

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI9917719-6 A2**

(62) Data de Depósito do Pedido Original:
PI9917719 - 28/12/1999

(22) Data de Depósito: 28/12/1999

(43) **Data da Publicação: 10/08/2010**
(RPI 2066)



(51) Int.Cl.:

C12P 13/04

C12N 1/21

C12N 15/67

C12R 1/185

Notificação de Depósito de Pedido Dividido:
RPI 2066 de 10/08/2010

(54) Título: **BACTÉRIA PERTENCENTE AO GÊNERO ESCHERICHIA E QUE TEM UMA CAPACIDADE PARA PRODUZIR UM L-AMINOÁCIDO, E, PROCESSO PARA PRODUZIR UM L-AMINOÁCIDO.**

(57) Resumo: Uma bactéria pertencente ao gênero Escherichia e que tem uma capacidade para produzir um L-aminoácido, em que a capacidade para produzir o L-aminoácido é aumentada aumentando-se uma quantidade de expressão de pelo menos uma proteína de excreção de L-aminoácido e um processo para produzir L-aminoácido usando a bactéria.

(30) Prioridade Unionista: 30/12/1998 RU 98124016, 09/03/1999 RU 99104431, 09/03/1999 RU 99104431, 30/12/1998 RU 98124016

(73) Titular(es): Ajinomoto Co., Inc

(72) Inventor(es): Irina Lyvovna Tokhmakova, Kazuo Nakanishi, Natalia Pavlovna Zakataeva, Petr Vladimirovich Troshin, Vitaliy Arkadieovich Livshits, Vladimir Veniaminovich Aleshin

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.



"BACTÉRIA PERTENCENTE AO GÊNERO *ESCHERICHIA* E QUE TEM UMA CAPACIDADE PARA PRODUZIR UM L-AMINOÁCIDO, E, PROCESSO PARA PRODUZIR UM L-AMINOÁCIDO"

Dividido do PI 9906287-9, depositado em 28/12/1999.

5

CAMPO TÉCNICO

A presente invenção diz respeito a um processo para produzir um aminoácido. Em particular, a presente invenção diz respeito a uma bactéria que produza L-aminoácido pertencente ao gênero *Escherichia* e a um processo para produzir L-aminoácidos, mais especificamente, ácido L-glutâmico, L-lisina, L-treonina, L-alanina, L-histidina, L-prolina, L-arginina, L-valina e L-isoleucina, usando-se a bactéria.

FUNDAMENTOS DA TÉCNICA

Para a produção de um L-aminoácido por fermentação, uma cepa isolada do mundo natural ou um mutante artificial da cepa foi usado para melhorar a produtividade. Por exemplo, no caso da L-lisina, muitos mutantes artificiais que produzem L-lisina são conhecidos e a maioria deles são mutantes resistentes a S-2-aminoetilcisteína (AEC) e pertencem ao gênero *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Bacillus* ou *Escherichia*. Também foram propostas várias técnicas para aumentar a produção de aminoácido, tal como o uso de um transformante obtido usando-se um DNA recombinante (Patente U.S. No. 4.278.765).

As técnicas são, na maior parte, fundamentadas na intensificação de uma atividade de uma enzima envolvida em um caminho biossintético de aminoácido, a conversão da enzima àquela dessensibilizada na inibição e outras (como para a bactéria pertencente ao gênero *Escherichia*, ver o Pedido de Patente Japonês Aberto ao Público No. 56-18596 (1981) e a Publicação Internacional No. WO 95/16042).

Por outro lado, como um exemplo da melhora da produtividade de aminoácido pela intensificação de uma proteína de excreção de aminoácido, é conhecida uma bactéria pertencente ao gênero

Corynebacterium em que um gene de excreção de L-lisina, o *lysE* é intensificado. Entretanto, como para bactérias pertencentes ao gênero *Escherichia*, desconhece-se ainda se uma proteína de excreção de L-aminoácido está ou não presente. Portanto, é desconhecido se a intensificação da proteína de excreção de L-aminoácido é eficaz na produção de L-aminoácido usando-se uma bactéria pertencente ou não ao gênero *Escherichia*.

Embora, a seqüência completa de nucleotídeo da cepa *E. coli* K-12 pertencente ao gênero *Escherichia* seja facilmente determinada (Science, 277, 1453-1474 (1997)), existe um grande número de proteínas das quais as funções são desconhecidas.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Um objetivo da presente invenção é obter uma proteína que participe na excreção de um L-aminoácido fornecendo, desse modo, uma cepa melhorada na produção de L-aminoácido e um processo melhorado para produzir um L-aminoácido por fermentação.

Os inventores conduziram a avaliação quanto a participação da proteína na excreção de um L-aminoácido. Como um resultado, os presentes inventores observaram que um rendimento de um L-aminoácido com base no açúcar consumido é aumentado quando um gene particular é intensificado. Com base na descoberta, a presente invenção foi completada.

Desse modo, a presente invenção fornece uma bactéria pertencente ao gênero *Escherichia* e que tem uma capacidade para produzir um L-aminoácido, em que a capacidade para produzir o L-aminoácido é aumentada aumentando-se uma quantidade de expressão de pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste das seguintes proteínas de (A) até (H) (a seguir também referida como "a bactéria da presente invenção"):

(A) uma proteína que tenha uma seqüência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 10 na Listagem de Seqüência;

(B) uma proteína que tenha uma seqüência de aminoácido que inclua a supressão, substituição, inserção, adição ou inversão de um ou vários aminoácidos na seqüência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 10 na Listagem de Seqüência, e que tenha uma atividade de aumentar a capacidade de produzir o L-aminoácido da bactéria que tenha a proteína;

(C) uma proteína que tenha uma seqüência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 12 na Listagem de Seqüência;

(D) uma proteína que tenha uma seqüência de aminoácido que inclua a supressão, substituição, inserção, adição ou inversão de um ou vários aminoácidos na seqüência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 12 na Listagem de Seqüência, e que tenha uma atividade de aumentar a capacidade de produzir o L-aminoácido da bactéria que tenha a proteína;

(E) uma proteína que tenha uma seqüência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 14 na Listagem de Seqüência;

(F) uma proteína que tenha uma seqüência de aminoácido que inclua a supressão, substituição, inserção, adição ou inversão de um ou vários aminoácidos na seqüência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 14 na Listagem de Seqüência, e que tenha uma atividade de aumentar a capacidade de produzir o L-aminoácido da bactéria que tenha a proteína;

(G) uma proteína que tenha uma seqüência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 16 na Listagem de Seqüência; ou

(H) uma proteína que tenha uma seqüência de aminoácido que inclua a supressão, substituição, inserção, adição ou inversão de um ou vários aminoácidos na seqüência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 16 na Listagem de Seqüência, e que tenha uma atividade de aumentar a capacidade de produzir o L-aminoácido da bactéria que tenha a proteína.

A bactéria da presente invenção, preferivelmente uma bactéria que produza a L-lisina em que uma quantidade de expressão de pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste das proteínas de (A) até (D),

(G) e (H) é aumentada; uma bactéria que produza ácido L-glutâmico em que uma quantidade de expressão de pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste das proteínas de (A) até (H) é aumentada; uma bactéria que produza a L-alanina em que uma quantidade de expressão de pelo menos
5 uma proteína selecionada do grupo que consiste das proteínas (C) e (D) é aumentada; uma bactéria que produza a L-valina em que uma quantidade de expressão de pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste das proteínas (C) e (D) é aumentada; uma bactéria que produza a L-histidina em que uma quantidade de expressão de pelo menos uma proteína selecionada do
10 grupo que consiste das ditas proteínas de (C) até (F) é aumentada; uma bactéria que produza a L-prolina em que uma quantidade de expressão de pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste das ditas proteínas de (A) até (F) é aumentada; uma bactéria que produza a L-treonina em que uma quantidade de expressão de pelo menos uma proteína
15 selecionada do grupo que consiste das ditas proteínas (E) e (F) é aumentada; uma bactéria que produza a L-arginina em que uma quantidade de expressão de pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste das ditas proteínas (G) e (H) é aumentada; ou uma bactéria que produza a L-isoleucina em que uma quantidade de expressão de pelo menos uma proteína
20 selecionada do grupo que consiste das ditas proteínas (C) e (D) é aumentada.

Preferivelmente, na bactéria da presente invenção, um número de cópia de um DNA que codifica para a dita proteína em uma célula é aumentado. O DNA é preferivelmente carregado em um vetor de cópia múltipla ou em um transposon na célula.

25 A presente invenção também fornece um processo para produzir um L-aminoácido que compreende as etapas de:

cultivar a bactéria da presente invenção em um meio de cultura para produzir e acumular o L-aminoácido no meio e recuperar o L-aminoácido do meio (a seguir, também referido como "o

processo da presente invenção").

O processo da presente invenção, preferivelmente um processo de produção de L-lisina que usa uma bactéria que produza a L-lisina em que uma quantidade de expressão de pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste das proteínas de (A) até (D), (G) e (H) é aumentada; um processo de produção de ácido L-glutâmico que usa uma bactéria que produza o ácido L-glutâmico em que uma quantidade de expressão de pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste das proteínas de (A) até (H) é aumentada; um processo de produção de L-alanina que usa uma bactéria que produza a L-alanina em que uma quantidade de expressão de pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste das proteínas (C) e (D) é aumentada; um processo de produção de L-valina que usa uma bactéria que produza a L-valina em que uma quantidade de expressão de pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste das proteínas (C) e (D) é aumentada; um processo de produção de L-histidina que usa uma bactéria que produza a L-histidina em que uma quantidade de expressão de pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste das ditas proteínas de (C) até (F) é aumentada; um processo de produção de L-prolina que usa uma bactéria que produza a L-prolina em que uma quantidade de expressão de pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste das ditas proteínas de (A) até (F) é aumentada; um processo de produção de L-treonina que usa uma bactéria que produza a L-treonina em que uma quantidade de expressão de pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste das ditas proteínas (E) e (F) é aumentada; um processo de produção de L-arginina que usa uma bactéria que produza a L-arginina em que uma quantidade de expressão de pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste das ditas proteínas (G) e (H) é aumentada; ou um processo de produção de L-isoleucina que usa uma bactéria que produza a L-isoleucina em que uma quantidade de expressão de pelo menos uma proteína

selecionada do grupo que consiste das ditas proteínas (C) e (D) é aumentada.

Preferivelmente, no processo da presente invenção, um número de cópia de um DNA que codifica para a dita proteína em uma célula da bactéria é aumentado. O DNA é preferivelmente carregado em um vetor de
5 cópia múltipla na célula ou em um transposon na célula.

De acordo com a presente invenção, uma capacidade para produzir um L-aminoácido de uma bactéria pertencente ao gênero *Escherichia* pode ser aumentada. Também, um processo para produzir um L-aminoácido pode ser melhorado em uma razão de produção de um L-
10 aminoácido.

A presente invenção será explicada abaixo, em detalhes. Em seguida, um aminoácido é de configuração L a menos que de outro modo observado.

<1> BACTÉRIA DA PRESENTE INVENÇÃO

A bactéria da presente invenção é uma bactéria pertencente ao gênero *Escherichia* e que tenha uma capacidade para produzir um aminoácido, em que a capacidade para produzir um aminoácido é aumentada aumentando-se uma quantidade de expressão de uma proteína que tenha uma atividade de aumentar a capacidade de produzir o aminoácido da bactéria ou
20 uma atividade de aumentar a resistência a um aminoácido ou um análogo de aminoácido. Em seguida, a proteína é referida como "proteína de excreção de aminoácido" em consideração à conveniência. Entretanto, o termo não significa que a função da proteína seja limitada à excreção de aminoácido.

Os exemplos das proteínas de excreção de aminoácido
25 incluem uma proteína que tenha uma seqüência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 10, uma proteína que tenha uma seqüência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 12, uma proteína que tenha uma seqüência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 14 e uma proteína que tenha uma seqüência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 16.

A proteína de excreção de aminoácido pode ter seletividade para aminoácido. Uma proteína de excreção de aminoácido apropriada para cada aminoácido pode ser determinada deixando-se a proteína de excreção de aminoácido ser expressa em uma bactéria pertencente ao gênero *Escherichia* e que tenha uma capacidade para produzir o aminoácido e medindo-se um aumento de um rendimento do aminoácido ou medindo-se um aumento de uma concentração mínima de inibição (MIC) de um aminoácido ou de um análogo de aminoácido.

Por exemplo, no caso da lisina, uma proteína que tenha uma seqüência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 10, 12 ou 16 é eficaz; no caso do ácido glutâmico, uma proteína que tenha uma seqüência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 10, 12, 14 ou 16 é eficaz, no caso da alanina, uma proteína que tenha uma seqüência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 12 é eficaz; no caso da valina uma proteína que tenha uma seqüência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 12 é eficaz; no caso da histidina, uma proteína que tenha uma seqüência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 12 ou 14; no caso da prolina, uma proteína que tenha uma seqüência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 10, 12 ou 14 é eficaz; no caso da treonina, uma proteína que tenha uma seqüência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 14 é eficaz; no caso da arginina, uma proteína que tenha uma seqüência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 16 é eficaz e no caso da isoleucina, uma proteína que tenha uma seqüência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 12 é eficaz.

O termo "uma quantidade de expressão é aumentada" usado neste, geralmente significa que a quantidade de expressão é maior do que aquela de uma cepa selvagem de *E. coli*, tal como a cepa MG1655 ou W3110. Os termos também significam que quando uma cepa é obtida pela modificação através das técnicas da engenharia genética ou outras, a quantidade de expressão é maior do que a anterior à modificação. A

quantidade de expressão da proteína de excreção de aminoácido pode ser determinada diretamente pela determinação da proteína de excreção de aminoácido ou indiretamente pela determinação de MIC de um aminoácido ou de um análogo de aminoácido ou da produtividade de aminoácido de uma

5 bactéria pertencente ao gênero *Escherichia* e que tenha a proteína de excreção de aminoácido.

O processo para aumentar a quantidade de expressão da proteína de excreção de aminoácido é exemplificado por um processo para aumentar o número de cópia do DNA que codifica a proteína de excreção de

10 aminoácido em uma célula da bactéria.

Para aumentar o número de cópia na célula, um fragmento de DNA que codifica para a proteína de excreção de aminoácido pode ser ligado a um vetor que funciona em uma bactéria pertencente ao gênero *Escherichia* para produzir um DNA recombinante que é introduzido em um hospedeiro

15 para transformá-lo. O número de cópia do gene que codifica para a proteína de excreção de aminoácido (gene da proteína de excreção de aminoácido) na célula da cepa transformante aumenta, desse modo, aumentando a quantidade de expressão da proteína de excreção de aminoácido. O vetor é preferivelmente um vetor de cópia múltipla.

O aumento do número de cópia na célula pode ser alcançado deixando-se cópias múltiplas do gene da proteína de excreção de aminoácido para existir no DNA cromossômico do hospedeiro. A introdução de cópias múltiplas do gene da proteína de excreção de aminoácido ao DNA cromossômico de uma bactéria pertencente ao gênero *Escherichia*, pode ser

20 conduzida através da recombinação homóloga usando-se uma seqüência da qual as cópias múltiplas existem no DNA cromossômico como um alvo. Como a seqüência das quais as cópias múltiplas existem no DNA cromossômico, um DNA repetitivo e uma repetição invertida presente em

25 uma porção terminal de um elemento transponível podem ser usados.

Alternativamente, como divulgado no Pedido de Patente Japonês Aberto ao Público No. 2-109985 (1990), as cópias múltiplas podem ser introduzidas ao DNA cromossômico fazendo-se com que o gene da proteína de excreção de aminoácido seja carregado em um transposon e deixando que o transposon seja transposto, o que é preferido. De acordo com
5 qualquer um dos processos mencionados acima, o número de cópias do gene da proteína de excreção de aminoácido na cepa transformante aumenta, aumentando-se assim a quantidade de expressão da proteína de excreção de aminoácido.

10 O vetor de cópia múltipla é exemplificado pelos vetores plasmídicos, tais como pBR322, pMW118, pUC19 ou outros e vetores de fago, tais como λ 1059, λ BF101, M13mp9 ou outros. O transposon é exemplificado por Mu, Tn10, Tn5 ou outros.

15 A introdução de um DNA em uma bactéria pertencente ao gênero *Escherichia* pode ser realizada, por exemplo, por um processo de D. M. Morrison (Methods in Enzymology 68, 326 (1979)) ou um processo em que as células bacterianas receptoras são tratadas com cloreto de cálcio para aumentar a permeabilidade do DNA (Mandel, M. e Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)) e outros.

20 Além disso, a aplicação do gene mencionado acima, o aumento da quantidade de expressão da proteína de excreção de aminoácido também pode ser alcançada substituindo-se uma seqüência reguladora de expressão tal como um promotor do gene da proteína de excreção de aminoácido por uma mais forte (ver o Pedido de Patente Japonês Aberto ao
25 Público No. 1-215280 (1989)). Por exemplo, o promotor *lac*, o promotor *trp*, o promotor *tac*, o promotor P_R e o promotor P_L do fago lambda e outros são conhecidos como um promotor forte. A substituição pelo promotor intensifica a expressão da proteína de excreção de aminoácido, desse modo aumentando-se a quantidade de expressão da proteína de excreção de

aminoácido. A intensificação da seqüência reguladora de expressão pode ser combinada com o aumento do número de cópia da proteína de excreção de aminoácido.

Na bactéria da presente invenção, as quantidades de expressão
5 das proteínas de excreção de aminoácido podem ser aumentadas.

A proteína de excreção de aminoácido é codificada pelos genes que são conhecidos como gene *yahN*, gene *yeaS*, gene *yfiK* e gene *yggA* e dos quais as funções não são conhecidas. Portanto, o DNA que codifica a proteína de excreção de aminoácido pode ser obtido sintetizando-se iniciadores com base em seqüências conhecidas (por exemplo, a seqüência
10 de nucleotídeo inteira do cromossomo do *Escherichia coli* da cepa K-12 já foi determinada (Science, 277, 1453-1474 (1997))), e conduzindo-se a amplificação pelo PCR usando-se o DNA cromossômico de uma bactéria pertencente ao gênero *Escherichia* como um padrão. Também, o fragmento
15 de DNA em questão pode ser selecionado pela hibridização de uma biblioteca de DNA cromossômico de uma bactéria pertencente ao gênero *Escherichia* pela preparação de uma investigação com base nas seqüências conhecidas. Alternativamente, o DNA que codifica a proteína de excreção de aminoácido pode ser sintetizado com base nas seqüências conhecidas. A seqüência de
20 nucleotídeo do DNA que codifica a proteína de excreção de aminoácido é exemplificada por aquelas apresentadas na SEQ ID NO: 9, 11, 13 ou 15 na Listagem de Seqüência.

Os processos para a preparação de DNA cromossômico, preparação de biblioteca de DNA cromossômico, hibridização, PCR,
25 preparação de DNA plasmídico, digestão e ligação de DNA, transformação, seleção de um oligonucleotídeo como um iniciador e outros podem ser processos usuais bem conhecidos por uma pessoa habilitada na técnica. Estes processos são descritos em Sambrook, J., Fritsch, E. F., e Maniatis, T., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring

Harbor Laboratory Press (1988) e outros.

5 A proteína de excreção de aminoácido pode compreender a substituição, supressão, inserção, adição ou inversão de um ou vários aminoácidos em uma ou uma pluralidade de posições, desde que a atividade de aumentar a capacidade para produzir o aminoácido da bactéria pertencente ao gênero *Escherichia* e que tem a proteína não seja deteriorada. O termo "vários" pode variar dependendo de uma posição em uma estrutura estérica da proteína e de uma espécie de um resíduo de aminoácido. Isto ocorre porque alguns aminoácidos, tais como a isoleucina e a valina, têm alta
10 similaridade uns aos outros, e uma diferença entre os tais aminoácidos não afetam amplamente a estrutura estérica da proteína.

O DNA que codifica para a substancialmente mesma proteína como a proteína de excreção de aminoácido, como descrito acima, pode ser obtido, por exemplo, modificando-se a seqüência de nucleotídeo, por exemplo, por meio do processo de mutagênese direcionada por sítio, de modo que um ou mais resíduos de aminoácido em um local especificado envolva a substituição, supressão, inserção, adição ou inversão. O DNA modificado como descrito acima pode ser obtido pelo tratamento de mutação convencionalmente conhecido. O tratamento de mutação inclui um processo
15 para tratar um DNA que codifica para a proteína de excreção de aminoácido *in vitro*, por exemplo, com hidroxilamina e um processo para tratar um microorganismo, por exemplo uma bactéria pertencente ao gênero *Escherichia*, que abriga um DNA que codifica para a proteína de excreção de aminoácido com irradiação ultravioleta ou um agente de mutação tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NG) e ácido nitroso, comumente usado
20 para o tratamento de mutação.

A substituição, supressão, inserção, adição ou inversão de um ou mais resíduos de aminoácido incluem uma mutação ou variação que ocorre naturalmente que são resultados de uma diferença entre os

microorganismos individuais que tenham a proteína de excreção de aminoácido e uma diferença entre espécies, cepas ou outros.

O DNA, que codifica para, substancialmente a mesma proteína como a proteína de excreção de aminoácido, pode ser obtido deixando-se um
5 DNA que tenha a mutação como descrita acima, ser expresso em uma célula de uma bactéria apropriada pertencente ao gênero *Escherichia* e que investiga o aumento da produtividade de aminoácido da célula.

Também, o DNA que codifica substancialmente para a mesma proteína como a proteína de excreção de aminoácido, pode ser obtido
10 isolando-se um DNA que hibridiza com o DNA que têm, por exemplo, uma seqüência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID NO: 9, 11, 13 ou 15 na listagem de seqüência sob condições rigorosas e que codifica para uma proteína que tenha a atividade de aumentar a capacidade de produzir o aminoácido da bactéria pertencente ao gênero *Escherichia*, de DNAs que
15 codificam as proteínas de excreção de aminoácido que tenham mutações ou células que contenham os DNAs. O termo "condições rigorosas" referido neste, significa uma condição sob a qual um híbrido específico é formado e um híbrido não específico não é formado. É difícil expressar claramente esta condição usando-se qualquer valor numérico. Entretanto, por exemplo, as
20 condições rigorosas incluem uma condição sob a qual os DNAs que tenham alta homologia, por exemplo, DNAs que tenham homologia de não menos do que 70% entre eles sejam hibridizados e DNAs que tenham homologia entre eles, menor do que a acima não sejam hibridizados ou uma condição de uma concentração de sal que corresponda a 60°C, 1 x SSC, 0,1% de SDS,
25 preferivelmente 0,1 x SSC, 0,1% de SDS que é uma condição de lavagem de hibridização comum do sul.

Embora, possa ser um gene em que um códon de interrupção é feito no meio ou um gene que codifique uma proteína que perdeu a atividade devido a mutação do centro ativo entre os genes que hibridizam sob tais

condições, tais genes podem ser facilmente eliminados ligando-se os genes a um vetor de expressão de atividade comercialmente disponível e que determina a atividade de aumento da capacidade para produzir o aminoácido da bactéria pertencente ao gênero *Escherichia* como descrito acima.

5 O termo "DNA que codifica para uma proteína" usado neste significa um DNA do qual um dos filamentos codifica para a proteína quando o DNA é de filamento duplo.

Aumentando-se uma quantidade de expressão de uma proteína de excreção de aminoácido em uma bactéria que produza aminoácido pertencente ao gênero *Escherichia* como descrito acima, uma quantidade
10 produzida do aminoácido pode ser aumentada. Como a bactéria pertencente ao gênero *Escherichia* na qual a quantidade de expressão da proteína de excreção de aminoácido é para ser aumentada, as cepas que tenham capacidade para produzir os aminoácidos desejados (produtividades de
15 aminoácido) são usadas. Além disso, uma capacidade para produzir um aminoácido pode ser comunicada a uma bactéria em que a quantidade de expressão da proteína de excreção de aminoácido é aumentada. Os exemplos de bactéria que produza aminoácido, pertencentes ao gênero *Escherichia* incluem *E. coli* AJ13199 (patente FR No. 2747689) e aquelas obteníveis dos
20 materiais conhecidos (por exemplo, *E. coli* W3110 (tyrA)/pCABD2, *E. coli* VL614, *E. coli* VL2054, *E. coli* VL2160, *E. coli* VL2151, *E. coli* W3350 *argE*: :Tn10/pKA10 como descrito nos Exemplos abaixo).

Por referência, a proteína de excreção de aminoácido de acordo com a presente invenção foi identificada pela primeira vez, como
25 descrito abaixo.

Os presentes inventores identificaram o *rhtB* e o *rhtC* como genes de proteína de excreção de treonina de uma bactéria pertencente ao gênero *Escherichia*. Os presentes inventores pesquisaram o banco de dados com base em uma hipótese de que as proteínas de excreção de aminoácido

5 pudessem compartilhar uma estrutura comum. Isto é, a pesquisa BLAST e
PSI-BLAST (Altschul, S. F. *et al.*, Nucleic Acids Res., 25, 3389 a 3402
(1997)) quanto a homologia de uma proteína codificada pelo *rhtB* foi
realizada em GenBank CDS, PDB, SWISS-PROT, Spupdate e PIR. A
pesquisa Tblastn foi realizada em genomas microbianos não acabados. A
pesquisa BLITZ (Sturrock, S. S. e Collins, J. F., Mpsch versão 1.3. Unidade
de Pesquisa de Biocomputação da Universidade de Edinburgh, UK (1993))
foi realizada no banco de dados SWALL. A pesquisa SMART (Ogiwara, I. *et*
10 *al.*, Protein Sci., 5, 1991 a 1999 (1996)) foi realizada no banco de dados de
translações e SWISS-PROT. Das amostras de mais do que 60 seqüências
encontradas, a YeaS (que corresponde ao f212 de ACESSO No. AE000274
no GenBank), a YahN (que corresponde ao f223 de ACESSO No. AE000140
no GenBank), a YfiK (que corresponde ao o195 de ACESSO No. AE000344
no GenBank) e a YggA (que corresponde ao f211 de ACESSO No.
15 AE000375 no GenBank) permaneceram como proteínas que podem ter
função similar ao RhtB, entre aqueles que se originam do *E. coli*. Visto que
as funções de qualquer um destes genes são desconhecidas, os genes são
atualmente obtidos e os efeitos destes no MIC dos aminoácidos e dos
análogos de aminoácidos e na produção de aminoácido foram examinados
20 intensificando-se as suas atividades. Como um resultado, um efeito de
aumentar o MIC de alguns aminoácidos e análogos foi observado com
respeito a YeaS, YfiK, YahN e YggA. Outro exame revelou que as proteínas
codificadas por estes genes apresentam um efeito de aumentar uma
acumulação de aminoácido, embora possam ter alguma seletividade de
25 aminoácido .

<2> PROCESSO DA PRESENTE INVENÇÃO

O processo da presente invenção compreende as etapas de cultivar a bactéria da presente invenção, em um meio de cultura, para produzir e acumular o aminoácido no meio e recuperar o aminoácido do meio.

Os aminoácidos adequados incluem, lisina, ácido glutâmico, alanina, valina, histidina, prolina, treonina, arginina e isoleucina.

No processo da presente invenção, o cultivo da bactéria pertencente ao gênero *Escherichia*, a coleta e purificação do aminoácido do meio líquido podem ser realizadas de uma maneira similar àquela do processo convencional para produzir um aminoácido pela fermentação usando-se uma bactéria. Um meio usado no cultivo pode ser um meio sintético ou um meio natural, contanto que o meio inclua uma fonte de carbono e uma de nitrogênio e minerais e, se necessário, nutrientes que a bactéria usada requer para se desenvolver em quantidades apropriadas. A fonte de carbono pode incluir vários carboidratos, tais como a glicose e a sacarose e vários ácidos orgânicos, dependendo da capacidade assimiladora da bactéria usada, o álcool, incluindo o etanol e o glicerol, pode ser usado. Como fonte de nitrogênio, amônia, vários sais de amônio, tais como sulfato de amônio, outros compostos de nitrogênio, tais como aminas, uma fonte natural de nitrogênio, tal como peptona, hidróxido de soja e micróbios digeridos, de fermentação são usados. Como minerais, fosfato de monopotássio, sulfato de magnésio, cloreto de sódio, sulfato ferroso, sulfato de manganês e carbonato de cálcio são usados.

O cultivo é preferivelmente cultivado sob uma condição aeróbica, tal como uma cultura de vibração e uma cultura de aeração e de agitação. A temperatura da cultura é usualmente de 20 a 40°C, preferivelmente de 30 a 38°C. O pH da cultura está usualmente entre 5 e 9, preferivelmente entre 6,5 e 7,2. O pH da cultura pode ser ajustado com amônia, carbonato de cálcio, vários ácidos, várias bases e tampões. Geralmente, um cultivo de 1 a 3 dias leva à acumulação do aminoácido alvo no meio.

A recuperação do aminoácido pode ser realizada removendo-

se os sólidos do meio, tais como as células, por centrifugação ou por filtração da membrana após o cultivo e então coletando-se e purificando-se o aminoácido alvo por troca de íon, processos de concentração e fração cristalina e outros.

5 MELHOR MANEIRA PARA REALIZAR A INVENÇÃO

A presente invenção será mais concretamente explicada abaixo por referência aos Exemplos:

EXEMPLO 1. PREPARAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA QUE CODIFICAM PARA AS PROTEÍNAS DE EXCREÇÃO DE AMINOÁCIDO

10 A seqüência de nucleotídeo completa do cromossomo da cepa *E. coli* K-12 foi determinada (Science, 277, 1453 a 1474, 1997). Com base na seqüência de nucleotídeo relatada, os iniciadores foram sintetizados e os genes *YahN*, *YfiK*, *YeaS* e *YggA* foram amplificados por PCR.

15 (1). O DNA cromossômico da cepa *E. coli* MG1655 foi usado como um padrão.

O DNA cromossômico foi preparado por um processo usual (Sambrook, J., Fritsch E. F. e Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2^a. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.). Na reação de PCR, uma condição padrão descrita no "PCR protocols. Current methods and applications". (White, B. A., ed. Humana Press, Totowa, New Jersey, 1993) foi usada. Os produtos de PCR obtidos foram purificados por um processo comum e digeridos com enzimas de restrição como descrito abaixo.

25 O gene *YahN* foi amplificado usando-se os iniciadores No. 1 e No. 2.

Iniciador No. 1: gtgtggaaccgacgccggat (uma seqüência complementar a uma seqüência da base 1885 até a base 1904 em uma seqüência de nucleotídeo registrada sob o ACESSO No. AE000140 no GenBank; SEQ ID NO: 17), e

Iniciador No. 2: tgttgatggtacggggttcgag (uma seqüência da base 223 até a base 245 na mesma; SEQ ID NO: 18).

O produto de PCR obtido após a purificação foi digerido com enzimas de restrição *Pst*I e *Stu*I e ligado ao vetor pUC21 (Vieira, Messing, Gene, 100, 189 a 194, 1991) digerido com a enzima *Pst*I e *Eco*RV usando-se um conjunto de ligação. Então, a transformação das células aptas do *E. coli* TG1 (Sambrook, J., Fritsch, E. F., e Maniatis, T. Molecular cloning: a laboratory manual, Segunda Edição", Cold Spring Harbor, N. Y.) com o produto foi conduzida e as células foram espalhadas no meio L (10 g/l de Bactotrypton, 5 g/l de extrato de levedura, 5 g/l de NaCl, 15 g/l de agar, pH 7,0) contendo 10 µg/ml de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) e 40 µg/ml de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo) e 100 µg/ml de ampicilina e cultivado durante a noite. Surgiram colônias brancas que foram retiradas e submetidas ao isolamento de colônia única para se obter transformantes. O plasmídeo foi preparado a partir dos transformantes usando-se um processo de extração alcalina e designado como pYAHN.

O gene *YeaS* foi amplificado usando-se os iniciadores No. 3 e No. 4.

Iniciador No. 3: ctttgccaatcccgtctccc (uma seqüência complementar a uma seqüência da base 7683 até a base 7702 em uma seqüência de nucleotídeo registrada sob o ACESSO No. AE000274 no GenBank; SEQ ID NO: 19);

Iniciador No. 4: gccccatgcataacggaaag (uma seqüência da base 5542 até a base 5561 na mesma; SEQ ID NO: 20).

O produto de PCR obtido após a purificação foi digerido com uma enzima de restrição *Ava*I e ligado ao vetor pUC19. Após a transformação do *E. coli* TG1 como acima, o plasmídeo designado como pYEAS foi obtido.

O gene *YfiK* foi amplificado usando-se os iniciadores No. 5 e No. 6.

Iniciador No. 5: gaagatctttaggcccggataaggcg (uma seqüência da base 4155 até a base 4177 em uma seqüência de nucleotídeo registrada sob o ACESSO No. AE000344 no GenBank; com um sítio *Bg*III de enzima de restrição adicionado na extremidade 5' desta SEQ ID NO: 21);

5 Iniciador No. 6: tggttttaccaattggccgc (uma seqüência complementar a uma seqüência da base 6307 até a base 6326 na mesma; SEQ ID NO: 22).

O produto de PCR obtido após a purificação foi digerido com enzimas de restrição *Bg*III e *Mun*I e ligado ao vetor pUC21 digerido com enzimas de restrição *Bg*III e *Eco*RI. Após a transformação do *E. coli* TG1
10 como acima, o plasmídeo designado pYFIK foi obtido.

O gene *YggA* foi amplificado usando-se os iniciadores No. 7 e No. 8.

Iniciador No. 7: acttctcccgcgagccagttc (uma seqüência complementar a uma seqüência da base 9606 até a base 9626 em uma seqüência de nucleotídeo registrada sob o ACESSO No. AE000375 no GenBank; SEQ ID NO: 23);
15

Iniciador No. 8: ggcaagcttagcgcctctgtt (uma seqüência da base 8478 até a base 8498 na mesma; SEQ ID NO: 24).

20 O produto de PCR obtido após a purificação foi digerido com enzimas de restrição *Hind*III e *Clai*I e ligado ao vetor pOK12 (Vieira, Messing, Gene, 100, 189 a 194, 1991) digerido com a mesma enzima de restrição. Após a transformação do *E. coli* TG1 como acima, o plasmídeo designado pYGGA foi obtido.

25 (2). O DNA cromossômico da cepa *E. coli* W3110 foi usado como um padrão.

O gene *YahN* foi amplificado usando-se os iniciadores No. 9 (SEQ ID NO. 1) e No. 10 (SEQ ID NO. 2)

O gene *YeaS* foi amplificado usando-se os iniciadores No. 11

(SEQ ID NO. 3) e No. 12 (SEQ ID NO. 4)

O gene *YfiK* foi amplificado usando-se os iniciadores No. 13 (SEQ ID NO. 5) e No. 14 (SEQ ID NO. 6)

O gene *YggA* foi amplificado usando-se os iniciadores No. 15 (SEQ ID NO. 7) e No. 16 (SEQ ID NO. 8)

O produto de PCR obtido foi purificado, digerido com enzimas de restrição *SacI* e *XbaI* (*EcoRI* e *PstI* para *YggA*) e ligado ao plasmídeo pMW118 (Nippon Gene). O plasmídeo no qual um fragmento de DNA cuja seqüência foi idêntica à seqüência relatada, foi inserido e designado como segue:

Um que carrega *YahN* : pMW118: :*YahN*

Um que carrega *YeaS* : pMW118: :*YeaS*

Um que carrega *YfiK* : pMW118: :*YfiK*

Um que carrega *YggA* : pMW118: :*YggA*

15 EXEMPLO 2. EFEITO DA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA *YahN*, *YeaS*, *YfiK* E *YggA* NA RESISTÊNCIA DO *E. coli* TG1 A ALGUNS AMINOÁCIDOS E ANÁLOGOS DE AMINOÁCIDO.

A homologia dos produtos de gene *YahN*, *YeaS*, *YfiK* e *YggA* com o transportador de lisina, *LysE*, do *Corynebacterium glutamicum* (Vrljic *et al.*, Mol. Microbiol., 22, 815 a 826, 1996) e a proteína *RhtB* envolvida na excreção de homoserina, indica a função análoga para estas proteínas. É bem conhecido que a expressão aumentada dos genes envolvidos em antibióticos e um efluxo de metal pesado aumenta o nível de resistência aos medicamentos (Nikaido, H. J. Bacteriology, 178, 5853 a 5859, 1996). Portanto, o efeito dos plasmídeos pYEAS, pYAHN, pYFIK e pYGGGA na suscetibilidade da cepa TG1 a alguns aminoácidos e análogos de aminoácido foi testado. Durante a noite, as culturas das cepas *E. coli* TG1/pYEAS, TG1/pYAHN, TG1/pYFIK e TG1/pYGGGA e das cepas de controle TG1/pUC21, TG1/pUC19 e TG1/pOK12, cultivadas em meio M9 mínimo com um antibiótico apropriado

em um agitador rotativo (10^9 cfu/ml) foram diluídos 1:100 em meio M9 mínimo e cultivadas por 5 horas no mesmo meio. Então, as culturas de fase *log* assim obtidas foram diluídas e cerca de 10^4 células vivas foram aplicadas às placas de teste de reservatório seco com agar M9 contendo os incrementos de duplicação dos aminoácidos ou análogos. Assim, a concentração mínima de inibição (MIC) destes compostos foi examinada.

Os resultados são mostrados na Tabela 1. Conclui-se da Tabela 1 que as cópias múltiplas do gene *yfiK* conferiram resistência aumentada à prolina, homosserina, histidina, treonina, glutamato, lisina, ácido α -amino- β -hidroxivalérico (AHVA), S-(2-aminoetil)-L-cisteína (AEC) e ao ácido α -aminobutírico; as cópias múltiplas do gene *yahN* conferiram resistência aumentada à prolina, as cópias múltiplas do gene *yeaS* conferiram resistência aumentada à treonina, homosserina, lisina, glutamato, histidina, prolina e ao ácido α -aminobutírico; as cópias múltiplas do gene *yggA* conferiram resistência aumentada à S-(2-aminoetil)-L-cisteína (AEC), lisina e arginina. Estes resultados indicam que exceto para a YahN, cada um dos transportadores supostos têm especificidade a diversos substratos (aminoácidos e análogos de aminoácido) ou podem mostrar efeitos não específicos como um resultado de amplificação.

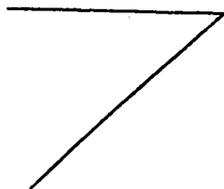


TABELA 1

substrato	MIC ($\mu\text{g/ml}$) para <i>E. coli</i> TG1, que abriga o plasmídeo.				
	pUC21	pYFIK	pYAHN	pYEAS	pYGGA
L-homoserina	500	1000	500	1000	500
L-treonina	30000	40000	30000	50000	30000
L-lisina	5000	7500	5000	7500	15000
L-glutamato (sal de Na)	5000	10000	5000	20000	5000
L-histidina	5000	10000	5000	30000	5000
L-valina	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
L-prolina	1000	5000	2000	2000	1000
L-arginina	10000	10000	10000	10000	20000
AHVA	100	200	100	100	100
AEC	5	10	5	5	200
ácido α -aminobutírico	2500	5000	2500	>10000	2500
4-aza-DL-leucina	100	100	100	100	100

EXEMPLO 3. EFEITO DA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA *yeaS*, *yahN*, E *yfiK* NA PRODUÇÃO DO ÁCIDO GLUTÂMICO.

A cepa *E. coli* AJ13199 (patente FR No. 2747689) foi transformada com o vetor pUC21 e com cada um dos plasmídeos pYAHN, pYEAS e pYFIK. Assim as cepas AJ13199/pUC21 (VKPM B-7728), AJ13199/pYAHN (VKPM B-7729), AJ13199/pYEAS (VKPM B-7731) e AJ13199/pYFIK (VKPM B-7730) foram obtidas.

Estas cepas foram, cada uma, cultivadas a 37°C por 18 horas em um caldo nutriente com 100 mg/l de ampicilina e 0,3 ml da cultura obtida foi inoculada em 3 ml de um meio de fermentação contendo 100 mg/l de ampicilina em um tubo de teste de 20 x 200 mm e cultivados a 37°C por 48 horas com um agitador rotativo. Após o cultivo, uma quantidade acumulada de ácido glutâmico no meio foi determinada pelo processo conhecido.

A composição do meio de fermentação (g/l):

		22
	Glicose	80
	(NH ₄) ₂ SO ₄	22
	K ₂ HPO ₄	2
	NaCl	0,8
5	MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,8
	FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,02
	MnSO ₄ . 5H ₂ O	0,02
	Tiamina HCl	0,0002
	Extrato de levedura	1,0
10	CaCO ₃	30,0 (esterilizado em aquecimento seco a 180°C por 2 horas)

(A glicose e K₂HPO₄ foram esterilizados separadamente)

Os resultados são mostrados na Tabela 2. Como mostrado na Tabela 2, as cepas AJ13199/pYAHN, AJ13199/pYEAS e AJ13199/pYFIK acumularam ácido glutâmico em uma quantidade maior do que as cepas AJ13199/pUC21 em que uma quantidade de expressão das proteínas de excreção de aminoácido não foi intensificada.

TABELA 2

Cepa	Ácido glutâmico, g/l
AJ13199/pUC21	21,9
AJ13199/pYAHN	27,9
AJ13199/pYEAS	29,7
AJ13199/pYFIK	28,4

EXEMPLO 4. EFEITO DA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA *yeaS*, *yahN* E *yfiK* NA PRODUÇÃO DE LISINA.

(1). Como a bactéria que produz lisina pertencente ao gênero *Escherichia*, cepa *E. coli* W3110 (TyrA) descrita na Publicação de Patente Européia No. 488424 a qual o plasmídeo pCABD2 foi introduzido, descrito na Publicação Internacional No. WO 95/16042) foi usada. Especificamente, o

plasmídeo pCABD2 e cada um dos plasmídeos pMW118: :*yahN*, pMW118: :*yeaS*, pMW118: :*yfiK* e pMW118 foram introduzidos na cepa *E. coli* W3110 (TyrA) para obter as seguintes cepas:

- 5 W3110 (tyrA) / pCABD2+pMW118: :*yahN*
 W3110 (tyrA) / pCABD2+pMW118: :*yeaS*
 W3110 (tyrA) / pCABD2+pMW118: :*yfiK*
 W3110 (tyrA) / pCABD2+pMW118.

A produtividade de lisina destas cepas foi estimada pela cultura. A composição do meio usado foi como segue (g/l):

10	Glicose	40,0
	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0
	(NH ₄) ₂ SO ₄	16,0
	K ₂ HPO ₄	1,0
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
15	MnSO ₄ .7H ₂ O	0,01
	Extrato de levedura (Difco)	2,0
	Tirosina	0,1

Ajustado para o pH 7,0 e submetido a autoclave a 115°C por 10 minutos. (A glicose e o MgSO₄ .7H₂O foram esterilizados separadamente)

- 20 CaCO₃ farmacopéico 25 g/l (esterilizado em aquecimento seco a 180°C por 2 horas).

Como antibióticos, 20 mg/l de estreptomicina e 50 mg/l de ampicilina foram adicionadas dependendo do tipo de plasmídeo. O cultivo foi conduzido a 37°C por 30 horas com agitação a 115 rpm. Os resultados são mostrados na Tabela 3.

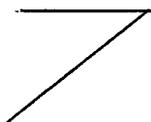


TABELA 3

cepa	lisina , g/l	rendimento, (%)
W3110(tyrA)	0,08	0,2
W3110(tyrA)/pCABD2 + pMW118	12,2	30,5
W3110(tyrA)/pCABD2 + pMW118::yahN	13,8	34,5
W3110(tyrA)/pCABD2 + pMW118::yeaS	12,7	31,8
W3110(tyrA)/pCABD2 + pMW118::yfiK	12,2	30,5

O resultado na Tabela 3 mostra que a quantidade produzida e o rendimento com base no açúcar consumido da lisina é aumentado pela intensificação do YahN e YeaS.

5 (2). Como a bactéria que produz lisina pertencente ao gênero *Escherichia*, a cepa *E. coli* VL614 foi usada. Esta cepa é uma derivada da cepa *E. coli* VL613 conhecida (Patente US No. 1354458). Sucessivamente, a cepa VL613 foi obtida a partir da cepa Gif102 conhecida (Theze, J. e Saint Girons. J.Bacteriol., 118, 990 a 998, 1974) nas três etapas:

10 Na primeira etapa os mutantes resistentes a 2 mg/ml de S-(2-aminoetil)-L-cisteína foram selecionados, e entre eles observou-se que a cepa VL611 é capaz de produzir L-lisina.

15 Na segunda etapa, os genes envolvidos na utilização de sacarose e localizados no transposon Tn2555 (Doroshenko *et al.*, Mol. Biologiya, 22, 645 a 658, 1988), foram introduzidos na VL611 usando-se a transdução mediada pelo fago P1 dando a cepa VL612.

20 Na terceira etapa a mutação *rhtA23* da cepa VKPM B-3996, que confere resistência à treonina e à homosserina (Patente US No. 5.175.107) foi introduzida na VL612 pela transdução do fago P1 dando a cepa VL613.

A cepa *E. coli* VL614 foi obtida pela transdução do alelo do tipo selvagem do gene *rhtA* da cepa *E. coli* VKPM B-6204 (MG1655

zbi3058: :Tn10) para a VL613. Os transdutantes foram selecionados do meio L contendo 10 mg/l de tetraciclina e entre eles, a cepa VL614 (*rhtA*⁺) sensível a 10 g/l de homosserina foi encontrada.

5 A cepa VL614 foi transformada com o plasmídeo pYGGA ou com o vetor pOK12 para se obter as cepas VL614/pYGGA (VKPM B-7719) e VL614/pOK12 (VKPM B-7722).

10 Estas cepas foram, cada uma, cultivadas a 37°C por 18 horas em um caldo nutriente com 50 mg/l de canamicina e 0,3 ml da cultura obtida foi inoculada em 3 ml de um meio de fermentação (Exemplo 3) contendo 0,3 g/l de treonina, 0,3 g/l de metionina e 50 mg/l de canamicina, em um tubo de teste de 20 x 200 mm e cultivada a 37°C por 48 horas com um agitador rotativo. Após o cultivo, cada quantidade acumulada de lisina e glutamato no meio foi determinada pelo processo conhecido.

Os resultados são mostrados na Tabela 4.

15

TABELA 4

Cepa	Lisina , g/l	Glutamato, g/l
VL614/pOK12	2,6	0,8
VL614/pYGGA	3,6	2,2

Como mostrado na Tabela 4, a cepa VL614/pYGGA acumulou lisina em uma quantidade maior do que a cepa VL614/pOK12 na qual o gene *yggA* não foi intensificado. Além disso, a cepa VL614 acumulou mais ácido glutâmico do que a cepa VL614/pOK12.

20 EXEMPLO 5. EFEITO DA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA *yeaS*, *yahN* E *yfiK* NA PRODUÇÃO DE TREONINA, ALANINA, VALINA E ISOLEUCINA.

25 Como a bactéria que produz treonina pertencente ao gênero *Escherichia*, a cepa E. coli VL 2054 foi usada. Esta cepa foi derivada da cepa E. coli VKPM B-3996 (Patente US No. 5.175.107) como segue.

Inicialmente, uma nova cepa receptora foi construída em

várias etapas:

- O derivado sem plasmídeo da cepa VKPM B-3996 foi selecionado após a eliminação espontânea do plasmídeo pVIC40.

- O alelo do tipo selvagem do gene *rhtA* da cepa E. coli VKPM B-6204 (MG1655 *zbi3058*: :Tn10) foi introduzida na cepa assim obtida pela transdução mediada pelo fago P1 como no Exemplo 4.

- Um gene *kani* inativador de mutação do transposon Tn5 inserido no gene *tdh* foi obtido após a mutagênese NG e seleção das células sensíveis à canamicina ainda incapazes de degradar a treonina. Desse modo, a cepa VL2053 foi obtida.

Por outro lado, o opéron de treonina do pVIC40 foi clonado em vetores Mud integradores sob o promotor P_R do fago lambda. Além disso, o gene *cat* do Tn9 que confere resistência ao cloranfenicol foi clonado no mesmo vetor. O constructo assim obtido foi inserido no cromossomo da cepa E. coli C600 pelo uso do processo conhecido (Patente US No. 5.595.889) e transduzido a partir da cepa assim obtida para a VL2053, dando a nova cepa VL2054 que produz a treonina sem plasmídeo. Esta cepa também acumulou no caldo de cultura, alanina, valina e isoleucina.

A cepa VL2054 foi transformada com cada um dos plasmídeos pYEAS, pYFIK e com o vetor pUC21 para obter as cepas E. coli VL2054/pYEAS (VKPM B-7707), VL2054/pYFIK (VKPM B-7712) e VL2054/pUC21 (VKPM B-7708).

Estas cepas foram, cada uma cultivadas a 37°C por 18 horas em um caldo nutriente com 100 mg/l de ampicilina e 0,3 ml da cultura obtida foi inoculada em 3 ml de um meio de fermentação (Exemplo 3) contendo 100 mg/l de ampicilina em um tubo de teste de 20 x 200 mm e cultivados a 37°C por 48 horas com um agitador rotativo. Após o cultivo, cada quantidade acumulada de treonina, alanina, valina e isoleucina no meio foi determinada pelo processo conhecido.

Os resultados são mostrados na Tabela 5.

Como mostrado na Tabela 5, a cepa VL2054/pYFIK acumulou treonina em uma quantidade maior do que a cepa VL2054/pUC21 na qual o gene *yfiK* não foi intensificado. Além disso, a cepa VL2054/pYEAS acumulou mais alanina, valina e isoleucina do que a cepa VL2054/pUC21 na qual o gene *yeaS* não foi intensificado.

TABELA 5

Cepa	Acumulação de aminoácido, g/l			
	Treonina	Alanina	Valina	Isoleucina
VL2054/pUC21	5,8	0,4	0,31	0,15
VL2054/pYEAS	5,2	1,4	0,52	0,45
VL2054/pYFIK	8,8	0,5	0,22	0,14

EXEMPLO 6. EFEITO DA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA *yeaS* E *yfiK* NA PRODUÇÃO DE HISTIDINA.

10 Como a bactéria que produz histidina pertencente ao gênero *Escherichia*, a cepa *E. coli* VL2160 foi usada. Esta cepa foi obtida na base da cepa NK5526 *hisG*: :Tn10 (VKPM B-3384) pela transdução mediada pelo fago P1 da mutação de *hisG*^R que dessensibiliza a fosforribosiltransferase da cepa CC46 (Astvatsaturianz *et al.*, Genetika, 24, 1928 a 1934, 1988). A cepa
15 *E. coli* VL2160 foi transformada com cada um dos plasmídeos pYEAS, pYFIK e com os vetores pUC21 para se obter as cepas *E. coli* VL2160/pYEAS (VKPM B-7753), *E. coli* VL2160/pYFIK (VKPM B-7754), *E. coli* VL2160/pUC21 (VKPM B-7752).

20 Estas cepas foram, cada uma cultivadas a 37°C por 18 horas em um caldo nutriente com 100 mg/l de ampicilina e 0,3 ml da cultura obtida foi inoculada em 3 ml do meio de fermentação (Exemplo 3) contendo uma quantidade aumentada de extrato de levedura (3 g/l) e 100 mg/l de ampicilina em um tubo de teste de 20 x 200 mm e cultivados a 34°C por 68 horas com um agitador rotativo.

Após o cultivo, uma quantidade acumulada de histidina no meio foi determinada pelo processo conhecido. Os resultados são mostrados na Tabela 6.

TABELA 6

Cepa	Histidina, g/l
VL2160/pUC21	1,2
VL2160/pYEAS	1,8
VL2160/pYFIK	1,4

5 Como mostrado na Tabela 6, as cepas *E. coli* VL2160/pYEAS e *E. coli* VL2160/pYFIK acumularam histidina em uma quantidade maior do que a cepa *E. coli* VL2160/pUC21 na qual os genes *yeaS* e *yfiK* não foram intensificados.

10 EXEMPLO 7. EFEITO DA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA *yahN*, *yfiK* E *yeaS* NA PRODUÇÃO DE PROLINA.

Como a bactéria que produz prolina pertencente ao gênero *Escherichia*, a cepa VL2151 (W3350 *proB** Δ *putAP* Tn10) foi usada. Esta cepa foi obtida pela transdução no W3350 da mutação Δ *putAP* ligada ao Tn10 e selecionando os transdutantes resistentes à tetraciclina incapazes de
15 utilizar a prolina como uma fonte única de carbono. A cepa W3350 Δ *putAP* Tn10 assim obtida foi submetida à mutagênese com NG e os mutantes resistentes a 20 mg/l de 3,4-deidro-DL-prolina foram selecionados. Entre eles, observou-se que a cepa VL2151 (W3350 *proB** Δ *putAP* Tn10) foi capaz de produzir prolina.

20 A cepa *E. coli* VL2151 foi transformada com cada um dos plasmídeos pYEAS, pYFIK, pYAHN e com os vetores pUC21 para se obter as cepas *E. coli* VL2151/pYEAS (VKPM B-7714), VL2151/pYFIK (VKPM B-7713), VL2151/pYAHN (VKPM B-7748) e *E. coli* VL2151/pUC21 (VKPM B-7715).

25 Estas cepas foram, cada uma cultivadas a 37°C por 18 horas

em um caldo nutriente com 100 mg/l de ampicilina e 0,3 ml da cultura obtida foi inoculada em 3 ml de um meio de fermentação (Exemplo 3) contendo 100 mg/l de ampicilina em um tubo de teste de 20 x 200 mm e cultivada a 37°C por 48 horas com um agitador rotativo. Após o cultivo, uma quantidade acumulada de prolina no meio foi determinada pelo processo conhecido. Os resultados são mostrados na Tabela 7.

TABELA 7

Cepa	Prolina, g/l
VL2151/pUC21	1,8
VL2151/pYAHN	2,2
VL2151/pYEAS	2,1
VL2151/pYFIK	2,5

Como mostrado na Tabela 7, as cepas *E. coli* VL2151/pYFIK, *E. coli* VL2151/pYAHN e *E. coli* VL2151/pYEAS acumularam prolina em uma quantidade maior do que a cepa *E. coli* VL2151/pUC21 na qual os genes *yfiK*, *yahN*, e *yeaS* não foram intensificados. A amplificação do gene *yfiK* teve o efeito mais pronunciado.

EXEMPLO 8. EFEITO DA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA *yggA* NA PRODUÇÃO DE ARGININA.

Como a bactéria que produz arginina pertencente ao gênero *Escherichia*, a cepa W3350 *argE*: :Tn10/pKA10 foi usada. Esta cepa abriga um plasmídeo, pKA10, que contém uma região de DNA da *Corynebacterium (Brevibacterium) flavum* que complementa pelo menos as mutações *argA* e *argE* na cepa receptora de *E. coli* K-12 (Kharitonov A. Tarasov A. P. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. No. 9, 29 a 33, 1986).

A cepa *E. coli* W3350 *argE*: :Tn10/pKA10 foi transformada com o plasmídeo pYGGA, ou com o vetor pOK12 para se obter as cepas *E. coli* W3350 *argE*: :Tn10/pKA10, pYGGA (VKPM B-7716) e *E. coli* W3350 *argE*: :Tn10/pKA10, pOK12 (VKPM B-7718).

Os transformantes assim obtidos foram, cada um, cultivados a 37°C por 18 horas em um caldo nutriente com 100 mg/l de ampicilina e 50 mg/l de canamicina e 0,3 ml da cultura obtida foi inoculada em 3 ml de um meio de fermentação (Exemplo 3) contendo 100 mg/l de ampicilina e 50 mg/l de canamicina em um tubo de teste de 20 x 200 mm e cultivada a 37°C por 48 horas com um agitador rotativo. Após o cultivo, uma quantidade acumulada de arginina no meio foi determinada pelo processo conhecido.

Os resultados são mostrados na Tabela 8.

TABELA 8

Cepa	Arginina, g/l
W3350 <i>argE</i> ::Tn10/pKA10, pOK12	0,11
W3350 <i>argE</i> ::Tn10/pKA10, pYgga	0,46

Como mostrado na Tabela 8, as cepas *E. coli* W3350 *argE*::Tn10/pKA10, o pYGGGA acumulou arginina em uma quantidade maior do que a cepa *E. coli* W3350 *argE*::Tn10/pKA10, pUC21 em que o gene *yggA* não foi intensificado.

As seguintes cepas *E. coli* foram depositadas (de acordo com o depósito internacional com base no Tratado de Budapeste) na Coleção Nacional Russa de Microorganismos Industriais (VKPM) em 29 de Dezembro de 1998 sob os números de acesso mostrados em parênteses.

AJ13199/pUC21 (VKPM B-7728)

AJ13199/pYAHN (VKPM B-7729)

AJ13199/pYEAS (VKPM B-7731)

AJ13199/pYFIK (VKPM B-7730)

VL614/pYGGGA (VKPM B-7719)

VL614/pOK12 (VKPM B-7722)

VL2054/pYEAS (VKPM B-7707)

VL2054/pYFIK (VKPM B-7712)

VL2054/pUC21 (VKPM B-7708)

VL2160/pYEAS (VKPM B-7753)
VL2160/pYFIK (VKPM B-7754)
VL2160/pUC21 (VKPM B-7752)
VL2151/pYFIK (VKPM B-7713)
5 VL2151/pYEAS (VKPM B-7714)
VL2151/pYAHN (VKPM B-7748)
VL2151/pUC21 (VKPM B-7715)
W3350 *argE*: :Tn10/pKA10, pYGGA (VKPM B-7716)
W3350 *argE*: :Tn10/pKA10, pOK12 (VKPM B-7718)

LISTAGEM DAS SEQÜÊNCIAS

- <110> Livshits, Vitaliy Arkadievich
 Zakataeva, Natalia Pavlovna
 Nakanishi, Kazuo
 Aleshin, Vladimir Veniaminovich
 Troshin, Petr Vladimirovich
 Tokhmakova, Irina Lyvovna
- <120> Processo para Produzir L-Aminoácido
- <130>
- <160> 24
- <210> 1
- <211> 27
- <212> DNA
- <213> Seqüência Artificial
- <220>
- <223> Descrição de Seqüência Artificial: iniciador para amplificar o gene yahN do Escherichia coli
- <400> 1
- ggcgagctcc cagtaaccgg aaataag 27
- <210> 2
- <211> 27
- <212> DNA
- <213> Seqüência Artificial
- <220>
- <223> Descrição de Seqüência Artificial: iniciador para amplificar o gene yahN do Escherichia coli
- <400> 2
- cgctctagaa aggaccacgc attacgg 27
- <210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição de Seqüência Artificial: iniciador para amplificar o gene yeaS do Escherichia coli

<400> 3

ggcgagctca gattggtag catatc

27

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição de Seqüência Artificial: iniciador para amplificar o gene yeaS do Escherichia coli

<400> 4

cggctagaa tcagcgaaga atcaggg

27

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição de Seqüência Artificial: iniciador para amplificar o gene yfiK do Escherichia coli

<400> 5

ggcgagctca tgttcggtg cgggtac

27

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição de Seqüência Artificial: iniciador para amplificar o gene yfiK do Escherichia coli

<400> 6

ggctctagat agcaagttac taagcgg

27

<210> 7

<211> 35

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição de Seqüência Artificial: iniciador para amplificar o gene yggA do Escherichia coli

<400> 7

ctctgaattc tctcttatta gttttctga ttgcc

35

<210> 8

<211> 38

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição de Seqüência Artificial: iniciador para amplificar o gene yggA do Escherichia coli

<400> 8

cgtgacctgc agcgttctca cagcgcggta gccttaa

38

<210> 9

<211> 672

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (672)

<400> 9

```

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

```

<210> 10

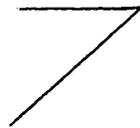
<211> 223

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 10

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

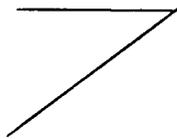


<210> 11
 <211> 639
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(639)
 <400> 11

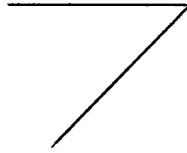
```

gtg ttc gct gaa tac ggg gtt ctg aat tac tgg acc tat ctg gtt ggg   48
Met Phe Ala Glu Tyr Gly Val Leu Asn Tyr Trp Thr Tyr Leu Val Gly
  1             5             10             15
gcc att ttt att gtg ttg gtg cca ggg cca aat acc ctg ttt gta ctc   96
Ala Ile Phe Ile Val Leu Val Pro Gly Pro Asn Thr Leu Phe Val Leu
      20             25             30
aaa aat agc gtc agt agc ggt atg aaa ggc ggt tat ctt gcg gcc tgc  144
Lys Asn Ser Val Ser Ser Gly Met Lys Gly Gly Tyr Leu Ala Ala Cys
      35             40             45
ggt gta ttt att ggc gat gcg gta ttg atg ttt ctg gca tgg gct gga  192
Gly Val Phe Ile Gly Asp Ala Val Leu Met Phe Leu Ala Trp Ala Gly
      50             55             60
gtg gcg aca tta att aag acc acc ccg ata tta ttc aac att gta cgt  240
Val Ala Thr Leu Ile Lys Thr Thr Pro Ile Leu Phe Asn Ile Val Arg
      65             70             75
tat ctt ggt gcg ttt tat ttg ctc tat ctg ggg agt aaa att ctt tac  288
Tyr Leu Gly Ala Phe Tyr Leu Leu Tyr Leu Gly Ser Lys Ile Leu Tyr
      85             90             95
gcg acc ctg aag ggt aaa aat agc gag gcc aaa tcc gat gag ccc caa  336
Ala Thr Leu Lys Gly Lys Asn Ser Glu Ala Lys Ser Asp Glu Pro Gln
      100            105            110
tac ggt gct att ttt aaa cgc gcg tta att ttg agc ctg act aat ccg  384
Tyr Gly Ala Ile Phe Lys Arg Ala Leu Ile Leu Ser Leu Thr Asn Pro
      115            120            125

```



aaa gcc att ttg ttc tat	gtg tcg ttt ttc gta cag ttt atc gat gtt	432	
Lys Ala Ile Leu Phe Tyr Val Ser Phe Phe Val Gln Phe Ile Asp Val			
130	135	140	
aat gcc cca cat acg gga att tca ttc ttt att ctg gcg gcg acg ctg	480		
Asn Ala Pro His Thr Gly Ile Ser Phe Phe Ile Leu Ala Ala Thr Leu			
145	150	155	160
gaa ctg gtg agt ttc tgc tat ttg agc ttc ctg att ata tct ggt gct	528		
Glu Leu Val Ser Phe Cys Tyr Leu Ser Phe Leu Ile Ile Ser Gly Ala			
165	170	175	
ttt gtc acg cag tac ata cgt acc aaa aag aaa ctg gct aaa gtt ggc	576		
Phe Val Thr Gln Tyr Ile Arg Thr Lys Lys Lys Leu Ala Lys Val Gly			
180	185	190	
aac tca ctg att ggt ttg atg ttc gtg ggt ttc gct gcc cga ctg gcg	624		
Asn Ser Leu Ile Gly Leu Met Phe Val Gly Phe Ala Ala Arg Leu Ala			
195	200	205	
acg ctg caa tcc tga	639		
Thr Leu Gln Ser			
210			



<210> 12

<211> 212

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 12

```

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

```

<210> 13

<211> 588

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (588)

<400> 13

gtg aca ccg acc ctt tta agt gct ttt tgg act tac acc ctg att acc	48
Met Thr Pro Thr Leu Leu Ser Ala Phe Trp Thr Tyr Thr Leu Ile Thr	
1 5 10 15	
gct atg acg cca gga ccg aac aat att ctc gcc ctt agc tct gct acg	96
Ala Met Thr Pro Gly Pro Asn Asn Ile Leu Ala Leu Ser Ser Ala Thr	
20 25 30	
tcg cat gga ttt cgt caa agt acc cgc gtg ctg gca ggg atg agt ctg	144
Ser His Gly Phe Arg Gln Ser Thr Arg Val Leu Ala Gly Met Ser Leu	
35 40 45	
gga ttt ttg att gtg atg tta ctg tgt gcg ggc att tca ttt tca ctg	192
Gly Phe Leu Ile Val Met Leu Leu Cys Ala Gly Ile Ser Phe Ser Leu	
50 55 60	
gca gtg att gac ccg gca gcg gta cac ctt ttg agt tgg gcg ggg gcg	240
Ala Val Ile Asp Pro Ala Ala Val His Leu Leu Ser Trp Ala Gly Ala	
65 70 75 80	
gca tat att gtc tgg ctg gcg tgg aaa atc gcc acc agc cca aca aag	288
Ala Tyr Ile Val Trp Leu Ala Trp Lys Ile Ala Thr Ser Pro Thr Lys	
85 90 95	
gaa gac gga ctt cag gca aaa cca atc agc ttt tgg gcc agc ttt gct	336
Glu Asp Gly Leu Gln Ala Lys Pro Ile Ser Phe Trp Ala Ser Phe Ala	
100 105 110	
ttg cag ttt gtg aac gtc aaa atc att ttg tac ggt gtt acg gca ctg	384
Leu Gln Phe Val Asn Val Lys Ile Ile Leu Tyr Gly Val Thr Ala Leu	
115 120 125	
tcg acg ttt gtt ctg ccg caa aca cag gcg tta agc tgg gta gtt ggc	432
Ser Thr Phe Val Leu Pro Gln Thr Gln Ala Leu Ser Trp Val Val Gly	
130 135 140	
gtc agc gtt ttg ctg gcg atg att ggg acg ttt ggc aat gtg tgc tgg	480
Val Ser Val Leu Leu Ala Met Ile Gly Thr Phe Gly Asn Val Cys Trp	
145 150 155 160	
gcg ctg gcg ggg cat ctg ttt cag cga ttg ttt cgc cag tat ggt cgc	528
Ala Leu Ala Gly His Leu Phe Gln Arg Leu Phe Arg Gln Tyr Gly Arg	
165 170 175	
cag tta aat atc gtg ctt gcc ctg ttg ctg gtc tat tgc gcg gta cgc	576
Gln Leu Asn Ile Val Leu Ala Leu Leu Leu Val Tyr Cys Ala Val Arg	
180 185 190	
att ttc tat taa	588
Ile Phe Tyr	
195	

<210> 14

<211> 195

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 14

```

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

```

<210> 15

<211> 636

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (636)

<400> 15

gtg ttt tct tat tac ttt caa ggt ctt gca ctt ggg gcg gct atg atc	48
Met Phe Ser Tyr Tyr Phe Gln Gly Leu Ala Leu Gly Ala Ala Met Ile	
1 5 10 15	
cta ccg ctc ggt cca caa aat gct ttt gtg atg aat cag ggc ata cgt	96
Leu Pro Leu Gly Pro Gln Asn Ala Phe Val Met Asn Gln Gly Ile Arg	
20 25 30	
cgt cag tac cac att atg att gcc tta ctt tgt gct atc agc gat ttg	144
Arg Gln Tyr His Ile Met Ile Ala Leu Leu Cys Ala Ile Ser Asp Leu	
35 40 45	
gtc ctg att tgc gcc ggg att ttt ggt ggc agc gcg tta ttg atg cag	192
Val Leu Ile Cys Ala Gly Ile Phe Gly Gly Ser Ala Leu Leu Met Gln	
50 55 60	
tcg ccg tgg ttg ctg gcg ctg gtc acc tgg ggc ggc gta gcc ttc ttg	240
Ser Pro Trp Leu Leu Ala Leu Val Thr Trp Gly Gly Val Ala Phe Leu	
65 70 75 80	
ctg tgg tat ggt ttt ggc gct ttt aaa aca gca atg agc agt aat att	288
Leu Trp Tyr Gly Phe Gly Ala Phe Lys Thr Ala Met Ser Ser Asn Ile	
85 90 95	
gag tta gcc agc gcc gaa gtc atg aag caa ggc aga tgg aaa att atc	336
Glu Leu Ala Ser Ala Glu Val Met Lys Gln Gly Arg Trp Lys Ile Ile	
100 105 110	
gcc acc atg ttg gca gtg acc tgg ctg aat ccg cat gtt tac ctg gat	384
Ala Thr Met Leu Ala Val Thr Trp Leu Asn Pro His Val Tyr Leu Asp	
115 120 125	
act ttt gtt gta ctg ggc agc ctt ggc ggg caa ctt gat gtg gaa cca	432
Thr Phe Val Val Leu Gly Ser Leu Gly Gly Gln Leu Asp Val Glu Pro	
130 135 140	
aaa cgc tgg ttt gca ctc ggg aca att agc gcc tct ttc ctg tgg ttc	480
Lys Arg Trp Phe Ala Leu Gly Thr Ile Ser Ala Ser Phe Leu Trp Phe	
145 150 155 160	
ttt ggt ctg gct ctt ctc gca gcc tgg ctg gca ccg cgt ctg cgc acg	528
Phe Gly Leu Ala Leu Leu Ala Ala Trp Leu Ala Pro Arg Leu Arg Thr	
165 170 175	
gca aaa gca cag cgc att atc aat ctg gtt gtg gga tgt gtt atg tgg	576
Ala Lys Ala Gln Arg Ile Ile Asn Leu Val Val Gly Cys Val Met Trp	
180 185 190	
ttt att gcc ttg cag ctg gcg aga gac ggt att gct cat gca caa gcc	624
Phe Ile Ala Leu Gln Leu Ala Arg Asp Gly Ile Ala His Ala Gln Ala	
195 200 205	
ttg ttc agt tag	636

<210> 16

<211> 211

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 16

```

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

```

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição de Seqüência Artificial: iniciador para amplificar o gene yahN do Escherichia coli
 <400> 17
 gtgtggaacc gacgccggat 20
 <210> 18
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Seqüência Artificial: iniciador para amplificar o gene yahN do Escherichia coli
 <400> 18
 tgttgatgg tacgggggtc gag 23
 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Seqüência Artificial: iniciador para amplificar o gene yeaS do Escherichia coli
 <400> 19
 ctttgcaat cccgtctccc 20
 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Seqüência Artificial: iniciador para amplificar o gene yeaS do Escherichia coli

<400> 20
 gccccatgca taacggaaag 20
 <210> 21
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Seqüência Artificial: iniciador para amplificar o gene
 yfiK do Escherichia coli
 <400> 21
 gaagatcttg taggccgat aaggcg 26
 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Seqüência Artificial: iniciador para amplificar o gene
 yfiK do Escherichia coli
 <400> 22
 tggttttacc aattggccgc 20
 <210> 23
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial
 <220>
 <223> Descrição de Seqüência Artificial: iniciador para amplificar o gene
 yggA do Escherichia coli
 <400> 23
 acttctcccg cgagccagtt c 21

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Seqüência Artificial

<220>

<223> Descrição de Seqüência Artificial: iniciador para amplificar o gene yggA do Escherichia coli

<400> 24

ggcaagctta ggcctctgt t

21

REIVINDICAÇÕES

1. Bactéria pertencente ao gênero *Escherichia* e tendo uma capacidade para produzir um L-aminoácido, caracterizada pelo fato de que a capacidade para produzir o L-aminoácido é aumentada pelo aumento de uma quantidade de expressão de pelo menos uma proteína selecionada do grupo que consiste das seguintes proteínas de (C) e (D):

(C) uma proteína que tenha uma seqüência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 12 na Listagem de Seqüência; e

(D) uma proteína que tenha uma seqüência de aminoácido incluindo supressão, substituição, inserção, adição ou inversão de um ou vários aminoácidos na seqüência de aminoácido apresentada na SEQ ID NO: 12 na Listagem de Seqüência, e que tenha uma atividade de aumentar a capacidade de produzir o L-aminoácido da bactéria que tenha a proteína.

2. Bactéria de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o dito L-aminoácido é L-lisina, ácido L-glutâmico, L-alanina, L-valina, L-histidina, L-prolina, ou L-isoleucina.

3. Bactéria de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que um número de cópias de um DNA que codifica para a dita proteína em uma célula é aumentado.

4. Bactéria de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que o dito DNA é carregado em um vetor de cópia múltipla na célula.

5. Bactéria de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que o dito DNA é carregado em um transposon na célula.

6. Processo para produzir um L-aminoácido, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

cultivar a bactéria como definido na reivindicação 1 em um meio de cultura, para produzir e acumular o L-aminoácido no meio e recuperar o L-aminoácido do meio.

7. Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o dito L-aminoácido é L-lisina, ácido L-glutâmico, L-alanina, L-valina, L-histidina, L-prolina, ou L-isoileucina.

5 8. Processo de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizado pelo fato de que um número de cópias de um DNA que codifica para uma dita proteína em uma dita bactéria é aumentado.

9. Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o dito DNA é carregado em um vetor de cópia múltipla na célula.

10 10. Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o dito DNA é carregado em um transposon na célula.

RESUMO

"BACTÉRIA PERTENCENTE AO GÊNERO *ESCHERICHIA* E QUE TEM UMA CAPACIDADE PARA PRODUZIR UM L-AMINOÁCIDO, E, PROCESSO PARA PRODUZIR UM L-AMINOÁCIDO"

- 5 Uma bactéria pertencente ao gênero *Escherichia* e que tem uma capacidade para produzir um L-aminoácido, em que a capacidade para produzir o L-aminoácido é aumentada aumentando-se uma quantidade de expressão de pelo menos uma proteína de excreção de L-aminoácido e um processo para produzir L-aminoácido usando a bactéria.