attR) foi usado como o padrão. Os dois clones de colônias pequenas que não foram resistentes aos genes  $\lambda$  Red foram usados como um controle. A construção do plasmídeo pMW118-( $\lambda$ attL-Km<sup>r</sup>- $\lambda$ attR) será explicada em detalhes no Exemplo de Referência 3.

O plasmídeo RSF-Red-TER pode induzir a expressão dos genes Red pelo gene *lacI* exercida no plasmídeo. Duas espécies de condições

de indução foram pesquisadas. No primeiro grupo, IPTG (1 mM) foi adicionado 1 hora antes da eletroporação, e no segundo grupo, IPTG foi adicionado no início da cultura para preparar as células nas quais a eletroporação é possível. O índice de crescimento das células abrigando o RSF-Red-TER derivado do clone das grandes colônias, não foi significativamente inferior àquele de uma cepa não tendo este plasmídeo. A adição de IPTG apenas levemente reduziu o índice de crescimento destas culturas. Por outro lado, a progênie dos clones das pequenas colônias cresceu de forma extremamente lenta, mesmo sem a adição de IPTG, e, após a indução, o crescimento foi substancialmente interrompido. Após a eletroporação das células da progênie do clone de grandes colônias, muitos clones Km<sup>R</sup> cresceram (18 clones após um curto tempo de indução, e cerca de 100 clones após um período de indução prolongado). Todos os 100 clones que foram pesquisados tinham um fenótipo His<sup>-</sup>, e cerca de 20 clones foram confirmados por PCR como tendo a estrutura esperada do cromossoma nas células. Por outro lado, mesmo quando a eletroporação foi realizada com a progênie dos clones de pequenas colônias, uma cepa integrada não foi obtida.

O clone de grandes colônias obtido foi cultivado sobre uma placa contendo 7 % de sacarose para eliminar o plasmídeo, e transformado novamente com RSF-Red-TER. A cepa sem o plasmídeo foi designada de SC17 (0).

Todos os clones que cresceram após a retransformação acima mencionada apresentaram grandes tamanhos de colônia como o clone SC17 (0) da cepa precursora. A experiência de integração mediada por Red foi realizada na cepa SC17 (0) retransformada com o plasmídeo RSF-Red-TER. Três dos transformantes independentes foram pesquisados com o uso do mesmo fragmento de DNA como aquele usado para a experiência anterior. O tempo curto de indução (1 hora antes da eletroporação) foi empregado. Os clones Km<sup>R</sup> que excederam dez clones, cresceram em cada experiência.

Todos os clones examinados. Todos os clones examinados tinham o fenótipo His<sup>-</sup>. Desta maneira, uma cepa mutante designada SC17 (0) que é resistente à expressão dos genes  $\lambda$  Red foi selecionada. Esta cepa pôde ser usada como uma cepa receptora adequada para a integração dependente de Red no cromossoma de *Pantoea ananatis*.

EXEMPLO DE REFERÊNCIA 2: Construção do plasmídeo auxiliar RSF-Red-TER

O esquema para construir o plasmídeo auxiliar RSF-Red-TER é mostrado na Figura 2.

Como a primeira etapa na construção, um vetor RSFsacBPlacMCS foi projetado. Para este fim, os fragmentos de DNA contendo o gene *cat* do plasmídeo pACYC184 e a região estrutural do gene *sacB* de *Bacillus subtilis* foram amplificados por PCR com o uso dos oligonucleotídeos das SEQ ID NOS: 6 e 7, e 8 e 9, respectivamente. Estes oligonucleotídeos continham os sítios de enzimas de restrição *Bgl*II, *Sac*I, *Xba*I e *Bam*HI, que são necessários e convenientes para outra clonagem, nas regiões de extremidade 5', respectivamente. O fragmento *sacB* obtido de 1,5 kb foi clonado no vetor pMW119-P<sub>lac</sub>lacI previamente obtido no sítio *Xba*I-*Bam*HI. Este vetor foi construído da mesma maneira daquele descrito quanto ao vetor pMW118-P<sub>lac</sub>lacI [Skorokhodova, A. Yu *et al.*, *Biotekhnologiya* (Rus.), 5, 3-21 (2004)]. Entretanto, este vetor continha um componente poliligador derivado de pMW219 ao invés do plasmídeo pMW218.

Então, o fragmento *cat* acima mencionado de 1,0 kb foi tratado com *Bgl*II e *Sac*I, e clonado no plasmídeo RSF-P<sub>lac</sub>lacIsacB obtido na etapa anterior no sítio *Bam*HI-*Sac*I. O plasmídeo obtido pMW-P<sub>lac</sub>lacIsacBcat continha o fragmento PlacUV5-lacI-sacB-cat. A fim de subclonar este fragmento no vetor RSF1010, pMW-P<sub>lac</sub>lacIsacBcat foi digerido com *Bgl*II, a extremidade embotada com o fragmento Klenow da DNA polimerase I, e sucessivamente digerido com *Sac*I. Um fragmento *Bgl*II-*Sac*I de 3,8 kb do

plasmídeo pMWP<sub>lac</sub>lacIsacBcat foi eluído de um gel de agarose a 1 %, e ligado com o vetor RFS1010 que havia sido tratado com *Pst*I e *Sac*I. *Escherichia coli* TG1 foi transformado com a mistura de ligação, e plaqueado sobre o meio L (meio contendo 10 g de Bacto triptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl e 15 g de ágar em 1 L de água purificada, pH 7,0) contendo cloranfenicol (50 mg/litro). Os plasmídeos isolados dos clones desenvolvidos foram analisados com enzimas de restrição para se obter um plasmídeo RSFsacB. De modo a construir um vetor RSFsacBP<sub>lac</sub>MCS, um fragmento de DNA contendo o promotor P<sub>lacUV5</sub> foi amplificado pela PCR usando os oligonucleotídeos de SEQ ID NOS: 10 e 11 como iniciadores e o plasmídeo pMW119-P<sub>lac</sub>lacI como o padrão. O fragmento obtido de 146 pares de base foi digerido com *Sac*I e *Not*I, e ligado com o fragmento grande *Sac*I-*Not*I do plasmídeo RSFsacB. Depois, por PCR com o uso dos oligonucleotídeos de SEQ ID NOS: 12 e 13 como iniciadores, e o plasmídeo pKD46 [Datsenko, K. A., Wanner, B. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 6640-6645 (2000)] como padrão, um fragmento de DNA de 2,3 kb contendo os genes  $\lambda$ Red $\alpha\beta\gamma$  e o terminador de transcrição tL3, foi amplificado. O fragmento obtido foi clonado no vetor RSFsacBP<sub>lac</sub>MCS no sítio PvuI-*Not*I. Deste modo, o plasmídeo RSFRed foi projetado.

De modo a eliminar a leitura através da transcrição dos genes Red, um terminador da transcrição dependente de  $\rho$  do operon *rrnB* de *Escherichia coli* foi introduzido em uma posição entre o gene *cat* e o promotor P<sub>lacUV5</sub>. Para esta finalidade, um fragmento de DNA contendo o promotor P<sub>lacUV5</sub> e o terminador TrrnB foi amplificado por PCR com o uso dos oligonucleotídeos das SEQ ID NOS: 14 e 11 como iniciadores e o cromossoma de *Escherichia coli* BW3350 como o padrão. Estes fragmentos obtidos foram tratados com KpnI e ligados. Depois, o fragmento de 0,5 kb contendo tanto P<sub>lacUV5</sub> quanto TrrnB foi amplificado por PCR com o uso dos oligonucleotídeos das SEQ ID NOS: 11 e 15 como iniciadores. O fragmento

de DNA obtido foi digerido com *EcoRI*, a extremidade embotada por um tratamento com o fragmento Klenow da DNA polimerase I, digerido com *BamHI*, e ligado com o grande fragmento *Ecl136II-BamHI* do vetor *RSFsacBPlacMCS*. O plasmídeo obtido foi designado *RSF-Red-TER*.

5                   EXEMPLO DE REFERÊNCIA 3: Construção do plasmídeo  
pMW118-( $\lambda$ attL-Km<sup>r</sup>- $\lambda$ attR)

O plasmídeo pMW118-( $\lambda$ attL-Km<sup>r</sup>- $\lambda$ attR) foi construído do plasmídeo pMW118-attL-Tc-attR (WO 2005/010175) mediante substituição do gene marcador de resistência à tetraciclina com o gene de resistência à canamicina do plasmídeo pUC4K. Com essa finalidade, o fragmento grande *EcoRI-HindIII* do plasmídeo pMW118-attL-Tc-attR foi ligado a dois fragmentos do plasmídeo pUC4K: o fragmento *HindIII-PstI* (676 pares de base) e o fragmento *EcoRI-HindIII* (585 pares de base). O pMW118-attL-Tc-attR básico foi obtido pela ligação dos seguintes quatro fragmentos:

15                   1) O fragmento *BglII-EcoRI* (114 pares de base) incluindo *attL* (SEQ ID NO: 18) que foi obtido por amplificação de PCR da região correspondente ao attL do cromossoma de *Escherichia coli* W3350 (contendo o profago  $\lambda$ ) com o uso dos iniciadores P1 e P2 (SEQ ID NOS: 16 e 17) (estes iniciadores continham os sítios de reconhecimento subsidiários para *BglII* e  
20 *EcoRI*).

2) O fragmento *PstI-HindIII* (182 pares de base) incluindo *attR* (SEQ ID NO: 21) que foi obtido por amplificação de PCR da região correspondente ao attR do cromossoma de *Escherichia coli* W3350 (contendo o profago  $\lambda$ ) com o uso dos iniciadores P3 e P4 (SEQ ID NOS: 19 e 20) (estes  
25 iniciadores continham os sítios de reconhecimento subsidiários para *PstI* e *HindIII*).

3) O grande fragmento *BglII-HindIII* (3916 pares de base) do pMW118-ter\_rrnB. O plasmídeo pMW118-ter\_rrnB foi obtido pela ligação dos seguintes três fragmentos de DNA:

- O grande fragmento de DNA (2359 pares de base) incluindo o fragmento *AatII-EcoRI* de pMW118 que foi obtido pela digestão do pMW118 com *EcoRI*, tratamento com o fragmento Klenow de DNA polimerase I, e depois digestão com *AatII*;

5                   - O pequeno fragmento *AatII-BglII* (1194 pares de base) de pUC19 incluindo o gene *bla* para resistência à ampicilina ( $Ap^R$ ), que foi obtido por amplificação de PCR da região correspondente do plasmídeo pUC19 com o uso dos iniciadores P5 e P6 (SEQ ID NOS: 22 e 23) (estes iniciadores continham os sítios de reconhecimento subsidiários para *PstI*,  
10    *AatII* e *BglII*);

- O pequeno fragmento *BglII-PstI* (363 pares de base) do terminador da transcrição *ter\_rrnB*, que foi obtido por amplificação de PCR da região correspondente do cromossoma de *Escherichia coli* MG1655 com o uso dos iniciadores P7 e P8 (SEQ ID NOS: 24 e 25) (estes iniciadores  
15    continham os sítios de reconhecimento subsidiários para *PstI*, *BglII* e *PstI*).

4) O pequeno fragmento *EcoRI-PstI* (1388 pares de base) (SEQ ID NO: 26) de pML-Tc-*ter\_thrL* incluindo o gene de resistência à tetraciclina e o terminador da transcrição *ter\_thrL*; o plasmídeo pML-Tc-*ter\_thrL* foi obtido pelas seguintes duas etapas:

20                   - o plasmídeo pML-*ter\_thrL* foi obtido pela digestão do plasmídeo pML-MCS [Mashko, S. V. *et al.*, *Biotekhnologiya* (em Russo), 2001, nº 5, 3-20) com *XbaI* e *BamHI*, seguido pela ligação do grande fragmento (3342 pares de base) com o fragmento *XbaI-BamHI* (68 pares de base) carregando o terminador *ter\_thrL* obtido por amplificação de PCR da  
25    região correspondente do cromossoma de *Escherichia coli* MG1655 com o uso dos iniciadores P9 e P10 (SEQ ID NOS: 27 e 28) (estes iniciadores continham os sítios de reconhecimento subsidiários *PstI*, *XbaI* e *BamHI*);

- o plasmídeo pML-Tc-*ter\_thrL* foi obtido pela digestão do plasmídeo pML-*ter\_thrL* com *KpnI* e *XbaI*, seguida pelo tratamento com o

fragmento Klenow da DNA polimerase I, e ligado com o pequeno fragmento *EcoRI-Van91I* (1317 pares de base) de pBR322 incluindo o gene de resistência à tetraciclina (pBR322 foi digerido com *EcoRI* e *Van91I* e depois tratado com o fragmento Klenow da DNA polimerase I).

5                   EXEMPLO DE REFERÊNCIA 4: Construção do plasmídeo RSFPPG produtor do ácido glutâmico

                  O plasmídeo RSFPPG (WO2008/020654) foi construído, no qual os genes do sistema da biossíntese do ácido L-glutâmico, o gene *prpC* (Publicação da Patente Internacional WO 2006/051660), o gene *ppc* e o gene  
10 *gdhA* (Patente Européia Aberta ao Público N<sup>o</sup> 0999282), foram amplificados.

                  O iniciador 1 (SEQ ID NO: 29) e o iniciador 2 (SEQ ID NO: 30) para amplificar uma parte do RSFCPG (Patente Européia Aberta ao Público N<sup>o</sup> 1233068) outro que não ORF do gene *gltA*, foram projetados. Mediante o uso destes iniciadores e RSFCPG como o padrão, a PCR foi  
15 realizada para se obter um fragmento de cerca de 14,9 kb. No que diz respeito ao *prpC*, a PCR foi realizada com o uso do iniciador 3 (SEQ ID NO: 31) e do iniciador 4 (SEQ ID NO: 32) e do DNA cromossômico da cepa W3110 de *E. coli* como o padrão, para se obter um fragmento de cerca de 1,2 kb. Ambos os produtos de PCR foram tratados com *BglII* e *KpnI*, ligados, e depois usados  
20 para transformar a cepa JM109 de *E. coli*. Todas as colônias que cresceram foram coletadas e os plasmídeos foram extraídos das colônias como uma mistura. A cepa ME8330 de *E. coli*, que é uma cepa deficiente de citrato sintase (CS), foi transformada com a mistura de plasmídeos, e a suspensão celular foi aplicada em meio mínimo M9 (5 g de glicose, sulfato de magnésio  
25 2 mM, 3 g de fosfato monopotássico, 0,5 g de cloreto de sódio, 1 g de cloreto de amônio e 6 g de fosfato dissódico, em 1 litro de água pura) contendo 50 mg/litro de uracila e 5 mg/litro de HCl de tiamina. Todas as colônias que cresceram foram coletadas, plasmídeos foram extraídos como uma mistura, e a cepa NP106, que é uma cepa que produz o ácido L-glutâmico de *P.*

*ananatis*, foi transformada com a mistura de plasmídeo. Os clones que cresceram foram cultivados em tubos de teste sob uma condição neutra, e uma cepa que mostra uma produção de ácido L-glutâmico comparativo com aquele da cepa G106S foi designada NA1. Um plasmídeo foi extraído desta cepa e designada RSFPPG para intensificar *prpC*, *gdh*, e *ppc*. Este plasmídeo RSFPPG foi introduzido na cepa NP106 de *Pantoea ananatis*, a qual é uma cepa produtora de ácido L-glutâmico, para construir uma cepa produtora de ácido L-glutâmico, NP106/RSFPPG (esta cepa é referida como a “cepa NA1”).

10 A cepa NP106 foi obtida como segue. A cepa AJ13601 de *Pantoea ananatis* descrita acima foi cultivada durante a noite em 34 °C em um meio líquido obtida pela adição de componentes do meio mínimo (5 g/L de glicose, 2 mM de sulfato de magnésio, 3 g/L de fosfato de monopotássio, 0,5 g/L de cloreto de sódio, 1 g/L de cloreto de amônio, e 6 g/L de fosfato de

15 dissódio) ao meio L (10 g/L de Bacto triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de NaCl, pH 7,0) (doravante aludido como “meio LBG9”) com agitação, o meio foi diluído de modo que 100 a 200 colônias crescerão por placa e foram aplicadas a uma placa de LBG9 contendo 12,5 mg/litro de tetraciclina. As colônias que apareceram foram replicadas em uma placa de

20 LBG9 contendo 12,5 mg/litro de tetraciclina e 25 mg/litro de cloranfenicol, e uma cepa que foi sensível ao cloranfenicol foi selecionada para se obter uma cepa da qual o pSTVCB fosse eliminado, a qual foi designada G106S. A cepa G106S foi ainda cultivada durante a noite em 34 °C no meio líquido de LBG9 com agitação, o meio foi diluído de modo que 100 a 200 colônias

25 aparecessem por placa, e aplicado a uma placa de LBG9 sem medicamentos. As colônias que cresceram foram replicadas em uma placa LBG9 contendo 12,5 mg/litro de tetraciclina, e uma placa de LBG9 sem medicamentos, e uma cepa que resultou sensível à tetraciclina foi selecionada para se obter uma cepa da qual o RSFCPG fosse eliminado, a qual foi

designada NP106. A NP106 obtida como descrito acima não contém os plasmídeos RSFCPG e pSTVCB, os quais são abrigados pela cepa AJ13601.

A cepa G106S é uma cepa obtida pela eliminação apenas de pSTVCB da cepa AJ13601 em uma maneira similar.

5 Exemplo 1: Produção do ácido L-glutâmico usando cepa deficiente do gene *gcd*

(1) Construção da cepa deficiente gene *gcd*

Dois iniciadores de DNA sintéticos mostrados nas SEQ ID NOS: 33 e 34 foram sintetizados por um método comum.

10 O iniciador mostrado na SEQ ID NO: 33 teve uma configuração que a sequência homóloga a montante do gene *gcd* de *Pantoea ananatis* foi seguida pela sequência homóloga na extremidade 5' de  $\lambda$ attL-Km<sup>r</sup>- $\lambda$ attR. O iniciador da SEQ ID NO: 34 teve uma configuração que a sequência complementar a jusante do gene *gcd* de *Pantoea ananatis* foi seguida pela sequência complementar na extremidade 3' de  $\lambda$ attL-Km<sup>r</sup>- $\lambda$ attR. Realizando-se a PCR usando estes iniciadores e pMW118-( $\lambda$ attL-Km<sup>r</sup>- $\lambda$ attR) como um padrão, um fragmento de cerca de 1,5 kbp em que a sequência homóloga a montante do gene *gcd* foi ligado à extremidade 5' da sequência de  $\lambda$ attL-Km<sup>r</sup>- $\lambda$ attR, e a sequência homóloga a jusante do gene *gcd* foi ligado à extremidade 3' da sequência de  $\lambda$ attL-Km<sup>r</sup>- $\lambda$ attR foi amplificada.

20 O fragmento de PCR anteriormente mencionado foi purificado e usado para a integração dependente de  $\lambda$  no cromossoma de *Pantoea ananatis*. O plasmídeo auxiliar RSF-Red-TER foi usado como um carregador de genes Red do fago  $\lambda$ . De modo a obter células eletro-competentes de *Pantoea ananatis*, a cepa SC17(0) foi transformada com o plasmídeo RSF-Red-Ter, e cultivados durante a noite a 34 °C em meio LB contendo 50  $\mu$ g/ml de cloranfenicol. Depois, o caldo de cultura foi diluído 100 vezes com meio LB fresco contendo 50  $\mu$ g/ml de cloranfenicol, e as células cresceram a 34 °C sob aeração até que a OD<sub>600</sub> tornou-se 0,3. Depois, 1 mM de IPTG foi

adicionado, e a cultura foi continuada até que a OD<sub>600</sub> tornou-se 0,7. As células em 10 ml da cultura foram lavadas 3 vezes com um volume igual de água desionizada, e as células foram colocadas em suspensão em 80 µl de glicerol a 10 % frio. O produto de PCR anteriormente mencionado foi dissolvido em 10 µl de água desionizada, e 100 a 200 ng do fragmento de PCR foram adicionados à suspensão de célula. A eletroporação foi feita usando-se um aparelho de eletroporação de bactéria (BioRad, United States, Catálogo número 165-2089, Versão 2-89). Os parâmetros do pulso usado foram uma intensidade de campo de 18 kV/cm, e um tempo de pulso de 5 milissegundos.

Depois da eletroporação, 1 ml do meio LB suplementado com glicose (0,5 %) foi imediatamente adicionado à suspensão de célula. Depois, as células foram deixadas crescer a 34 °C por 2 horas sob aeração, e selecionadas no meio L (10 g de Bacto triptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl, e 15 g de ágar em 1 L de água purificada, pH 7,0) contendo 40 mg/L de canamicina para obter cerca de 20 colônias como transformantes. A inserção do fragmento de gene de resistência à canamicina na região do gene *gcd* foi confirmada pela PCR usando os dois iniciadores de DNA sintéticos mostrados nas SEQ ID NOS: 35 e 36, e uma cepa em que a inserção do fragmento foi confirmada foi designada SC17(0)::Δgcd. O DNA genômico foi extraído desta cepa, e usada para transformar a cepa NA1 pela eletroporação.

A cepa NA1 na qual o DNA genômico de SC17(0)::Δgcd foi introduzido foi selecionado em uma placa em meio LBGM9 suplementado com 40 mg/L de canamicina, 12,5 mg/L de cloridreto de tetraciclina, e 15 g/L de ágar. Como um resultado, cerca de 20 colônias foram obtidas como transformantes. Em todas estas cepas, o fragmento de λattL-Km<sup>r</sup>-λattR foi inserido na região do gene *gcd*, e um clone entre eles foi selecionado e designado NA1::Δgcd.

(2) Avaliação da capacidade de produzir o ácido L-glutâmico

da cepa deficiente no gene *gcd*

De modo a examinar o efeito da deleção do gene *gcd* sobre a produção do ácido L-glutâmico, a cultura de produção do ácido L-glutâmico foi realizada usando-se as cepas NA1:: $\Delta$ *gcd* e NA1.

5 A cultura foi realizada em duas etapas: uma cultura de semente para permitir a formação de células, e uma cultura principal para produzir ácido L-glutâmico.

A cultura de semente foi realizada com a seguinte composição de meio.

10 Composição do meio da cultura de semente:

|    |   |           |
|----|---|-----------|
|    | Sacarose  | 50 g/L    |
|    | MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O            | 0,4 g/L   |
|    | GD113 (antiespumante)                           | 0,1 ml/L  |
|    | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 4,0 g/L   |
| 15 | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 2,0 g/L   |
|    | Extrato de levedura                             | 4,0 g/L   |
|    | FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O            | 0,01 g/L  |
|    | MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O            | 0,01 g/L  |
|    | Ácido cítrico                                   | 0,02 g/L  |
| 20 | Cloridreto de L-Lisina                          | 0,4 g/L   |
|    | DL-Metionina                                    | 0,4 g/L   |
|    | Ácido $\epsilon$ -Diaminopimélico               | 0,4 g/L   |
|    | Pantotenato de cálcio                           | 18 mg/L   |
|    | Cloridreto de tetraciclina                      | 12,5 mg/L |

25 O meio foi esterilizado com vapor a 120 °C por 20 minutos.

A NA1:: $\Delta$ *gcd* e as cepas NA1 foram cada uma pré-cultivada na placa de meio LBGM9 suplementada com 12,5 mg/L de tetraciclina e 15 g/L de ágar, e as células que correspondem a uma placa foram inoculadas em 300 ml do meio de cultura de semente da composição anteriormente

mencionada contida em uma mini jarra de 1 L de volume, e a agitação foi controlada a 34 °C e pH 6,0 por cerca de 12 horas de modo que a aeração de 1/1 vvm e uma concentração de oxigênio de 3 % ou mais alta é obtida. Durante a cultura, o pH foi controlado ser 6,0 com a adição de gás amônia.

5 Durante a cultura, o pH foi controlado para ser 6,0 pela adição de gás de amônia. A cultura de semente foi terminada no momento do esgotamento do sacarídeo no meio observado como um índice.

A composição do meio de cultura principal é mostrado abaixo.

10 A composição do meio de cultura (as concentrações são depois da inoculação de 20 % de meio de cultura de semente)

|    |   |          |
|----|---|----------|
|    | Glicose   | 100 g/L  |
|    | MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O            | 0,4 g/L  |
|    | GD113   | 0,1 ml/L |
|    | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 5,0 g/L  |
| 15 | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                 | 6,0 g/L  |
|    | Extrato de levedura                             | 6,0 g/L  |
|    | FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O            | 0,02 g/L |
|    | MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O            | 0,02 g/L |
|    | Ácido cítrico                                   | 0,02 g/L |
| 20 | Betáina*  | 2,0 g/L  |
|    | Cloridreto de L-Lisina                          | 0,8 g/L  |
|    | DL-Metionina                                    | 0,6 g/L  |
|    | Ácido ε-Diaminopimérico                         | 0,6 g/L  |
|    | Pantotenato de cálcio                           | 18 mg/L  |
| 25 | Cloridreto de tetraciclina                      | 25 mg/L  |

\* N,N,N-trimetilglicina

As células obtidas pela cultura de semente em um volume de 60 ml foram inoculados em 240 ml de meio tendo a composição anteriormente mencionada contida em uma mini jarra de 1 L de volume, e

cultivadas a uma temperatura de 34 °C, 36 °C, ou 38 °C e no pH 4,9. A cultura foi terminada quando toda a glicose no meio foi consumida. A concentração de ácido L-glutâmico foi medida para o sobrenadante de cultura apropriadamente diluído com água usando-se o Anbalisador Biotech (AS-210, Sakura SI).

Os resultados são mostrados na Tabela 1. Tornou-se evidente que o acúmulo de ácido L-glutâmico da cepa deficiente no gene *gcd*, a cepa NA1:: $\Delta$ *gcd*, foi melhorado comparado com a cepa comparativa, a cepa NA1.

Tabela 1: Ácido L-glutâmico produzido (g/jarra)

| Cepa                      | 34 °C | 36 °C | 38 °C |
|---------------------------|-------|-------|-------|
| NA1                       | 13,0  | 12,4  | 13.3  |
| NA1:: $\Delta$ <i>gcd</i> | 15,4  | 16,0  | 16.7  |

Exemplo 2: Produção de L-Cisteína usando a cepa deficiente no gene *gcd*

(1) Construção de bactéria que produz L-cisteína

DE modo a investigar o efeito da deleção do gene *gcd* sobre a produção de L-cisteína de *P. ananatis*, uma bactéria que produz L-cisteína de *P. ananatis* foi construída.

(1-1) Construção do plasmídeo de expressão do gene *yeaS*

Primeiro, um plasmídeo para construir a cepa anteriormente mencionada foi construído. O método para tal é descrito abaixo.

Pela PCR usando o DNA cromossômico da *E. coli* MG1655 (ATCC N<sup>o</sup> 47076) como um padrão assim como P11 (agctgagtcg acccccagga aaaattggtt aataac, SEQ ID NO: 51) e P12 (agctgagcat gctccaact gcgctaatga cgc, SEQ ID NO: 52) como iniciadores, um fragmento de DNA contendo uma região promotora do gene *nlpD* (daqui em diante o promotor do gene *nlpD* do tipo selvagem é aludido como “Pnlp0”) de cerca de 300 pares de base foi obtido. Nas extremidades 5’ e 3’ dos iniciadores anteriormente mencionados, sítios para as enzimas de restrição *SalI* e *PaeI* foram designados, respectivamente. O ciclo de PCR foi como segue: 95 °C por 3 minutos, depois 2 ciclos de 95 °C por 60 segundos, 50 °C por 30 segundos, e 72 °C por 40

segundos, 25 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 55 °C por 20 segundos, e 72 °C por 15 segundos, e 72 °C por 5 minutos como o ciclo final. O fragmento obtido foi tratado com Sall e PaeI, e inserido em pMIV-5JS (Patente Japonesa Aberta ao Público Nº 2008-99668) no sítio Sall-PaeI para se obter um  
5 plasmídeo pMIV-Pnlp0. A sequência de nucleotídeo do fragmento PaeI-Sall do promotor Pnlp0 inserido neste plasmídeo pMIV-Pnlp0 foi como mostrado na SEQ ID NO: 41.

Depois, pela PCR usando o DNA cromossômico de MG1655 como um padrão, assim como P13 (agctgatcta gaaaacagaa ttgcctggc ggc, SEQ ID NO: 53) e P14 (agctgaggat ccaggaagag ttgtagaaa cgc, SEQ ID NO: 10 54) como iniciadores, um fragmento de DNA contendo uma região terminadora do gene *rrnB* de cerca de 300 pares de base foi obtido. Nas extremidades 5' dos iniciadores anteriormente mencionados, sítios para as enzimas de restrição XbaI e BamHI foram planejadas, respectivamente. O  
15 ciclo de PCR foi como segue: 95 °C por 3 minutos, depois 2 ciclos de 95 °C por 60 segundos, 50 °C por 30 segundos, e 72 °C por 40 segundos, 25 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 59 °C por 20 segundos, e 72 °C por 15 segundos, e 72 °C por 5 minutos como o ciclo final. O fragmento obtido foi tratado com XbaI e BamHI, e inserido no pMIV-Pnlp0 no sítio XbaI-BamHI para se obter  
20 um plasmídeo pMIV-Pnlp0-ter.

Depois, pela PCR usando o DNA cromossômico da cepa MG1655 como um padrão, assim como P15 (agctgagtcg acgtgttcgc tgaatacggg gt, SEQ ID NO: 55) e P16 (agctgatcta gagaaagcat caggattgca gc, SEQ ID NO: 56) como iniciadores, um fragmento de DNA de cerca de 700  
25 pares de base contendo o gene *yeaS* foi obtido. Nas extremidades 5' dos iniciadores anteriormente mencionados, sítios para as enzimas de restrição Sall e XbaI foram planejados, respectivamente. O ciclo de PCR foi como segue: 95 °C por 3 minutos, depois 2 ciclos de 95 °C por 60 segundos, 50 °C por 30 segundos, e 72 °C por 40 segundos, 25 ciclos de 94 °C por 20

segundos, 55 °C por 20 segundos, e 72 °C por 15 segundos, e 72 °C por 5 minutos como o ciclo final. O fragmento obtido foi tratado com Sall e XbaI, e inserido no pMIV-Pnlp0-ter no sítio Sall-XbaI para se obter um plasmídeo pMIV-Pnlp0-YeaS3. Como descrito acima, uma unidade de expressão *yeaS* que compreende o vetor pMIV-5JS no qual o promotor *nlpD*, o gene *yeaS*, e o terminador *rrnB* foram ligados nesta ordem foi construída.

De modo a modificar a região -10 do promotor *nlpD* para torná-lo um promotor forte, a região -10 foi randomizada pelo seguinte método. A região promotora *nlpD* contém duas das regiões presumidas funcionar como promotores (Fig. 3), e elas são indicadas como *pnlp1* e *pnlp2*, respectivamente, no desenho. Pela PCR usando o plasmídeo pMIV-Pnlp0 como um padrão assim como P11 e P17 (atcgtgaaga tctttccag tgtnnagg ggtgccttgc acggnatna ngctactgg (“n” significa que o resíduo correspondente pode ser qualquer um de a, t, g e c), SEQ ID NO: 57) como iniciadores, um fragmento de DNA em que a região -10 contida na sequência de extremidade 3’ do promotor *nlpD* (aludido como -10(Pnlp1)) foi randomizada foi obtido (Fig. 3). O ciclo de PCR foi como segue: 95 °C por 3 minutos, depois 2 ciclos de 95 °C por 60 segundos, 50 °C por 30 segundos, e 72 °C por 40 segundos, 25 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 60 °C por 20 segundos, e 72 °C por 15 segundos, e 72 °C por 5 minutos como o ciclo final.

Além disso, pela PCR usando o plasmídeo pMIV-Pnlp0 como um padrão assim como P12 e P18 (tggaaaagat cttcannnnn cgctgacctg cg (“n” significa que o resíduo correspondente pode ser qualquer um de a, t, g e c), SEQ ID NO: 58) como iniciadores, um fragmento de DNA em que a região -10 contida na sequência de extremidade 5’ do promotor *nlpD* (aludido como -10(Pnlp2)) foi randomizada foi similarmente obtido (Fig. 3). O ciclo de PCR foi como segue: 95 °C por 3 minutos, depois 2 ciclos de 95 °C por 60 segundos, 50 °C por 30 segundos, e 72 °C por 40 segundos, 25 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 60 °C por 20 segundos, e 72 °C por 15 segundos,

e 72 °C por 5 minutos como o ciclo final.

Os fragmentos de extremidades 3' e 5' obtidos puderam ser ligados usando os sítios BglII planejados nos iniciadores P17 e P18, e o tamanho natural do promotor nlpD em que duas regiões -10 foram randomizadas puderam ser construídos por tal ligação. Pela PCR usando este fragmento como um padrão assim como P11 e P12 como iniciadores, um fragmento de DNA que corresponde a um promotor de nlpD do tipo modificado do tamanho natural foi obtido. O ciclo de PCR foi como segue: 95 °C por 3 minutos, depois 2 ciclos de 95 °C por 60 segundos, 50 °C por 30 segundos, e 72 °C por 40 segundos, 12 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 60 °C por 20 segundos, e 72 °C por 15 segundos, e 72 °C por 5 minutos como o ciclo final.

O fragmento amplificado foi tratado com as enzimas de restrição Sall e PaeI, para os quais sítios foram planejados nas extremidades 5's dos iniciadores, e inseridos no plasmídeo pMIV-Pnlp0-YeaS3 semelhante tratado com Sall e PaeI para substituir o Pnlp mutante para a região promotora de nlpD do tipo selvagem (Pnlp0) no plasmídeo. A partir de tais plasmídeos, um tendo a sequência promotora (Pnlp8) mostrada na Fig. 3 foi selecionada, e designada pMIV-Pnlp8-YeaS7. A sequência de nucleotídeo do fragmento PaeI-Sall do promotor Pnlp8 inserido neste plasmídeo foi como mostrado na SEQ ID NO: 42.

#### (1-2) Construção de plasmídeo de expressão de cysE variante

Depois, de pMW-Pomp-cysE5 (WO2005/007841), a porção do cassete Pomp-cysE5 foi excisada com PaeI e SacI, e inserida no mesmo sítio de pMIV-5JS para construir pMIV-Pomp-CysE5. pMW-Pomp-cysE5 foi um plasmídeo obtido pela inserção do gene cysE5 que codifica o SAT mutante ligado com o promotor do gene ompC em pMW118. A partir de pACYC184 (GenBank/EMBL número de acesso X06403, disponível da NIPPON GENE), o gene de resistência à tetraciclina foi excisado com XbaI e

Eco88I, e este fragmento de gene foi tratado com o fragmento Klenow, e depois inserido no pMIV-Pomp-CysE5 no sítio PvuI para construir pMT-Pomp-CysE5. Depois, pMIV-Pnlp8-YeaS7 foi digerido com HindIII, terminado de modo abrupto com o fragmento Klenow, e depois digerido com NcoI para excisar um fragmento contendo o cassette do terminador Pnlp8-YeaS-rrnB e o marcador de resistência ao cloranfenicol. Este fragmento foi ligado com um fragmento de digestão SmaI e NcoI de pMT-Pomp-CysE5 similarmente tendo pMIV-5JS como a cadeia principal para construir pMT-EY2. pMT-EY2 é um plasmídeo tendo o cassette terminador Pnlp8-YeaS-rrnB e o cassette Pomp-CysE5 em um plasmídeo.

(1-3) Introdução de cysE5 e yeaS na cepa SC17 de *P. ananatis* pMT-EY2 descrito acima tem os sítios de ligação do fago Mu originado de pMIV-5JS (Patente Japonesa Aberta ao Público Nº 2008-99668). Permitindo-se que este plasmídeo coexista com o plasmídeo auxiliar pMH10 tendo Mu transposase (Zimenkov D. *et al.*, *Biotechnologiya and (em Russo)*, 6, 1-22 (2004)) na mesma célula, o cassette do terminador PompC-cysE5-Pnlp8-YeaS-rrnB incluindo o marcador de resistência ao cloranfenicol localizado entre os sítios de ligação do fago Mu neste plasmídeo pMT-EY2 pode ser inserido no cromossoma da cepa SC17 de *P. ananatis* (Patente U.S. Nº 6.596.517). Além disso, visto que o marcador de resistência ao cloranfenicol localizado no plasmídeo pMT-EY2 tem uma estrutura que existe entre dois sítios de ligação do fago  $\lambda$  ( $\lambda$ attR e  $\lambda$ attL), o marcador de resistência ao cloranfenicol pode ser excisado e removido pelo método descrito mais tarde.

Primeiro, uma cepa SC17 introduzida com pMH10 pela eletroporação foi selecionada pela cultura durante a noite a 30 °C no meio de LB ágar contendo 20 mg/L de canamicina. O transformante obtido foi cultivado a 30 °C, e pMT-E2 foi ainda introduzido nesta cepa pela eletroporação. A esta cepa transformada tanto com pMH10 quanto com pMT-

EY2 foi dado um choque térmico com as condições de 42 °C por 20 minutos, e as colônias de cepas resistentes ao cloranfenicol foram selecionadas no meio LB agar contendo 20 mg/L de cloranfenicol. A temperatura da cultura para esta seleção foi de 39 °C. Como descrito acima, cerca de 50 clones foram obtidos, e a cura de pMH10 e pMT-EY2 foi realizada cultivando-se cada clone a 39 °C por 48 horas no meio de LB ágar. Uma cepa mostrando a resistência ao cloranfenicol devido à inserção do cassete no cromossoma e mostrando sensibilidades à canamicina e ampicilina devido à cura de ambos os plasmídeos foi obtida. Além disso, foi confirmado que o cassete objeto foi inserido no cromossoma da cepa obtida pela PCR usando o DNA cromossômico desta cepa como um padrão assim como P11 e P16 como iniciadores. Todos os clones obtidos foram designados EY01 a EY50, respectivamente, e a cultura de produção de L-cisteína foi realizada usando-se as cepas de EY01 a EY50. Para a cultura, o método descrito mais tarde foi usado. A cepa EY19 foi selecionada, que foi um clone que produziu L-cisteína na quantidade máxima como um resultado da cultura.

O marcador de resistência ao cloranfenicol introduzido na cepa EY19 foi removido com um sistema de excisão derivado do fago  $\lambda$ . Especificamente, a cepa EY19 foi transformada com pMT-Int-Xis2 (WO2005/010175) que carrega o gene Int-Xis do fago  $\lambda$ , e uma cepa EY19(s) que mostra sensibilidade ao cloranfenicol foi obtida a partir dos transformantes obtidos.

(1-4) Preparação da cepa intensificada na expressão do gene cysPTWA a partir da cepa EY19(s)

Depois, de modo a intensificar a expressão do gene cysPTWA, o promotor localizado a montante do cacho de gene cysPTWA no cromossoma foi substituído com o promotor potente Pnlp8 anteriormente mencionado. Um fragmento de DNA contendo o promotor nlp8 de cerca de 300 pares de base foi obtido primeiro pela PCR usando pMIV-Pnlp8-YeaS7

como um padrão assim como P11 e P12. O ciclo de PCR foi como segue: 95 °C por 3 minutos, depois 2 ciclos de 95 °C por 60 segundos, 50 °C por 30 segundos, e 72 °C por 40 segundos, 20 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 59 °C por 20 segundos, e 72 °C por 15 segundos, e 72 °C por 5 minutos como o ciclo final.

O fragmento de DNA amplificado contendo o promotor nlp8 foi tratado com o fragmento de Klenow, inserido no plasmídeo pMW118- ( $\lambda$ attL-KmR- $\lambda$ attR) (WO2006/093322A2) digerido com XbaI e depois tratado com o fragmento Klenow para obter um plasmídeo pMW-Km-Pnlp8. Pela PCR usando pMW-Km-Pnlp8 como um padrão assim como iniciadores P19 (tcgctcaccg attttttca tcgctggtaa ggctattat cccccaggaa aaattggta, SEQ ID NO: 59) e P20 (ttcacaccg ctcaaccgca gggcataacc ggcccttgaa gcctgcttt ttatactaag ttg, SEQ ID NO: 60), um fragmento de DNA de cerca de 1,6 kb contendo o cassete Km-Pnlp8 foi amplificado. O ciclo de PCR para esta amplificação foi como segue: 95 °C por 3 minutos, depois 2 ciclos de 95 °C por 60 segundos, 50 °C por 30 segundos, e 72 °C por 40 segundos, 30 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 54 °C por 20 segundos, e 72 °C for 90 segundos, e 72 °C por 5 minutos como o ciclo final. Em ambos os iniciadores, uma sequência que serve como um alvo no cromossoma para inserir um fragmento objeto pela integração dependente de  $\lambda$  (o método chamado de “integração induzida por Red” (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, vol. 97, Nº 12, pp. 6640-6645)) (neste caso, uma sequência próxima ao promotor de cysPTWA) foi designada. Portanto, se o fragmento de DNA obtido é inserido na cepa objeto por esta integração dependente de  $\lambda$ , é fornecida uma estrutura que Km-Pnlp8 é inserido imediatamente antes do gene cysPTWA no cromossoma, e o gene cysPTWA é ligado com o promotor nlp8. A sequência de nucleotídeo do grupo de gene cysPTWA é mostrada na SEQ ID NO: 43, e as sequências de aminoácido codificadas pelos genes cysP, cysT e cysW são mostradas nas SEQ ID NOS: 44 a 46, respectivamente. A sequência de nucleotídeo do gene

cysA e a sequência de aminoácido codificada por este gene são mostradas nas SEQ ID NOS: 47 e 48, respectivamente.

A cepa SC17(0)/RSF-Red-TER de *P. ananatis* é uma cepa hospedeira para realizar eficientemente a integração dependente de  $\lambda$ , e é uma  
5 cepa obtida pela introdução do plasmídeo auxiliar RSF-Red-TER que expressa os genes *gam*, *bet* e *exo* (daqui em diante aludidos como “genes  $\lambda$  Red”) na cepa SC17(0), que é uma cepa de *P. ananatis* resistente ao produto de gene  $\lambda$  Red (WO2008/075483). A cepa SC17(0) foi depositada na Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM), GNII Genetika  
10 (address: Rússia, 117545 Moscou, 1 Dorozhny proezd. 1) em 21 de setembro de 2005 com um número de acesso de VKPM B-9246. Um método para construir o plasmídeo RSF-Red-TER é divulgado em detalhes na WO2008/075483.

A cepa SC17(0)/RSF-Red-TER anteriormente mencionada foi  
15 cultivada com a adição de IPTG para induzir a expressão dos genes  $\lambda$  Red para preparar células para a eletroporação. O fragmento de DNA objeto anteriormente mencionado foi introduzido nestas células pela eletroporação, e uma cepa recombinante na qual o promotor *nlp8* foi inserido a montante do gene *cysPTWA* pela integração dependente de  $\lambda$  foi obtida usando-se a  
20 resistência à canamicina como um marcador. Pela PCR usando o DNA cromossômico da cepa obtida como um padrão, assim como P21 (ctttgtcctttagtgaagg, SEQ ID NO: 61) e P22 (agctgatcta gaagctgact cgagttaatg gcctcccaga cgac, SEQ ID NO: 62) como iniciadores, foi confirmado que a  
25 estrutura objeto, Km-Pnlp8-cysPTWA, foi formada, e esta cepa foi designada cepa SC17(0)-Pnlp8-PTWA.

Depois, o DNA cromossômico da cepa SC17(0)-Pnlp8-PTWA foi purificado, e 10  $\mu$ g deste DNA cromossômico foram introduzidos na cepa EY19(s) pela eletroporação para se obter uma cepa resistente à canamicina. A amplificação foi realizada pela PCR usando o DNA cromossômico da cepa

obtida como um padrão assim como P21 e P22 como iniciadores para confirmar que a estrutura de Km-Pnlp8-cysPTWA foi introduzida no cromossoma da cepa EY19(s). A cepa obtida como descrito acima foi designada cepa EYP197. Além disso, o marcador de resistência à canamicina foi removido do cromossoma usando-se pMT-Int-Xis2 como descrito acima, e a cepa que tornou-se sensível à canamicina foi designada cepa EYP197(s).

(1-5) Preparação da cepa mutante que carrega o gene da 3-fosfoglicerato desidrogenase (serA348) da cepa EYP197(s)

Como um gene da 3-fosfoglicerato desidrogenase a ser introduzido na bactéria que produz L-cisteína, o gene serA348 que é um gene que codifica a 3-fosfoglicerato desidrogenase de *Pantoea ananatis* e que codifica uma enzima mutante incluindo uma mutação para a substituição de um resíduo de alanina para o resíduo de asparagina na 348<sup>a</sup> posição (N348A) (J. Biol. Chem., 1996, 271 (38):23235-8) foi construído pelo seguinte método.

A sequência do gene serA do tipo selvagem derivado da *Pantoea ananatis* é mostrada na SEQ ID NO: 49. A sequência de aminoácido codificada por este gene é mostrada na SEQ ID NO: 50. De modo a obter um fragmento de DNA do lado da extremidade 3' do gene serA no qual a mutação anteriormente mencionada foi introduzida, a PCR foi realizada usando-se o DNA cromossômico da cepa SC17 como um padrão assim como P23 (agctgagtcg acatggcaaa ggtatcactg gaa, SEQ ID NO: 63) e P24 (gagaacgccc gggcgggctt ctggaatgatg cagc, SEQ ID NO: 64) como iniciadores (95 °C por 3 minutos, depois 2 ciclos de 95 °C por 60 segundos, 50 °C por 30 segundos, e 72 °C por 40 segundos, 25 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 60 °C por 20 segundos, e 72 °C por 60 segundos, e 72 °C por 5 minutos como o ciclo final). Depois, de modo a se obter um fragmento de DNA do lado da extremidade 5' no qual a mutação foi introduzida, a PCR foi realizada da mesma maneira usando-se o DNA cromossômico da cepa SC17 como um padrão assim como P25 (agctgatcta gacgtgggat cagtaaagca gg, SEQ ID NO:

65) e P26 (aaaaccgccc gggcgttctc ac, SEQ ID NO: 66) como iniciadores (95 °C por 3 minutos, depois 2 ciclos de 95 °C por 60 segundos, 50 °C por 30 segundos, e 72 °C por 40 segundos, 20 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 60 °C por 20 segundos, e 72 °C por 20 segundos, e 72 °C por 5 minutos como o ciclo final). Ambos os fragmentos de PCR obtidos foram tratados com a enzima de restrição SmaI, e ligados usando-se uma DNA ligase para se obter um fragmento de DNA que corresponde a um gene serA mutante de tamanho natural incluindo a mutação objeto (N348A). Este fragmento de DNA foi amplificado pela PCR usando-o como um padrão assim como P23 e P25 como iniciadores (95 °C por 3 minutos, depois 2 ciclos de 95 °C por 60 segundos, 50 °C por 30 segundos, e 72 °C por 40 segundos, 15 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 60 °C por 20 segundos, e 72 °C por 75 segundos, e 72 °C por 5 minutos como o ciclo final). Os sítios das enzimas de restrição Sall e XbaI designados nos iniciadores P23 e P25 foram tratados com Sall e XbaI, e o fragmento foi inserido no pMIV-Pnlp8-ter similarmente tratado com Sall e XbaI para preparar pMIV-Pnlp8-serA348.

A pMIV-Pnlp8-serA348 construída carregou o sítio de ligação de Mu que se origina em pMIV-5JS (Patente Japonesa Aberta ao Público Nº 2008-99668). Usando-se este plasmídeo junto com o plasmídeo auxiliar pMH10 tendo Mu transposase, o cassete do terminador Pnlp8-serA348-rnB incluindo o marcador de resistência ao cloranfenicol pode ser inserido no cromossoma da cepa SC17 de *P. ananatis*, como descrita acima. O plasmídeo pMIV-Pnlp8-serA348 e pMH10 foram introduzidos na cepa SC17(0) para se obter uma cepa na qual o cassete do terminador Pnlp8-serA348-rnB foi inserido no cromossoma. Pela PCR usando os iniciadores P11 e P25, foi confirmado que o cassete objeto existia nas células. A atividade de 3-fosfoglicerato desidrogenase nos extratos celulares de 50 dos clones obtidos foi medida, e uma cepa que mostrou a atividade máxima foi selecionado, e designada cepa SC17int-serA348. Depois, 10 µg do DNA cromossômico da

cepa SC17int-serA348 foi introduzida na cepa EYP197(s) pela eletroporação para se obter uma cepa resistente ao cloranfenicol, e pela PCR usando os iniciadores P11 e P25, foi confirmado que a estrutura de Pnlp8-serA348 foi introduzida junto com o marcador de resistência ao cloranfenicol no cromossoma da cepa EYP197(s). A cepa obtida como descrito acima foi designada cepa EYPS1976.

Pelo método anteriormente mencionado para remover o marcador usando pMT-Int-Xis2, o marcador de resistência ao cloranfenicol foi removido, e a cepa que tornou-se sensível ao cloranfenicol foi designada cepa EYPS1976(s).

(1-6) Preparação da cepa deficiente no gene *gcd* a partir da cepa EYPS1976(s)

O DNA genômico foi preparado a partir da cepa SC17(0):: $\Delta$ *gcd* descrita no Exemplo 1, e introduzida na cepa EYPS1976(s) pela eletroporação, e uma cepa deficiente no gene *gcd* (cepa EYPS1976 $\Delta$ *gcd*) foi obtida a partir da cepa EYPS1976(s) usando-se a resistência à canamicina como um marcador.

(2) Cultura da cepa EYPS1976(s) e da cepa EYPS1976 $\Delta$ *gcd* de bactérias que produzem L-cisteína

De modo a investigar o efeito da deleção do gene *gcd* sobre a produção fermentativa de L-cisteína e O-acetilserina, que é um precursor da L-cisteína, a sua produção fermentativa foi realizada usando-se a cepa EYPS1976(s) e a cepa EYPS1976 $\Delta$ *gcd* deficiente no gene *gcd* da bactéria que produz L-cisteína derivada da cepa EYPS1976(s), e quantidades de L-cisteína e O-acetilserina produzidas foram comparadas. Para a cultura, um meio de produção de L-cisteína tendo a seguinte composição foi usado.

Meio de produção de L-cisteína (as concentrações dos componentes são concentrações finais)

Componente 1:

|    |   |           |
|----|---|-----------|
|    | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>     | 15 g/L    |
|    | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 1,5 g/L   |
|    | MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 1 g/L     |
|    | Cloridreto de tiamina                               | 0,1 mg/L  |
| 5  | Componente 2:                                       |           |
|    | FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 1,7 mg/L  |
|    | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 0,15 mg/L |
|    | CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                | 0,7 mg/L  |
|    | MnCl·4H <sub>2</sub> O                              | 1,6 mg/L  |
| 10 | ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 0,3 mg/L  |
|    | CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O                | 0,25 mg/L |
|    | Componente 3:                                       |           |
|    | Triptona  | 0,6 g/L   |
|    | Extrato de levedura                                 | 0,3 g/L   |
| 15 | Cloreto de sódio                                    | 0,6 g/L   |
|    | Componente 4:                                       |           |
|    | Carbonato de cálcio                                 | 20 g/L    |
|    | Componente 5:                                       |           |
|    | Monocloridreto de L-histidina                       |           |
| 20 | monoidratado  | 135 mg/L  |
|    | Componente 6:                                       |           |
|    | Tiosulfato de sódio                                 | 6 g/L     |
|    | Componente 7:                                       |           |
|    | Cloridreto de piridoxina                            | 2 mg/L    |
| 25 | Componente 8:                                       |           |
|    | Glicose   | 40 g/L    |

Para estes componentes, foram preparadas soluções de estoque de 10 vezes de concentração (componente 1), 1000 vezes de concentração (componente 2), 100/6 vezes de concentração (componente 3), 100 vezes de

concentração (componente 5), 350 g/L (componente 6), 1000 vezes de  
concentração (componente 7), e 10 vezes de concentração (componente 8),  
estas foram misturadas no momento de uso, e o volume definido foi obtido  
com água esterilizada para atingir as concentrações finais. A esterilização foi  
5 realizada pela autoclavagem a 110 °C por 30 minutos (componentes 1, 2, 3, 5  
e 8), esterilização de ar quente a 180 °C por 5 horas ou mais longo  
(componente 4), ou esterilização em filtro (componentes 6 e 7).

A cultura de produção de L-cisteína foi realizada como segue.  
A cepa EYPS1976(s) e a cepa EYPS1976 $\Delta$ gcd foram cada uma aplicadas e  
10 espalhadas no meio de LB ágar para neutralizar a pré-cultura durante a noite a  
34 °C, e depois as células que correspondem a 7 cm na placa foram raspadas  
duas vezes com uma alça de inoculação de 10  $\mu$ l de tamanho (NUNC Blue  
Loop), e inoculada em 2 ml do meio de produção de L-cisteína contido em  
um tubo de teste grande (diâmetro interno: 23 mm, comprimento: 20 cm)  
15 substancialmente nas mesmas quantidades de célula no tempo de início da  
cultura.

As cepas foram cultivadas a 34 °C ou 38 °C com agitação, e a  
cultura foi terminada depois de 24 horas. Neste ponto, foi confirmado que a  
glicose como a fonte de carbono foi completamente consumida. A L-cisteína  
20 produzida no meio foi quantificada pelo método descrito por Gaitonde, M. K.  
(Biochem. J., Agosto de 1967, 104(2): 627-33). A OAS (O-acetilserina)  
produzida no meio foi quantificada pela HPLC. Nesta quantificação, um  
método de converter OAS em NAS (N-acetilserina) mais estável pela diluição  
da amostra com 200 mM de Tris-HCl (pH 9,0) e detectando NAS foi usado.  
25 As condições da HPLC foram como segue.

Coluna: Inertsil ODS-3 (coluna hidrofóbica, GL Science Co.,  
Ltd.)

Taxa de fluxo do tampão: 1,0 ml/minuto

Temperatura da coluna: 40 °C

Detecção: UV 210 nm

Volume de aplicação da amostra: 10 ml

Tampão: 0,1 M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4$  (pH 2,2), 5 mM de 1-octanossulfonato de sódio

5 O experimento foi realizado em hexaplicata para cada cepa, e os resultados foram indicados na Tabela 2 com as médias e desvios padrão. Como mostrado na Tabela 2, foi descoberto que a deleção do gene *gcd* foi eficaz para aumentar L-cisteína e O-acetilserina em ambas as temperaturas de cultura de 34 °C e 38 °C. O grau do aumento foi mais acentuável a 38 °C, e  
10 assim foi descoberto que a mesma foi especialmente eficaz para a cultura na temperatura alta. Foi também descoberto que a mesma foi também eficaz para aumentar a quantidade de célula (OD) a 38 °C.

Tabela 2: Capacidade de produzir L-Cisteína e NAS da cepa deficiente no gene *gcd*

|       |                                 | Cys (g/L)   | NAS (g/L)   | OD600       |
|-------|---------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| 34 °C | EYPS1976(s)                     | 1,02 ± 0,16 | 0,81 ± 0,10 | 15,1 ± 0,50 |
|       | EYPS1976<br>$\Delta$ <i>gcd</i> | 1,29 ± 0,16 | 1,01 ± 0,10 | 15,0 ± 0,24 |
| 38 °C | EYPS1976(s)                     | 0,31 ± 0,12 | 0,54 ± 0,11 | 11,1 ± 1,68 |
|       | EYPS1976<br>$\Delta$ <i>gcd</i> | 0,95 ± 0,21 | 0,87 ± 0,10 | 19,2 ± 0,57 |

15 Explicação da Listagem de Sequência

SEQ ID NO: 1: Sequência de nucleotídeo do gene *gcd* de *Pantoea ananatis*

SEQ ID NO: 2: Sequência de aminoácido de GCD de *Pantoea ananatis*

20 SEQ ID NO: 3: Sequência de nucleotídeo do gene *hisD* de *Pantoea ananatis*

SEQ ID NO: 4: Iniciador para a amplificação de fragmento para a integração do gene  $\text{Km}^r$  no gene *hisD*

25 SEQ ID NO: 5: Iniciador para a amplificação do fragmento para a integração do gene  $\text{Km}^r$  no gene *hisD*

SEQ ID NO: 6: Iniciador para a amplificação do gene *cat*

SEQ ID NO: 7: Iniciador para a amplificação do gene *cat*

SEQ ID NO: 8: Iniciador para a amplificação do gene *sacB*

SEQ ID NO: 9: Iniciador para a amplificação do gene *sacB*

SEQ ID NO: 10: Iniciador para a amplificação do fragmento

5 de DNA incluindo o promotor PlacUV5

SEQ ID NO: 11: Iniciador para a amplificação do fragmento

de DNA incluindo o promotor PlacUV5

SEQ ID NO: 12: Iniciador para a amplificação do fragmento

de DNA incluindo os genes  $\lambda$ Red $\alpha\beta\gamma$  e tL3

10 SEQ ID NO: 13: Iniciador para a amplificação do fragmento  
de DNA incluindo os genes  $\lambda$ Red $\alpha\beta\gamma$  e tL3

SEQ ID NO: 14: Iniciador para a amplificação do fragmento

de DNA incluindo o promotor PlacUV5 e TrnB

SEQ ID NO: 15: Iniciador para a amplificação do fragmento

15 de DNA incluindo o promotor PlacUV5 e TrnB

SEQ ID NO: 16: Iniciador para a amplificação de attL

SEQ ID NO: 17: Iniciador para a amplificação de attL

SEQ ID NO: 18: Sequência de nucleotídeo de attL

SEQ ID NO: 19: Iniciador para a amplificação de attR

20 SEQ ID NO: 20: Iniciador para a amplificação de attR

SEQ ID NO: 21: Sequência de nucleotídeo de attR

SEQ ID NO: 22: Iniciador para a amplificação do fragmento

de DNA incluindo o gene *bla*

SEQ ID NO: 23: Iniciador para a amplificação do fragmento

25 de DNA incluindo o gene *bla*

SEQ ID NO: 24: Iniciador para a amplificação do fragmento

de DNA incluindo *ter\_rrnB*

SEQ ID NO: 25: Iniciador para a amplificação do fragmento

de DNA incluindo *ter\_rrnB*

SEQ ID NO: 26: Sequência de nucleotídeo do fragmento de DNA incluindo o terminador ter\_thrL

SEQ ID NO: 27: Iniciador para a amplificação do fragmento de DNA incluindo o terminador ter\_thrL

5 SEQ ID NO: 28: Iniciador para a amplificação do fragmento de DNA incluindo o terminador ter\_thrL

SEQ ID NO: 29: Iniciador para a amplificação do gene gltA exceto para a ORF

10 SEQ ID NO: 30: Iniciador para a amplificação do gene gltA exceto para a ORF

SEQ ID NO: 31: Iniciador para a amplificação do gene prpC

SEQ ID NO: 32: Iniciador para a amplificação do gene prpC

SEQ ID NO: 33: Iniciador para a deleção do gene gcd

SEQ ID NO: 34: Iniciador para a deleção do gene gcd

15 SEQ ID NO: 35: Iniciador para confirmar a deleção do gene gcd

SEQ ID NO: 36: Iniciador para confirmar a deleção do gene gcd

20 SEQ ID NO: 37: Sequência de nucleotídeo do gene cysE do tipo selvagem

SEQ ID NO: 38: Sequência de aminoácido da serina acetiltransferase codificada pelo cysE do tipo selvagem

SEQ ID NO: 39: Sequência de nucleotídeo do gene yeaS do tipo selvagem

25 SEQ ID NO: 40: Sequência de aminoácido de YeaS do tipo selvagem

SEQ ID NO: 41: Sequência do nucleotídeo de Pnlp0

SEQ ID NO: 42: Sequência do nucleotídeo de Pnlp8

SEQ ID NO: 43: Sequência de nucleotídeo do grupo de gene

cysPTWA

SEQ ID NO: 44: Sequência de aminoácido codificada pelo

gene cysP

SEQ ID NO: 45: Sequência de aminoácido codificada pelo

5 gene cysT

SEQ ID NO: 46: Sequência de aminoácido codificada pelo

gene cysW

SEQ ID NO: 47: Sequência de nucleotídeo do gene cysA

SEQ ID NO: 48: Sequência de aminoácido codificada pelo

10 gene cysA

SEQ ID NO: 49: Sequência de nucleotídeo do gene serA do

tipo selvagem de *Pantoea ananatis*

SEQ ID NO: 50: Sequência de aminoácido codificada pelo

gene serA do tipo selvagem de *Pantoea ananatis*

15

SEQ ID NOS: 51 a 66: Iniciadores P11 a P26

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir um L-aminoácido, caracterizado pelo fato de que compreende cultivar uma bactéria que pertença à família *Enterobacteriaceae* e tenha uma capacidade para produzir L-aminoácido em um meio para produzir e acumular o L-aminoácido em cultura, e

coletar o L-aminoácido da cultura,

em que a bactéria inerentemente tem uma atividade de uma glicose desidrogenase que usa pirroloquinolina quinona como uma coenzima, mas a bactéria foi modificada de modo que a atividade da glicose desidrogenase é reduzida pela inativação do gene *gcd* que codifica glicose desidrogenase, e

em que a bactéria é uma bactéria que pertence ao gênero *Pantoea*.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o gene *gcd* é um DNA que possui a sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO: 1.

3. Método de acordo com as reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o L-aminoácido é selecionado do grupo que consiste de ácido L-glutâmico, L-lisina, L-treonina, L-arginina, L-histidina, L-isoileucina, L-valina, L-leucina, L-fenilalanina, L-tirosina, L-triptofano e L-cisteína.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o L-aminoácido é o ácido L-glutâmico ou L-cisteína.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o L-aminoácido é o ácido L-glutâmico, e atividade ou atividades de um ou mais tipos de enzimas selecionadas do grupo que consiste de citrato sintase, metil citrato sintase, fosfoenolpiruvato carboxilase, e glutamato desidrogenase são intensificadas na bactéria pela introdução de um gene ou genes que codificam um ou mais tipos dessas enzimas na bactéria e/ou pela

modificação de um promotor ou promotores do gene ou genes.

6. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o L-aminoácido é L-cisteína, e a atividade ou atividades de um ou mais tipos de enzimas selecionadas do grupo que consiste de 3-fosfoglicerato desidrogenase, serina acetiltransferase, e sistema de transporte de sulfato/tiosulfato são intensificados pela introdução de um gene ou genes codificando um ou mais tipos dessas enzimas na bactéria e/ou pela modificação do promotor ou promotores do gene ou genes, e/ou a expressão de um gene *yeaS* é intensificada pela introdução do gene *yeaS* na bactéria e/ou pela modificação do promotor do gene *yeaS*.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a bactéria é *Pantoea ananatis*.

FIG. 1

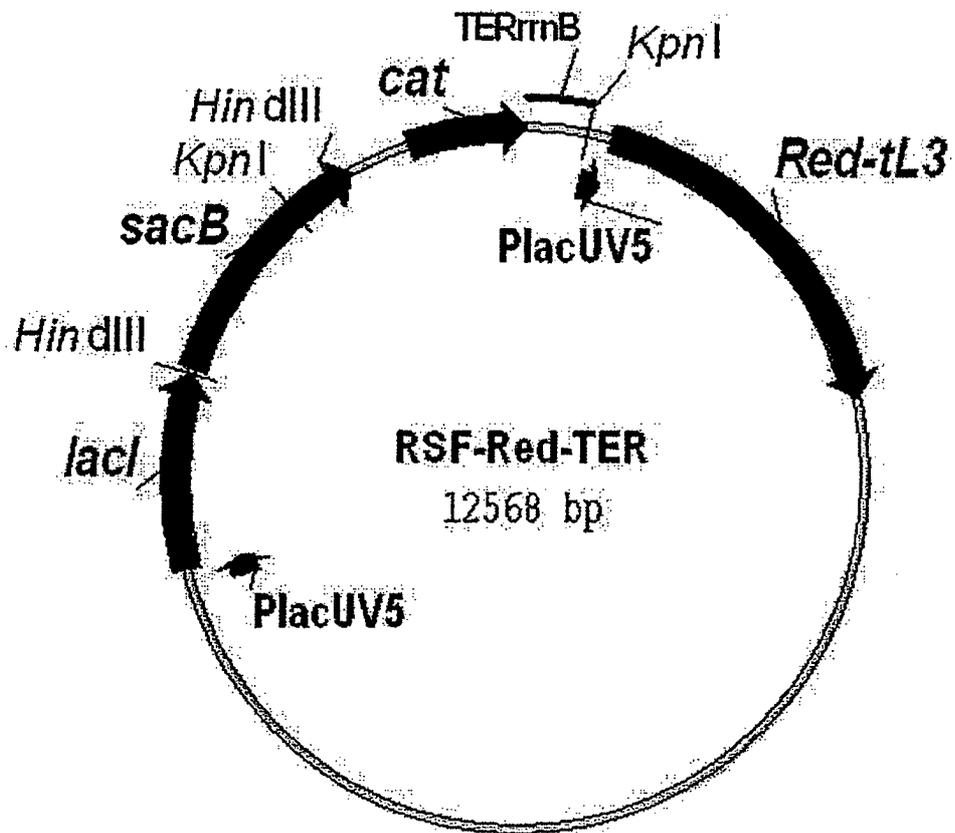
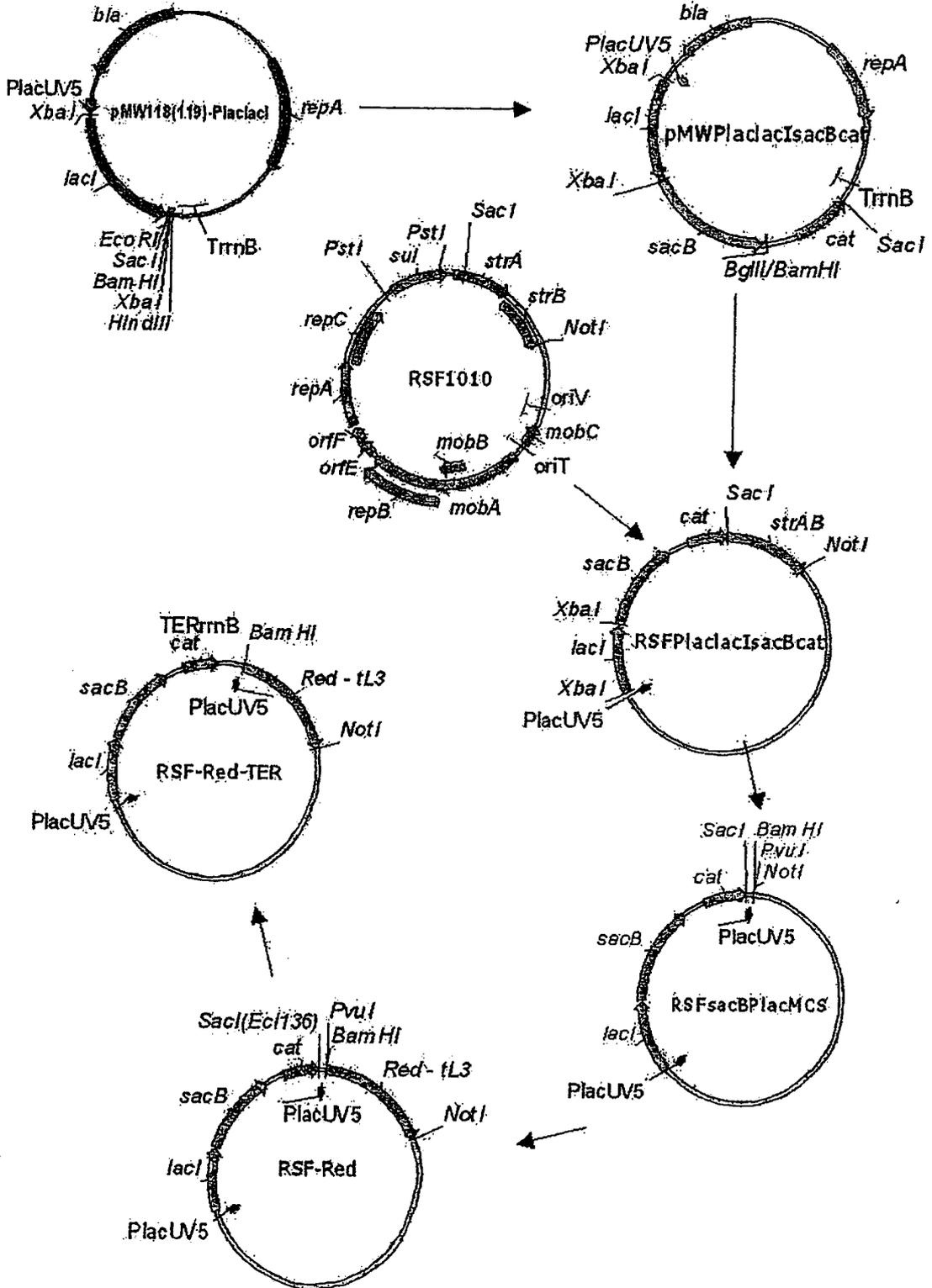


FIG. 2



### Sequência de promotor nativo Pnlp

```

                                -35(Pnlp2)                                -10(Pnlp2)
aaaacgtgaggaaatacctggatTTTTcctggTtattttgccgcaggTcagcgtatcgtg
                                -35(Pnlp1)                                -10(Pnlp1)  transcr start
aagatctttccagtgttcagtagggtgcctTgcacggtaattatgtcactggTtattaa
                                M   S
ccaatttttctgggggataaatgagc

```

**FIG. 3**