



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

(21) **PI0709946-0 A2**

(22) Data de Depósito: 05/04/2007  
(43) Data da Publicação: 02/08/2011  
(RPI 2117)



(51) *Int.Cl.:*  
A61K 35/74 2006.01  
C12P 21/06 2006.01  
C12N 1/20 2006.01

(54) Título: **COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA PRODUZIR PRODUTOS E RESÍDUOS DE FERMENTAÇÃO**

(30) Prioridade Unionista: 16/05/2006 US 11/383,743, 16/05/2006 US 11/383,748, 16/05/2006 US 11/383,750, 13/04/2006 US 60/744,833, 03/05/2006 US 60/797,431, 30/10/2006 US 60/863,556

(73) Titular(es): Ambrozea, Inc.

(72) Inventor(es): Peter R. David

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007066024 de 05/04/2007

(87) Publicação Internacional: WO WO2007/121100de 25/10/2007

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA PRODUZIR PRODUTOS E RESÍDUOS DE FERMENTAÇÃO A presente invenção refere-se a composições e métodos planejados para aumentar o valor da produção de uma reação de fermentação que produz um primeiro produto, pretendido para comercialização, tal como etanol, e um resíduo de fermentação usado, por exemplo, como ração animal. Os métodos envolvem usar microorganismos no processo de fermentação, os quais foram modificados para produzir um resíduo que tem um valor maior que um resíduo produzido no processo por um microorganismo não-modificado. Em particular, a presente invenção contempla usar microorganismos em um processo de fermentação, os quais foram modificados para aumentar a produção de um nutriente, tal como um aminoácido essencial, reduzindo desse modo a necessidade suplementar o nutriente na dieta do animal. A presente invenção fornece também um resíduo de fermentação modificado de valor comercial mais elevado. Também são fornecidas na presente invenção rações animais completas suplementos nutricionais que compreendem os resíduos de fermentação em questão. Ainda é fornecido pela presente invenção um método de executar a fermentação, um microorganismo fermentativo modificado e um veículo genético para modificar tal microorganismo.

PI0709946-0

Pet m: 020080153664/RJ  
(12/12/08)

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA PRODUZIR PRODUTOS E RESÍDUOS DE FERMENTAÇÃO**".

REFERÊNCIA CRUZADA

5                   Esse pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório U.S. Nº 60/744.833 depositado em 13 de abril de 2006, Pedido Provisório U.S. Nº 60/797.431 depositado em 3 de maio de 2006, Pedido Provisório U.S. Nº 60/863.556 depositado em 30 de outubro de 2006, Pedido Não-Provisório U.S. Nº 11/383.748 depositado em 16 de maio de 2006 e Pedido de Patente  
10 Não-Provisório Nº 11/383.750 depositado em 16 de maio de 2006, todos os quais estão incorporados aqui por referência em sua totalidade.

Antecedente da Invenção

A presente invenção refere-se à indústria que usa microorganismos em processos comerciais para produzir quantidades comerciais de  
15 vários compostos orgânicos e inorgânicos úteis diferentes. Esses incluem produtos químicos e farmacêuticos industriais. Exemplos de produtos químicos industriais produzidos por microorganismos incluem solventes, ácidos (e acetatos) e gases. Solventes produzidos industrialmente incluem alcoóis (por exemplo, etanol e butanol), cetonas (por exemplo, acetona) e alcanos.  
20 Ácidos produzidos industrialmente incluem, por exemplo, ácido acético (vinagre), ácido pirúvico e ácido lático. Gases industrialmente produzidos incluem, por exemplo, amônia, metano e hidrogênio. Cientistas agora estão usando biotecnologia para produzir microorganismos que incluem vias enzimáticas para produzir químicos úteis não produzidos normalmente pelo microorganismo. (Veja, por exemplo, Martin *et al.*, "Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids," Nature Biotechnology, 2003, 21:796.) Engenheiros também usam tais processos para produzir  
25 enzimas comercialmente valiosas, por exemplo, renina. Na indústria farmacêutica, micróbios produzem antibióticos e proteínas recombinantes. Nesses  
30 processos, os microorganismos são cultivados e os produtos químicos úteis são coletados (por exemplo, isolados ou removidos) da cultura.

A indústria de etanol combustível está crescendo em ritmo ace-

lerado. Vários incentivos federais e estaduais, tais como programas de combustíveis de queima limpa, promoveram um crescimento exponencial de mais de cinco vezes durante as duas últimas décadas. Em 2004, os altos preços do petróleo, um cultivo excessivo de milho e uma capacidade de processamento limitada criaram novas oportunidades de mercado e resultaram em uma produção recorde de mais de 3,4 bilhões de galões de etanol combustível. Atualmente, o etanol representa o terceiro maior mercado para o milho dos EUA. Nesse ritmo, a produção de etanol combustível está se colocando como parte essencial do desenvolvimento econômico rural e da melhoria ambiental.

O etanol pode ser feito através da fermentação e destilação de amido encontrado em cultivos tais como milho, sorgo, batata, cana de açúcar, assim como em espigas de milho. O etanol geralmente é produzido tanto em fábricas de trituração seca quanto em moinhos de trituração úmida. Os subprodutos primários gerados a partir dos moinhos de trituração úmida ou “refinarias de milho” incluem xarope de milho com alto conteúdo de frutose, óleo de milho, alimento com glúten e farelo de glúten. Os subprodutos do processo de trituração seca incluem grãos do destiladores e dióxido de carbono. Apesar de ambos os tipos de fábrica terem custos operacionais similares, as fábricas de trituração seca são geralmente menores e requerem um investimento inicial menor, tornando seus custos de capital duas a quatro vezes menores por galão. Os tipos de trituração seca de produção de etanol processam a porção de amido do milho, que é cerca de 60% da semente. Todos os nutrientes remanescentes – proteína, gordura, minerais e vitaminas – são concentrados em grãos de destilador que é um alimento valioso para animais de criação. Um alqueire de milho pesando aproximadamente 25,4 kg (56 libras) pode produzir aproximadamente 10,59 L (2,8 galões) de etanol e 8,16 kg (18 libras) de grão de destilador.

Grãos de destilador podem fornecer uma ração alimentícia de alta qualidade para gado leiteiro, gado de corte, suínos, aves domésticas, cães e aquicultura. A ração é uma substituição econômica parcial para milho, farelo de soja e fosfato de dicálcico em rações para animais de criação e

aves domésticas. Grão de destilador continua a ser um ingrediente alimentício excelente, econômico para uso em dietas de ruminantes. Foi esperado que a produção de DDGS (grãos secos de destilador com material solúvel) dobrasse de 3,5 milhões de toneladas métricas em 2002 para mais de 7 milhões de toneladas métricas em 2006. A venda de grão de destilador é uma parte importante da rentabilidade e crescimento da indústria do etanol. Se as vendas de grão de destilador seco ficar atrás do aumento da produção de etanol, a indústria de etanol atual poderia ser significativamente afetada. Um mercado efetivo de grão de destilador como ração animal indubitavelmente contribuirá para a eficiência e rentabilidade global de uma fábrica de etanol.

Esquemas de produção de etanol atuais por fermentação estão longe de serem otimizados. Apesar dos esforços direcionados para melhorar a produção de etanol, pouca pesquisa tem tido foco no aumento do valor do produto dos resíduos de fermentação incluindo grão de destilador que contribuem para uma porção significativa do mercado de ração animal.

Assim, permanece uma necessidade considerável por composições e métodos que sejam planejados para aumentar o valor do produto de uma fábrica de fermentação. Um esquema de fermentação ideal manteria a alta produção de etanol e, ao mesmo tempo, fornecer resíduos de fermentação de alto valor comercial. A presente invenção satisfaz essa necessidade e também fornece vantagens relacionadas.

### Sumário da Invenção

Essa invenção fornece microorganismos modificados e processos para o uso desses microorganismos que, quando fermentados, fornecem um produto comercial e um resíduo de fermentação que têm valor comercial maior do que um resíduo de fermentação produzido na reação de fermentação por um microorganismo que não tenha sido modificado. Em uma modalidade, o valor comercial aumentado resulta dos aumentos de nutrientes no resíduo, tornando-o mais desejável como ração animal.

Em um aspecto, essa invenção fornece um método que compreende: (a) misturar um material que contém carbono com uma cultura que compreende microorganismos geneticamente modificados que, em um pro-

- cesso de fermentação, produzem um primeiro produto e um resíduo de fermentação que compreende um nutriente, em que o conteúdo do nutriente no resíduo de fermentação é maior do que aquele de microorganismos correspondentes não-modificados quando usados no processo de fermentação; (b)
- 5 fermentar a cultura sob condições adequadas para a produção comercial do primeiro produto e sob condições adequadas para a produção do nutriente; (c) separar o primeiro produto da cultura; e (d) produzir o resíduo de fermentação como descrito.

Em uma modalidade, os microorganismos compreendem um

10 vetor de expressão recombinante que compreende uma seqüência de nucleotídeos exógena que codifica um polipeptídeo e uma seqüência regulatória que controla a expressão do polipeptídeo exógeno, em que a expressão do polipeptídeo exógeno resulta em conteúdo nutricional aumentado do resíduo de fermentação comparado com aquele do microorganismo não-

15 modificado. Em outra modalidade, o nutriente produzido pelos microorganismos é selecionado do grupo que consiste em uma gordura, um ácido graxo, um lipídio, uma vitamina, um aminoácido essencial, um peptídeo, uma proteína, um carboidrato, um esteroide, uma enzima e um mineral-traço. Em uma modalidade adicional, o nutriente produzido pelos microorganismos é

20 selecionado do grupo de aminoácidos essenciais que consiste em lisina, metionina, fenilalanina, treonina, isoleucina, triptofano, valina, leucina, arginina, taurina e histidina.

Em outra modalidade, a expressão da seqüência exógena está sob o controle de uma seqüência regulatória selecionada do grupo que

25 consiste em uma seqüência regulatória de um gene de choque térmico, em uma seqüência regulatória de um gene de toxicidade e uma seqüência regulatória de um gene de formação de esporo. Em outra modalidade, a expressão da seqüência exógena é induzida quando a reação de fermentação tiver atingido pelo menos cerca de 50% do término. Em outra modalidade ainda, a

30 expressão da seqüência de nucleotídeos exógena depende da concentração de glicose.

Em uma modalidade, a modificação genética modifica pelo me-

nos um dos genes estruturais na via sintética do nutriente. Em outra modalidade, a modificação genética modifica um controle regulatório da via sintética do nutriente.

5 Em outra modalidade, a via sintética é para um aminoácido essencial selecionado do grupo que consiste em lisina, metionina, fenilalanina, treonina, isoleucina, triptofano, valina, leucina, arginina, taurina e histidina. Em uma modalidade adicional, a modificação genética modifica os processos de transporte do nutriente para fora ou para dentro do microorganismo.

10 Em uma modalidade, o nutriente é um aminoácido essencial selecionado do grupo que consiste em lisina, metionina, fenilalanina, treonina, isoleucina, triptofano, valina, leucina, arginina, taurina e histidina. Em outra modalidade, o nutriente é uma vitamina. Em outra modalidade, a vitamina é selecionada do grupo que consiste em vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B7, vitamina B9, vitamina  
15 B12, vitamina C, vitamina D1–D4, um tocoferol, e vitamina K. Em uma modalidade adicional, o nutriente é um lipídio.

Em uma modalidade, o primeiro produto é um álcool. Em outra modalidade, o álcool é etanol. Em uma modalidade adicional, o álcool é selecionado do grupo que consiste em metanol, propanol e butanol. Em uma  
20 modalidade adicional, o álcool é separado por destilação. Outra modalidade ainda compreende misturar o álcool com outro combustível.

Em uma modalidade, o primeiro produto é selecionado entre um solvente ou um gás. Em outra modalidade, o primeiro produto é um composto farmacêutico.

25 Em outra modalidade, o material que contém carbono é selecionado do grupo que consiste em celulose, lascas de madeira, vegetais, biomassa, excretas, resíduos animais, aveia, trigo, milho, cevada, cará, painço, arroz, centeio, sorgo, batata, beterraba, cará, mandioca, frutas, sucos de fruta, e cana-de-açúcar.

30 Em outra modalidade, o resíduo de fermentação compreende grãos secos de destilador, solúveis secos de destilador ou grãos secos de destilador com solúveis. Uma modalidade adicional compreende ainda incor-

porar o resíduo de fermentação em ração animal. Em outra modalidade, o nutriente é produzido quando a fermentação está substancialmente completa.

Em uma modalidade, o microorganismo é levedura. Em outra modalidade, a levedura é um *Saccharomyces*. Em outra modalidade ainda, os microorganismos compreendem levedura, a fonte de carbono compreende amido de milho ou sacarose, o primeiro produto compreende etanol e o nutriente é selecionado entre lisina, metionina, triptofano e treonina.

Em outra modalidade ainda, o microorganismo compreende *Clostridium*. Em outra modalidade, o produto é butanol ou acetona. Em uma modalidade adicional, os microorganismos compreendem *Clostridium*, a fonte de carbono compreende amido de milho ou sacarose, o primeiro produto compreende etanol e o nutriente é selecionado entre lisina, metionina, triptofano e treonina. Em uma modalidade adicional, o microorganismo é selecionado do grupo que consiste em *Zymomonas* sp., *E. coli*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium* e *Bacillus* ssp. Uma modalidade adicional compreende comercializar o primeiro produto e o resíduo de fermentação.

Em outro aspecto, essa invenção fornece um método de fermentação compreendendo: (a) misturar um material que contém carbono com uma cultura que compreende microorganismos geneticamente modificados que, durante a fermentação, produzem um primeiro produto e um resíduo de fermentação, em que o valor do resíduo de fermentação é maior do que aquele de um resíduo de fermentação produzido por fermentar um microorganismo correspondente não-modificado; (b) fermentar a cultura sob condições adequadas para a produção do primeiro produto e para a produção do resíduo de fermentação que tem o maior valor; (c) separar o primeiro produto da cultura; e (d) coletar o resíduo de fermentação.

Em uma modalidade, o resíduo de fermentação compreende uma quantidade aumentada de um produto industrial ou farmacêutico. Em outra modalidade, o resíduo de fermentação exibe uma propriedade física melhorada. Em uma modalidade adicional, o resíduo de fermentação exibe uma propriedade física melhorada selecionada dentre aderência aumentada ou densidade aumentada.

Em outro aspecto, essa invenção fornece um microorganismo geneticamente modificado que, em um processo de fermentação, produz um primeiro produto para comercialização e um resíduo de fermentação que compreende um nutriente, em que o conteúdo do nutriente no resíduo de fermentação é maior do que aquele de um microorganismo correspondente não-modificado quando usado na reação de fermentação.

Em uma modalidade, o microorganismo geneticamente modificado compreende um vetor de expressão recombinante que compreende uma seqüência de nucleotídeos exógena que codifica um polipeptídeo e uma seqüência regulatória que controla a expressão do polipeptídeo exógeno, em que a expressão do polipeptídeo exógeno resulta em conteúdo nutricional aumentado do resíduo de fermentação comparado com aquele do microorganismo não-modificado.

Em outra modalidade, o nutriente é selecionado do grupo que consiste em uma gordura, um ácido graxo, um lipídio, uma vitamina, um aminoácido essencial, um peptídeo, uma proteína, um carboidrato, um esteroide, uma enzima e um mineral-traço. Em uma modalidade adicional, o nutriente é um aminoácido essencial para pelo menos um animal doméstico e o polipeptídeo exógeno compreende o aminoácido essencial. Em uma modalidade adicional, o aminoácido essencial é selecionado do grupo que consiste em lisina, metionina, fenilalanina, treonina, isoleucina, triptofano, valina, leucina, arginina, taurina e histidina.

Em uma modalidade, a expressão da seqüência exógena está sob o controle de uma seqüência regulatória selecionada do grupo que consiste em uma seqüência regulatória de gene de choque térmico, uma seqüência regulatória de gene de toxicidade e uma seqüência regulatória de gene de formação de esporo. Em outra modalidade, a modificação genética modifica pelo menos um dos genes estruturais na via de síntese do nutriente. Em outra modalidade, a modificação genética modifica um controle regulatório da via de síntese do nutriente. Em uma modalidade adicional, a via de síntese é para um aminoácido essencial para um animal doméstico.

Em uma modalidade, a modificação genética modifica um con-

trole regulatório da via de síntese do nutriente. Em outra modalidade, a modificação genética modifica um gene estrutural que regula a síntese de um peptídeo que contém pelo menos um aminoácido essencial para um animal doméstico. Em uma modalidade adicional, a modificação genética modifica os processos de transporte de nutriente para fora ou para dentro do microorganismo.

Em outra modalidade, a expressão de uma seqüência exógena é induzida quando a reação de fermentação atingiu pelo menos cerca de 50% do total. Em outra modalidade, pelo menos 50% do total é evidenciado pela diminuição no conteúdo de glicose para menos do que cerca de 50% do conteúdo de glicose inicial presente em uma mistura de reação de fermentação antes do início da reação de fermentação. Em uma modalidade adicional, a expressão da seqüência de nucleotídeos exógena depende da concentração de glicose.

Em uma modalidade, o nutriente é um aminoácido essencial para pelo menos um animal doméstico. Em outra modalidade, o aminoácido essencial é selecionado do grupo que consiste em lisina, metionina, fenilalanina, treonina, isoleucina, triptofano, valina, leucina, arginina, taurina e histidina. Em uma modalidade adicional, o nutriente é uma vitamina. Em outra modalidade, a vitamina é selecionada do grupo que consiste em vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B7, vitamina B9, vitamina B12, vitamina C, vitamina D1–D4, um tocoferol, e vitamina K.

Em uma modalidade, o produto comercial é um álcool. Em outra modalidade, o álcool é etanol. Em uma modalidade adicional, o produto comercial é selecionado entre um solvente ou um gás. Em outra modalidade, o produto comercial é um composto farmacêutico. Em outra modalidade, o nutriente é um lipídio. Em uma modalidade adicional, o álcool é selecionado do grupo que consiste em metanol, propanol e butanol.

Em uma modalidade, o microorganismo é levedura. Em outra modalidade, a levedura é *Saccharomyces*. Em uma modalidade adicional, o microorganismo é *Clostridium*. Em uma modalidade adicional, o microorga-

nismo é selecionado do grupo que consiste em *Zymomonas* sp., *E. coli*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium* e *Bacillus* ssp.

Em outro aspecto, esta invenção fornece uma cultura de fermentação que compreende: (a) um microorganismo geneticamente  
5 modificado que, em uma reação de fermentação, produz um primeiro produto para comercialização e um resíduo de fermentação que compreende um nutriente, em que o conteúdo do nutriente no resíduo de fermentação é maior do que aquele de um microorganismo correspondente não-modificado quando usado na reação de fermentação e (b) um meio de fermentação que  
10 compreende uma fonte do carbono para a produção do nutriente, em que a cultura produz o produto.

Em uma modalidade, o nutriente é selecionado do grupo que consiste em uma gordura, um ácido graxo, um lipídio, uma vitamina, um aminoácido essencial, um peptídeo, uma proteína, um carboidrato, um  
15 esterol, uma enzima, e um mineral-traço. Em outra modalidade, a fonte do carbono é selecionada de celulose, de lascas de madeira, vegetais, biomassa, excretas, resíduos animais, aveia, trigo, milho, da cevada, milho, painço, arroz, centeio, sorgo, batata, beterraba, cará, mandioca, frutas, sucos de fruta, e cana-de-açúcar.

20 Em outra modalidade, o primeiro produto é um álcool. Em uma modalidade adicional, o álcool é etanol. Em uma modalidade adicional, o álcool é selecionado do grupo que consiste em metanol, propanol, e butanol.

Em uma modalidade, o primeiro produto é um composto farmacêutico. Em outra modalidade, o primeiro produto é selecionado de um  
25 solvente ou um gás.

Em outra modalidade, o microorganismo é levedura. Em outra modalidade, a levedura é *Saccharomyces*. Em uma modalidade adicional, o microorganismo é *Clostridium*. Em uma modalidade adicional, o microorganismo é selecionado do grupo que consiste em *Zymomonas* sp., *E.*  
30 *coli*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium* e *Bacillus* ssp.

Em uma modalidade, o volume é de pelo menos 100 litros. Em outra modalidade, os microorganismos compreendem levedura, a fonte de

carbono compreende amido de milho ou sacarose, o primeiro produto compreende etanol e o nutriente é selecionado de lisina, metionina, triptofano e treonina. Em uma modalidade adicional, os microorganismos compreendem *Clostridium*, a fonte de carbono compreende amido de milho ou sacarose, o primeiro produto compreende etanol e o nutriente é selecionado dentre lisina, metionina, triptofano e treonina.

Em outro aspecto, esta invenção compreende um vetor de expressão que compreende uma seqüência exógena que codifica um polipeptídeo que compreende pelo menos um aminoácido essencial para um animal domesticado, em que a expressão da seqüência exógena é induzida quando uma reação de fermentação que produz um álcool ou um alceno tiver atingido pelo menos cerca de 50% do término.

Em uma modalidade, a seqüência exógena está sob o controle de uma seqüência regulatória selecionada do grupo que consiste em um operon do supressor de glicose, seqüência regulatória de um gene de choque térmico, seqüência regulatória de um gene de toxicidade, seqüência regulatória de um gene de formação de esporo. Em outra modalidade, pelo menos cerca de 5% dos resíduos de aminoácido contidos no polipeptídeo são aminoácidos essenciais para um animal domesticado.

Em outro aspecto, esta invenção fornece um resíduo de fermentação de um processo de fermentação comercial de um microorganismo geneticamente modificado, o dito resíduo de fermentação tendo uma quantidade maior de um nutriente em comparação a um resíduo de fermentação de um processo de fermentação comercial de um microorganismo não-modificado geneticamente.

Em uma modalidade, o resíduo de fermentação compreende grãos secos de destilador. Em outra modalidade, o resíduo de fermentação compreende solúveis secos de destilador. Em uma modalidade adicional, o resíduo de fermentação compreende grãos secos de destilador com solúveis.

Em uma modalidade, o resíduo de fermentação compreende o microorganismo geneticamente modificado. Em outra modalidade, o

nutriente é selecionado do grupo que consiste em uma gordura, um ácido graxo, um lipídio, uma vitamina, um aminoácido essencial, um peptídeo, uma proteína, um carboidrato, um esteroide, uma enzima, e um mineral-traço. Em uma modalidade adicional, o processo de fermentação produz um produto químico industrial para isolamento.

5 (12) Em uma modalidade, o nutriente é um aminoácido essencial selecionado do grupo que consiste em lisina, metionina, treonina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptofano, e arginina. Em outra modalidade, o aminoácido essencial está contido em um polipeptídeo heterólogo produzido por um microorganismo usado no processo de fermentação. Em uma modalidade adicional, o polipeptídeo heterólogo contém pelo menos cerca de 5% de aminoácidos essenciais como resíduos de aminoácido. Em uma modalidade adicional, o aminoácido essencial está presente em uma quantidade que excede cerca de 3% do resíduo de fermentação em peso seco.

10 (13) Em outra modalidade, o resíduo de fermentação é suplementado com um flavorizante. Em outra modalidade, o resíduo de fermentação é embalado com instruções para uso como ração animal. Em uma modalidade adicional, a ração animal completa compreende pelo menos cerca de 15% do resíduo de fermentação em peso.

15 (14) Em uma modalidade, ração animal completa compreende um resíduo de fermentação que resulta de um processo de fermentação comercial de um microorganismo geneticamente modificado, o dito resíduo de fermentação tendo uma quantidade maior de um nutriente em comparação a um resíduo de fermentação de um processo de fermentação comercial de um microorganismo não-modificado geneticamente. Em outra modalidade, a ração animal completa compreende o microorganismo geneticamente modificado. Em uma modalidade adicional, a ração animal completa compreende um sabor evidente para um animal de interesse. Em uma modalidade adicional, o nutriente é selecionado do grupo de aminoácidos essenciais que consiste em lisina, metionina, treonina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptofano, e arginina. Em outra modalidade, o aminoácido

essencial está contido em um polipeptídeo heterólogo produzido por um microorganismo usado na reação de fermentação.

Em outro aspecto, esta invenção fornece método comercial que compreende (a) fermentar uma cultura que contém microorganismos geneticamente modificados e uma fonte de carbono para produzir um primeiro produto, separar o primeiro produto da cultura e coletar um resíduo de fermentação, em que o resíduo de fermentação tem um valor comercial mais elevado do que um resíduo de fermentação produzido por fermentar um microorganismo correspondente não-modificado; e (b) comercializar ou vender o primeiro produto e o resíduo da fermentação.

Em uma modalidade, o resíduo de fermentação tem uma quantidade aumentada de um nutriente comparado com um resíduo de fermentação produzido por cultivar um microorganismo correspondente não-modificado na reação de fermentação. Em outra modalidade, o nutriente é selecionado do grupo que consiste em uma gordura, um ácido graxo, um lipídio, uma vitamina, um aminoácido essencial, um peptídeo, uma proteína, um carboidrato, um esteroide, uma enzima, e um mineral-traço.

Em outra modalidade, o resíduo de fermentação tem propriedades físicas melhoradas. Em uma modalidade adicional, o resíduo de fermentação tem uma quantidade aumentada de um composto industrial ou farmacêutico. Em uma modalidade adicional, o microorganismo é levedura. Em uma modalidade adicional, o microorganismo é *Clostridium*.

Em outra modalidade, a fonte de carbono compreende amido de milho ou sacarose. Em uma modalidade adicional, o primeiro produto é um álcool selecionado do grupo que consiste em etanol, metanol, propanol, e butanol. Em outra modalidade, o primeiro produto é um biocombustível e o método compreende adicionalmente misturar o biocombustível com outro combustível para a comercialização.

Em uma modalidade, o nutriente é selecionado do grupo que consiste em uma gordura, um ácido graxo, um lipídio, uma vitamina, um aminoácido essencial, um peptídeo, uma proteína, um carboidrato, um esteroide, uma enzima, e um mineral-traço. Em outra modalidade, o resíduo de

fermentação compreende grãos secos de destilador, solúveis secos de destilador ou grãos secos de destilador com solúveis. Outra modalidade compreende misturar o resíduo de fermentação com outros nutrientes para produzir uma ração completa para um animal domesticado. Em outros  
5 aspectos, esta invenção fornece um processo que compreende combinar um resíduo de fermentação com um nutriente e uma composição que compreende um resíduo de fermentação suplementado com um nutriente exógeno.

A presente invenção também tem como modalidades variações  
10 e todas as combinações da composição e métodos descritos aqui.

#### Incorporação por Referência

Todas as publicações e pedidos de patente mencionados nesta especificação estão incorporados aqui por referência da mesma proporção que se cada publicação ou pedido de patente individual fosse especifica-  
15 mente e individualmente incorporado por referência.

#### Breve Descrição dos Desenhos

As ilustrações incluídas dentro desta especificação descrevem muitas das vantagens e características da invenção. Deve ser compreendido que numerais e caracteres semelhantes observados dentro das ilustrações  
20 aqui contidas podem designar características iguais ou semelhantes da invenção. As ilustrações e características descritas aqui não estão necessariamente desenhadas em escala.

A figura 1 é um fluxograma que descreve processo de produção de etanol exemplar que resulta na formação de etanol, dióxido de carbono e  
25 resíduos de fermentação tais como grão de destilador com solúveis ou sólidos (DDGS).

A figura 2 é uma representação esquemática de um veículo genético exemplar útil para modificar um microorganismo usado reação de fermentação em questão.

30 A figura 3A é um diagrama do vetor pKS1-ST:GO6205 usado para a expressão das proteínas ricas em lisina em *Saccharomyces cerevisiae*.

A figura 3B é um diagrama do vetor pKS2-ST:GO6205 usado pa-

ra a expressão e secreção das proteínas ricas em lisina dentro de *Saccharomyces cerevisiae*.

5 A figura 4A é a seqüência da proteína expressa por pKS1-ST:GO6205, uma endopeptidase rica em lisina, específica de *Flavobacterium meningosepticum*.

A figura 4B é a seqüência da proteína expressa por pKS2-ST:GO6205, uma endopeptidase rica em lisina, específica de *Flavobacterium meningosepticum* contendo um sinal de exportação SUC2.

10 A figura 5A é uma imagem de um gel de SDS-PAGE do sobrenadante de cultura empregado por 24 horas no crescimento de uma cultura celular de *Saccharomyces cerevisiae* mostrando expressão e secreção da proteína codificada por pKS2-ST:GO6205.

15 A figura 5B é uma imagem de um gel de SDS-PAGE do sobrenadante de cultura empregado por 48 horas no crescimento de uma cultura celular de *Saccharomyces cerevisiae* transformada mostrando expressão e secreção da proteína codificada por pKS2-ST:GO6205.

20 A figura 6 é uma imagem de um gel de SDS-PAGE de lisados celulares de uma cultura celular de *Saccharomyces cerevisiae* transformada mostrando expressão da proteína codificada por pKS1-ST:GO6205 dentro da célula.

A figura 7 é um diagrama esquemático de um processo de fermentação produtor de etanol da invenção.

A figura 8 é um diagrama de um processo de fermentação seqüencial conhecido na técnica.

25 A figura 9 é um diagrama de um processo de fermentação paralelo da presente invenção.

A figura 10 é um diagrama de um processo de fermentação paralelo da presente invenção ilustrando processamento a jusante adicional.

30 A figura 11 é um diagrama de um processo de fermentação paralelo da presente invenção ilustrando etapas de pré-processamento antes da fermentação paralela.

A figura 12 é um diagrama de um processo de fermentação para-

lela da presente invenção ilustrando outros processos concomitantes.

A figura 13 é um diagrama de um processo de fermentação paralela da presente invenção incluindo 3 fermentações em paralelo.

A figura 14 é o site da internet comentado de  
5 [http://pathway.yeastgenome.org:8555/YEAST/new-  
image?type=OVERVIEW&force=t](http://pathway.yeastgenome.org:8555/YEAST/new-image?type=OVERVIEW&force=t). Ele mostra vias enzimáticas em levedura e identifica várias em particular. O site da internet contém links para enzimas específicas ao longo das vias.

#### Descrição Detalhada da Invenção

10 Embora modalidades preferidas da invenção tenham sido mostradas e descritas aqui, será óbvio para aqueles versados na técnica que tais modalidades são fornecidas apenas como forma de exemplo. Várias variações, alterações, e substituições serão vislumbradas por aqueles versados na técnica sem desconsiderar a invenção. Deve ser compreendido que vá-  
15 rias alternativas para as modalidades da invenção descritas aqui podem ser empregadas na prática da invenção.

O termo "animal" significa qualquer organismo que pertence ao reino Animalia e inclui, sem limitação, aves (por exemplo, aves domésticas), mamíferos (por exemplo, gado, suínos, cabra, ovelha, cão, camundongo e  
20 cavalo) e insetos (por exemplo, bicho da seda) assim como animais usados em aqüicultura, por exemplo, peixes (por exemplo, truta e salmão), moluscos, (por exemplo, vôngoles) e crustáceos (por exemplo, lagosta e camarão).

O termo "resíduos de fermentação" conforme aqui utilizado significa qualquer substância residual que resulte diretamente de uma reação de  
25 fermentação. Em alguns casos, um resíduo de fermentação contém microorganismos modificados tal que ele tenha um conteúdo nutricional aumentado quando comparado a um resíduo de fermentação que é deficiente em tal microorganismo modificado. Os resíduos de fermentação podem conter constituinte(s) adequado(s) de um caldo de fermentação. Por exemplo, os resíduos  
30 de fermentação podem incluir constituintes dissolvidos e/ou suspensos de um caldo de fermentação. Os constituintes suspensos podem incluir constituintes solúveis não-dissolvidos (por exemplo, quando a solução é supersaturada

com um ou mais componentes) e/ou materiais insolúveis presentes no caldo de fermentação. Os resíduos de fermentação podem incluir substancialmente todos os sólidos secos presentes no final de uma fermentação (por exemplo, por secagem por atomização de um caldo de fermentação e da biomassa produzida pela fermentação) ou pode incluir uma porção deste. Os resíduos de fermentação podem incluir produto de fermentação bruto da fermentação onde um microorganismo modificado pode ser fracionado e/ou parcialmente purificado para aumentar o conteúdo de nutrientes do material. Resíduos de fermentação abrangem resíduos inteiros e frações do resíduo total, por exemplo, resíduos secos (por exemplo, grãos), solúveis secos e sólidos secos (por exemplo, grãos) com solúveis secos.

O termo “cultura de fermentação” refere-se a microorganismos contidos em um meio que compreende materiais suficientes para o crescimento dos microorganismos, por exemplo, água e nutrientes.

O termo “produto comercial” refere-se a um produto pretendido para comercialização, por exemplo, para venda ao consumidor final.

O termo “processo de fermentação comercial” refere-se a um processo de fermentação no qual microorganismos são cultivados para produzir um produto, por exemplo, um composto, que é isolado da cultura de fermentação para comercialização, deixando um resíduo de fermentação.

O termo “ácido graxo” conforme aqui utilizado significa um ácido monocarboxílico alifático ou aromático.

O termo “lipídios” conforme aqui utilizado significa gorduras ou óleos incluindo sem limitação os ésteres de glicerídeo de ácidos graxos junto com fosfatídeos, esteróis, alcoóis, hidrocarbonetos, cetonas e compostos relacionados associados.

O termo “nutriente” conforme aqui utilizado significa qualquer substância com valor nutricional. Ele pode ser parte de uma ração animal ou de um suplemento alimentar para seres humanos. Nutrientes exemplares incluem, mas não são limitados a gorduras, ácidos graxos, lipídios (tais como fosfatídeos), vitaminas, aminoácidos essenciais, peptídeos, proteínas, carboidratos, esteróis, enzimas, e minerais-traço (tais como, ferro, cobre,

zinco, manganês, cobalto, iodo, selênio, molibdênio, níquel, flúor, vanádio, estanho e silicone). O nutriente pode ser secretado por um microorganismo modificado em um caldo de fermentação ou estar contido dentro do microorganismo (por exemplo, corpos de inclusão no microorganismo).

5                   “Polipeptídeo heterólogo” ou “proteína heteróloga” significa derivada de (isto é, obtida de) uma entidade genotipicamente distinta do resto da entidade com a qual ele está sendo comparado, ou que é geneticamente indistinto, mas produzido em uma concentração anormalmente alta ou baixa quando comparado a um ambiente ou microorganismo nativo.

10                   O termo “ácido graxo insaturado” conforme aqui utilizado significa um ácido graxo com 1 a 3 ligações duplas e um “ácido graxo altamente insaturado” significa um ácido graxo com 4 ou mais ligações duplas.

Uma “ração animal completa” é uma ração para um animal que não requer suplementação nutricional.

15                   Características que aumentam o valor comercial de um resíduo de fermentação incluem, por exemplo, desejo como ração animal e utilidade aumentada em processos industriais e farmacológicos. Características que aumentam o valor como ração animal incluem, por exemplo, aumentos nos nutrientes e características físicas aperfeiçoadas. Uma característica física

20                   aperfeiçoada é aderência aumentada, a qual permite que o material seja facilmente transformado em péletes. Isso pode resultar, por exemplo, de expressão de goma ou cera. Outra característica física aperfeiçoada é densidade aumentada. Isso pode resultar da produção de celulases que decompõem o farelo. Um exemplo de algo que aumenta o valor de um resíduo em

25                   um processo industrial é a produção de polímeros úteis, por exemplo, para plásticos, tal como ácido polilático. Um exemplo de algo que aumenta o valor em um processo farmacológico é a produção de produtos farmacológicos, tais como antibióticos.

#### Processo de Fermentação

30                   “Fermentação” como aqui utilizada significa um processo de cultivar microorganismos. A fermentação pode ser anaeróbica (deficiente em oxigênio) ou aeróbica (oxigenada). Sob condições aeróbicas, os microorga-

nismos, tais como células de levedura, podem degradar açúcares para produtos finais tais como  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . Sob condições anaeróbicas, as células de levedura utilizam uma via alternativa para produzir  $\text{CO}_2$  e etanol. A reação de fermentação da presente invenção é preferivelmente anaeróbica, isto é, parcialmente ou completamente deficiente em oxigênio. A fermentação também pode ser usada para referir-se ao crescimento de uma massa de microorganismos em um meio de crescimento onde não é feita distinção entre metabolismo aeróbico e anaeróbico. A fermentação pode incluir crescimento simultâneo de múltiplas cepas ou espécies de microorganismos.

10 A presente invenção também abrange fermentação de metano. A fermentação de metano pode converter todos os tipos de materiais poliméricos para metano e dióxido de carbono sob condições anaeróbicas. Isso pode ser obtido como um resultado da quebra química consecutiva de polímeros para metano e dióxido de carbono em um ambiente no qual uma variedade de microorganismos incluindo micróbios fermentativos (acidógenos), micróbios produtores de hidrogênio, formadores de acetato (acetógenos), e micróbios produtores de metano (metanógenos), crescem harmoniosamente e produzem os produtos finais reduzidos.

20 A fermentação de metano é a consequência de uma série de interações metabólicas entre vários grupos de microorganismos. Os microorganismos secretam enzimas que fragmentam materiais poliméricos e hidrolisam os polímeros e fragmentos para monômeros tais como glicose e aminoácidos, os quais são subseqüentemente convertidos para ácidos graxos voláteis maiores,  $\text{H}_2$ , e ácido acético. No segundo estágio, bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio convertem, os ácidos graxos voláteis maiores, por exemplo, ácidos propiônico e butírico, produzidos, para  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$  e ácido acético. Finalmente, o terceiro grupo, bactérias metanogênicas convertem  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$  e acetato em  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$ . Materiais poliméricos tais como lipídios, proteínas, e carboidratos podem ser primariamente hidrolisados por hidrolases extracelulares secretadas por microorganismos. Enzimas hidrolíticas (lipases, proteinases, celulasas, amilases, etc.) podem hidrolisar seus respectivos polímeros em moléculas menores, primeiramente unidades mono-

méricas, as quais podem então ser consumidas por microorganismos.

Enzimas tais como, lipases podem converter lipídios para ácidos graxos de cadeia longa. clostrídios e os micrococcos são os exemplos de produtores de lipases extracelulares. As proteínas podem ser hidrolisadas usualmente para aminoácidos por proteases, secretadas por *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Selenomonas* e *Streptococcus*. Os aminoácidos produzidos podem então ser degradados para ácidos graxos tais como acetato, propionato, e butirato e para amônia como encontrado em *Clostridium*, *Peptococcus*, *Selenomonas*, *Campylobacter* e *Bacteroides*.

Polissacarídeos tais como celulose, amido, e pectina podem ser hidrolisados por celulases, amilases e pectinases. A maioria das bactérias anaeróbias sofrem metabolismo de hexose através da via de Emden-Meyerhof-Parnas (EMP) a qual produz piruvato como um intermediário junto com NADH. O piruvato e o NADH assim gerados podem então ser transformados em produtos finais de fermentação tal como lactato, propionato, acetato e etanol por outras atividades enzimáticas que podem variar com espécies de microorganismos.

Dessa forma, na hidrólise e acidogênese, açúcares, aminoácidos, e ácidos graxos produzidos por microorganismo pela degradação de biopolímeros são metabolizados para endoprodutos de fermentação tais como lactato, propionato, acetato, dióxido de carbono, e etanol por outras atividades enzimáticas que variam com a espécie de microorganismo. Metanógenos, tais como *Methanosarcina spp.* e *Methanotherix spp.*, também são produtores de metano na digestão anaeróbica. Embora o acetato e  $H_2/CO_2$  sejam os principais substratos disponíveis no ambiente natural, formato, metanol, metilaminas e CO também podem ser convertidos para  $CH_4$ .

A figura 1 é um fluxograma de um processo de fabricação de etanol que resulta na produção de resíduos de fermentação que incluem, mas não são limitados a grão seco de destilador com solúveis ou sólidos (DDGS) de acordo com a invenção. Muitos produtos de ração podem resultar do processo de fabricação de etanol que freqüentemente utiliza milho como o material inicial, por exemplo, conforme ilustrado, mas deve ser compreendido

que outras fontes de carboidrato ou amido tais como outros produtos de grão também podem ser incorporados à invenção.

#### A. Fontes de Carbono

Os processos de fermentação desta invenção prosseguem por  
5 fornecer aos microorganismos uma fonte de carbono na qual eles podem crescer. Em certas modalidades, os microorganismos direcionam carbono destas fontes de carbono para dentro de vias enzimáticas que produzem químicos industriais. Por exemplo, a levedura converte glicose em etanol através da via de glicólise. Há uma variedade de fontes de carbono que po-  
10 dem ser usadas no processo de fermentação da presente invenção. Em uma modalidade, a fonte de carbono é uma biomassa, isto é, material de planta. A matéria-prima para a maior parte da produção de álcool inclui um cultivo ou derivado de cultivo, incluindo grãos e frutos. O material pode ser inteiro ou pode ser processado, por exemplo, por moagem ou trituração. Por exem-  
15 plo, a fonte de carbono pode incluir milho, trigo, milo, aveia, cevada, arroz, centeio, sorgo, batata, soro de leite, beterraba, inhame, mandioca, frutas, sucos de frutas, e cana de açúcar. As fontes de carbono usadas no proces-  
so de fermentação da presente invenção podem ser naturais, modificadas quimicamente, ou modificadas geneticamente. Os exemplos de fonte de car-  
20 bono que pode ser fermentada por microorganismos modificados da presen- te invenção incluem, mas não são limitados a milho, canola, alfafa, arroz, centeio, sorgo, girassol, trigo, soja, tabaco, batata, amendoim, algodão, bata- ta doce, mandioca, café, coco, árvores de cítricos, cacau, chá, frutas tais como banana, figo, abacaxi, goiaba, manga, aveia, cevada, vegetais, orna-  
25 mentais, e coníferas. Fontes de carbono preferíveis são plantas de cultivo, por exemplo, cereais, e "grãos", milho, trigo, milo, aveia, amaranto, arroz, sorgo, painço, mandioca, cevada, ervilha, tapioca, batatas, e outras raízes de tubérculos ou sementes de cultivo. Uma biomassa na forma de resíduos da agricultura tal como restos de milho, talo de arroz, adubo, etc., e cultivos  
30 de biomassa tais como grama ou choupo, salgueiros e ainda resíduos municipais tais como jornais podem ser convertidos em álcool. A fonte de carbono pode incluir qualquer fonte de carbono apropriada tal

como madeira, restos de papel, adubo, soro de queijo, melado, beterraba ou cana de açúcar. Esta fonte de carbono pode incluir xarope de milho não-hidrolisado ou amido de milho que é uma fonte de carbono barata. A fonte de carbono pode incluir dióxido de carbono para anaeróbios tais como acetógenos e metanógenos, e para microorganismos fotossintéticos.

Um material partida que contém carbono preferido para a fermentação é milho e em particular amido de milho. O milho tem cerca de dois terços de amido, o qual é convertido durante um processo de fermentação e destilação em etanol e dióxido de carbono. Os nutrientes restantes ou resíduos de fermentação podem resultar em solúveis de destilador condensados ou grãos de destilador tal como DDGS, o qual pode ser usado em produtos de reação. Em geral, o processo envolve uma etapa de preparação inicial de trituração ou moagem seca do milho. O milho processado é então submetido à hidrólise e enzimas adicionadas para quebrar o componente de amido principal é uma etapa de sacarificação. A etapa seguinte da fermentação é deixada ocorrer pela adição de um microorganismo modificado (por exemplo, levedura) fornecido de acordo com uma modalidade da invenção para produzir produtos gasosos tal como dióxido de carbono. A fermentação é conduzida para a produção de etanol o qual pode ser destilado do caldo de fermentação. O resto do meio de fermentação pode ser então seco para produzir resíduos de fermentação incluindo DDGS. Esta etapa geralmente inclui um processo de separação sólido/líquido por centrifugação em que um componente de fase sólida pode ser coletado. Outros métodos incluindo técnicas de filtração e secagem por atomização podem ser empregados para efetuar tal separação. Os componentes da fase líquida podem ser submetidos posteriormente a uma etapa de evaporação que pode concentrar subprodutos solúveis, tais como açúcares, glicerol e aminoácidos, antes de serem recombinados com o componente da fase sólida para serem secos como resíduos de fermentação. Deve ser compreendido que as composições em questão podem ser aplicadas a fábricas de etanol novas ou já existentes com base na trituração seca para fornecer um processo de produção de etanol integrado que também produz resíduos de fermentação com valor aumentado.

Resíduos de fermentação preferidos produzidos de acordo com a presente invenção têm um valor comercial mais elevado do que os resíduos de fermentação convencionas. Por exemplo, os resíduos de fermentação podem incluir sólidos secos intensificados tal como DDGS com conteúdo de aminoácido e de micronutrientes melhorado. Um produto de DDGS de "cor dourada" pode então ser fornecido, o qual geralmente indica maior digestibilidade de aminoácido em comparação a DDGS de cor mais escura. Por exemplo, DDGS de cor clara pode ser produzido com uma concentração de lisina aumentada de acordo com uma modalidade preferível aqui contida em comparação com um produto de cor mais escura geralmente com menor valor nutricional. A cor dos produtos tende a ser um importante fator ou indicador na avaliação da qualidade e digestibilidade do nutriente dos resíduos de fermentação ou DDGS. A cor é usada como um indicador da exposição a excesso de calor durante a secagem causando caramelização e reações de Millard dos grupos amina livres e açúcares, reduzindo a qualidade de alguns aminoácidos.

As etapas básicas em um processo de fabricação de etanol por trituração ou moagem seca como mostrado na figura 1 podem ser descritas como segue: trituração ou moagem do milho ou outro produto de grão, sacarificação, fermentação, e destilação. Por exemplo, sementes de milho inteiras podem ser trituradas ou moídas tipicamente com moinhos de martelo ou moinhos de cilindro. O tamanho da partícula pode influenciar da hidratação do cozimento e subsequente conversão enzimática. O milho triturado ou moído pode então ser misturado com água para fazer uma massa que é cozida e resfriada. Pode ser útil incluir enzimas durante as etapas iniciais desta conversão para diminuir a viscosidade do amido gelatinizado. A mistura pode então ser transferida para um reator de sacarificação, mantida em temperaturas selecionadas tal como 40°C (104°F), onde o amido é convertido pela adição de enzimas de sacarificação a açúcares fermentáveis tal como glicose ou maltose. A massa convertida pode ser resfriada para temperaturas desejadas tal como 28,9°C (84°F), e alimentada em reatores de fermentação onde os açúcares fermentáveis são convertidos em dióxido de carbono pelo

uso de cepas selecionadas de leveduras aperfeiçoadas fornecidas de acordo com a invenção, o que resulta em resíduos de fermentação mais nutritivos em comparação com ingredientes mais tradicionais tais como leveduras de *Saccharomyces*. A cerveja resultante pode ser quebrada para separar o dióxido de carbono e o líquido resultante pode ser alimentado em um sistema de recuperação que consiste em colunas de destilação e uma coluna de arrastamento. O fluxo de etanol pode ser direcionado para uma peneira molecular onde a água restante é removida usando tecnologia de adsorção. O etanol purificado, desnaturado com uma pequena quantidade de gasolina pode produzir etanol de grau combustível. Outro produto pode ser produzido por purificação adicional do etanol destilado inicial, para remover impurezas, resultando etanol a cerca de 99,95% para usos como não-combustíveis.

Toda a vinhaça pode ser retirada do fundo da unidade de destilação e centrifugada para produzir grãos úmidos (DGW) e vinhaça diluída (líquida). O DGW pode deixar a centrífuga com 55-65% de umidade, e pode ainda ser vendido como ração para gado ou seco como resíduos de fermentação intensificados fornecidos de acordo com a invenção. Os resíduos incluem um produto final intensificado que pode ser referido aqui como grãos secos de destilador (DDG). Usando um evaporador, a vinhaça diluída (líquida) pode ser concentrada para formar solúveis de destilador, os quais podem ser adicionados de volta e combinados com um fluxo de processamento de grãos de destilador e secos. Este produto combinado de acordo com uma modalidade preferível da invenção pode ser vendido como um resíduo de fermentação aperfeiçoado ou grãos secos de destilador com solúveis (DDGS) tendo melhor conteúdo de aminoácido e micronutrientes. Deve ser compreendido que vários conceitos da invenção podem ser aplicados a outros processos de fabricação e fermentação e etanol conhecidos no campo diferentes daqueles ilustrados aqui.

Um exemplo ilustrativo de processo de produção de etanol da presente invenção é mostrado na figura 7.

A presente invenção também compreende fermentações realizadas em um processo de trituração úmida. Um processo de trituração úmi-

da envolve realizar o processamento antes da fermentação a fim de criar um material de entrada mais puro para o processo de fermentação. Por exemplo, com milho, o processo de fermentação úmida é usado para remover o gérmen, a fibra e o glúten deixando uma pasta fluida de amido que é submetida à fermentação. Uma vantagem para o processo de trituração úmida é que ele torna possível recuperar a levedura no final da fermentação e usar a levedura em fermentações subseqüentes. Além disso, o processo pode ser feito para começar rapidamente por causa de altas concentrações de levedura, e as concentrações de levedura mais elevadas pode ajudar a evitar que os organismos indesejados cresçam.

Uma modalidade da invenção é um método para fermentar substâncias separadamente, e misturar os materiais fermentados para se obter produtos de fermentação melhorados. Após tal mistura, processamento posterior, incluindo fermentação adicional pode ser realizado. Historicamente, a fermentação tem sido feita em um único estágio de fermentação, e alguns casos, fermentação por múltiplas condições seqüencialmente. A fermentação em múltiplos estágios aumenta a habilidade de se produzir diferentes produtos de fermentação sob múltiplas condições, por exemplo, anaeróbicas e aeróbicas.

Fermentação convencional é realizada apenas por etapas de fermentação seqüenciais. Por exemplo, na produção de cerveja, malte e lúpulo são fermentados juntos em um único estágio ou em múltiplas etapas. Geralmente, após a fermentação primária, alguns produtos de fermentação são removidos e o restante é submetido a processos de fermentação adicionais. Após as etapas de fermentação adicionais, a cerveja obteve as características desejadas e pode ser engarrafada. Na indústria de vinhos, a fermentação é usada para converter açúcares em álcool. Isto também é feito apenas seqüencialmente. Após a fermentação primária, alguns produtos de fermentação são removidos e o restante é submetido a processos de fermentação adicionais. Freqüentemente mais do que um substrato é fermentado. Por exemplo, a fermentação secundária é freqüentemente empregada para fermentar ácido málico para ácido láctico na fermentação malolática.

Na indústria do etanol combustível é prática comum realizar uma única fermentação para converter os carboidratos presentes em etanol. Tal processo está ilustrado na figura 8. Esta etapa converte mais do que 90% do amido disponível para os produtos, tais como etanol e dióxido de carbono.

5 Sabe-se dentro da indústria que levedura pode ser cultivada rapidamente nos tanques de “semeadura” sob circunstâncias para se atingir biomassa elevada, conteúdo elevado de esterol, e/ou o número elevado de células de levedura. Estas fermentações em “semeadura” alimentam então processos subseqüentes de fermentação de etanol. A fermentação contínua nos tan-

10 ques seqüenciais é um único processo de fermentação, e consegue os mesmos resultados de fermentação que uma única fermentação em um único tanque. A fermentação adicional foi considerada para compostos residuais do fermento adicionais.

A presente invenção envolve o processo de fermentação que é

15 fermentação em paralelo sob condições diferentes para produzir diferentes subprodutos de fermentação. Os diferentes subprodutos de fermentação podem então ser combinados para processamento adicional, tal como extração, destilação, fermentação adicional, remoção de água ou secagem.

Uma modalidade da invenção é um processo de fermentação em

20 que pelo menos duas fermentações diferentes são conduzidas separadamente e combinadas para gerar a melhoria no processo geral de fermentação. As fermentações podem ser sincronizadas ou assíncronas. Práticas de fermentação podem requerer que as fermentações não sejam de duração idêntica. Uma ou mais das fermentações pode ser uma fermentação contí-

25 nua. As fermentações paralelas são conduzidas diferentemente, no processo, ou na composição. Estas diferenças podem incluir um ou mais do seguinte; aeróbica, anaeróbica, crescimento elevado, crescimento baixo, biomassa elevada, biomassa baixa, expressão gênica desreprimida, expressão gênica reprimida, eucariótico, procariótico, metabolismo baixo, metabolismo

30 elevado. Os meios nas fermentações paralelas podem também ser diferentes, por exemplo, incluindo por variar mais das seguintes propriedades: concentração, composição, pH, micronutrientes, viscosidade, processos de fer-

mentação, taxas de inoculação, temperatura, agitação, fluxo, suspensão, pressão, ou tempos de fermentação diferentes. Uma modalidade da invenção é usar as diferentes condições para obter fermentação assíncrona, com as diferentes fermentações paralelas tendo uma ou mais das seguintes características: mais rápida/mais lenta, contínua vs. não-contínua, contínua vs. batelada, batelada vs. batelada, uso de pequenas instalações de fermentação para fermentações de crescimento rápido, uso de grandes instalações de fermentação para fermentações de crescimento lentas.

A fermentação em paralelo da presente invenção permite a produção de produtos que podem ser difíceis ou caros demais para produzir em um único estágio, ou fermentação contínua. Por exemplo, a levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) cresce mais rapidamente na presença de oxigênio do que em sua ausência. Assim, se um produto contendo uma proporção elevada de levedura for desejado, pode ser vantajoso conduzir fermentações paralelas, em que uma das fermentações foi conduzida aerobicamente para gerar um rendimento elevado de biomassa de levedura, enquanto uma fermentação paralela foi conduzida anaerobicamente para gerar uma concentração elevada de um produto anaeróbico, por exemplo, etanol. Isto é ilustrado esquematicamente na figura 9. Este processo permite o resultado desejado, resíduo de fermentação contendo alto conteúdo de levedura, e a produção simultânea de etanol.

As fermentações paralelas da presente invenção também permitem a combinação dos dois fluxos de fermentação antes de processamento adicional para gerar produtos. A figura 10 mostra este processo generalizado. O processo 1 pode ser uma terceira etapa da fermentação para remover os compostos residuais não-fermentáveis por *Saccharomyces cerevisiae*. A figura 11 ilustra um processo da presente invenção que permite o pré-processamento das matérias-primas em diferentes fluxos. Este processo pode permitir a fermentação da fibra do milho a partir da semente do milho através da conversão direta da celulose ou da fermentação por um microorganismo fermentador de celulose, tal como *Hypocrea jecorina*.

Uma modalidade preferida é utilizar enzimas celulase para con-

verter a celulose à glicose. A glicose pode então ser fermentada através de leveduras comuns. Pode ser desejável executar esta fermentação sob condições diferentes para permitir a conversão rápida da celulose em glicose. O amido poderia ser fermentado na fermentação 2 para etanol e nos resultados combinados para processamento adicional.

Outra modalidade preferida da invenção é mostrada na figura 12, que ilustra um fluxo de fracionamento mais completo. O fracionamento intensificado é seguido de processamento intensificado. Como nas outras modalidades, a fermentação 1 pode ser aeróbica, e a fermentação 2 pode ser anaeróbica. O processo 1 pode ser a concentração dos caldos da fermentação para produzir etanol, o processo dois pode incluir secagem, evaporação, e a conversão de ácidos graxos em biodiesel.

Outra modalidade da invenção é mostrada na figura 13 para três fermentações paralelas. Uma modalidade preferida, a primeira fermentação é fermentação aeróbica do amido, a segunda fermentação, a fermentação anaeróbica do amido e a terceira fermentação a conversão da celulose para etanol, ou pode ser a conversão dos óleos no biodiesel.

Uma vantagem adicional para o método paralelo de fermentação é a habilidade de conduzir fermentações de forma não-sincronizada. Por desacoplar os processos de fermentação, cada fermentação pode ser conduzida sob condições ótimas. Em particular, fermentações que são rápidas podem ser conduzidas em instalações separadas projetadas para crescimento rápido. Estas instalações incluem tanques menores, melhor regulação de temperatura (refrigeração), dosagem de nutriente intensificada, e fluxo de fluido intensificado para crescimento melhorado, alimentação, e troca de metabólitos.

O processo de fermentação paralela da presente invenção pode ser usado melhorar produtos, por exemplo, ter instalações de fermentação separadas para realizar fermentações de condições diferentes tem grande utilidade na produção moderna do biocombustível. Separar os processos de fermentação permite fermentações com diferentes níveis de oxigênio, composição de nutrientes diferente, níveis de expressão gênica diferentes, pH

diferente, meios diferentes, temperatura diferente, modos de crescimento diferentes, para produção de subprodutos diferentes, para taxas de crescimento e níveis diferente, e para organismos diferentes.

5 Em outra modalidade da invenção, uma fermentação anaeróbica com levedura em amido de milho, ou farelo de milho, é realizada para produzir um subproduto metabólico sob condições que limitaram o crescimento de biomassa, permitindo que as células dobrem ou quadrupliquem em 46 a 48 horas. Uma fermentação separada, executada em paralelo estaria sob condições diferentes. Por exemplo, uma cepa diferente de levedura poderia ser cultivada aerobicamente sobre um substrato com nutrientes adicionais para suportar o crescimento aeróbico para rendimento elevado de biomassa (biomassa de 10%). A segunda fermentação poderia beneficiar-se da aeração intensificada, suspensão intensificada, pH diferente, antibióticos adicionais para suprimir as bactérias aeróbicas, e de refrigerar intensificada. Esta 10 fermentação pode levar 72 horas para terminar por causa das características diferentes de crescimento, do limite mais elevado de crescimento da biomassa, e de uma redução na inibição do crescimento dos subprodutos metabólicos, tal como o etanol. Separar as fermentações em processos separados permite a produção intensificada e valor intensificado aos produtos da 15 fermentação.

#### Ração Animal

25 Outro aspecto da presente invenção é dirigido para rações animais completas com uma concentração intensificada de nutrientes que incluem microorganismos modificados caracterizados por uma concentração intensificada de nutrientes tais como, mas não limitados a, gorduras, ácidos graxos, lipídios tal como o fosfolipídio, vitaminas, aminoácidos essenciais, peptídeos, proteínas, carboidratos, esteróis, enzima, e minerais-traço tais como, ferro, cobre, zinco, manganês, cobalto, iodo, selênio, molibdênio, níquel, flúor, vanádio, estanho e silicone.

### Resíduos da fermentação

Em um processo de fermentação da presente invenção, uma fonte de carbono pode ser hidrolisada aos seus açúcares componentes por microorganismos modificados para produzir álcool e outros produtos gaso-  
5 sos. O produto gasoso inclui dióxido de carbono e o álcool inclui etanol. Os resíduos de fermentação obtidos após a reação de fermentação são tipicamente de um valor comercial mais elevado. Em um aspecto, os resíduos da fermentação contêm os microorganismos modificados que têm conteúdo de nutrientes maior do que aqueles resíduos deficientes nos microorganismos  
10 modificados. Os microorganismos modificados podem estar presentes em um sistema de fermentação, no caldo da fermentação e/ou na biomassa da fermentação. O caldo e/ou a biomassa da fermentação podem ser secos (por exemplo, secos por atomização), para produzir os resíduos de fermentação com um conteúdo aumentado dos conteúdos nutritivos.

15 Por exemplo, os sólidos exauridos secos recuperados depois do processo da fermentação são aumentados de acordo com a invenção para fornecer DDG ou DDGS melhorado (geralmente referido como grão seco de destilador com solúveis). Estes resíduos de fermentação são geralmente não-tóxicos, biodegradáveis, facilmente disponíveis, baratos, e ricos em nu-  
20 trientes. A escolha do microorganismo e das condições de fermentação é importante para produzir uma toxicidade baixa ou resíduos de fermentação não-tóxicos para o uso como uma ração ou um suplemento nutritivo. Embora a glicose seja principal açúcar produzido a partir da hidrólise do amido dos grãos, ela não é o único açúcar produzido geralmente em carboidratos. Ao  
25 contrário do DDG produzido a partir do processo tradicional de produção de etanol com moagem seca, que contém uma quantidade grande de carboidratos não-amido (por exemplo, tanto quanto 35% de celulose e arabinosilanos medidos como fibra detergente neutra, em peso seco), os resíduos de fer-  
30 mentação enriquecidos com nutriente em questão produzidos pela hidrólise enzimática dos carboidratos não-amido são mais saborosos e digestíveis para o não-ruminante.

A composição dos resíduos de fermentação enriquecidos com

nutriente da presente invenção pode ser diferente daquela de DDG e de outros subprodutos de destilador produzidos a partir do processo tradicional de produção de etanol com moagem seca, os quais são obtidos através da fermentação do amido atual no milho triturado sem os microorganismos modificados em questão. O resíduo de fermentação enriquecido com nutrientes desta invenção pode ter um conteúdo de nutriente de pelo menos cerca de 1% a cerca de 95% em peso. O conteúdo de nutriente está preferivelmente na faixa de pelo menos de cerca de 10% a 20%, 20% a 30%, 30% a 40%, 40% a 50%, 50% a 60%, 60% a 70%, e 70% a 80% em peso. O conteúdo de nutriente disponível pode depender do animal ao qual é alimentado e do contexto do restante da dieta, e do estágio no ciclo de vida do animal. Por exemplo, o gado de corte requer menos histidina do que vacas leiteiras. A seleção do conteúdo de nutriente adequado para alimentar animais é bem conhecida daqueles versados na técnica.

Os resíduos de fermentação podem ser preparados como um produto de biomassa seco por atomização. Opcionalmente, a biomassa pode ser separada por métodos conhecidos, tais como centrifugação, filtração, separação, decantação, uma combinação de separação e decantação, ultrafiltração ou microfiltração. Os resíduos da fermentação da biomassa podem ainda ser tratados adicionalmente para facilitar a passagem pelo rúmen. Em uma modalidade, o produto da biomassa pode ser separado do meio da fermentação, seco por atomização, e opcionalmente tratado para modular a passagem pelo rúmen, e adicionado à ração como uma fonte nutritiva. Além de produzir resíduos de fermentação enriquecidos nutricionalmente em um sistema de fermentação que contém microorganismos modificados, os resíduos de fermentação enriquecidos nutricionalmente também podem ser produzidos em sistemas de plantas transgênicas. Métodos para produzir sistemas de plantas transgênicas são conhecidos na técnica. Alternativamente, onde o hospedeiro do microorganismo modificado excreta os conteúdos nutritivos, o caldo enriquecido nutricionalmente pode ser separado da biomassa produzida pela fermentação e o caldo clarificado pode ser usado como um ingrediente da ração animal, por exemplo, na forma líquida ou na forma seca por atomização.

Os resíduos da fermentação obtidos após a reação de fermentação usando microorganismos modificados podem ser usados como uma ração animal ou como suplemento alimentar para seres humanos. Os resíduos da fermentação incluem pelo menos um ingrediente que tem um conteúdo nutritivo aumentado o qual é derivado de uma fonte não-animal (por exemplo, uma bactéria, levedura, e/ou planta). Em particular, os resíduos da fermentação são ricos em pelo menos uma ou mais dentre gorduras, ácidos graxos, lipídios tal como fosfolipídio, vitaminas, aminoácidos essenciais, peptídeos, proteínas, carboidratos, esteróis, enzimas, e minerais-traço tais como, ferro, cobre, zinco, manganês, cobalto, iodo, selênio, molibdênio, níquel, flúor, vanádio, estanho e silício. Preferivelmente, os peptídeos contêm pelo menos um aminoácido essencial. Preferivelmente, os aminoácidos essenciais são encapsulados dentro de um microorganismo modificado em questão usado em uma reação de fermentação. Mais preferivelmente, os aminoácidos essenciais são contidos nos polipeptídeos heterólogos expressos pelo microorganismo. Onde desejado, os polipeptídeos heterólogos são expressos e armazenados nos corpos de inclusão em um microorganismo fermentativo adequado (por exemplo, levedura).

B. Composições de ração animal

Em um aspecto, os resíduos de fermentação modificados em questão têm um conteúdo nutritivo elevado. Em consequência, uma porcentagem mais elevada dos resíduos de fermentação pode ser usada em uma ração animal completa. Em algumas modalidades, a composição da ração compreende pelo menos cerca de 15% de resíduos de fermentação em peso. Em uma ração completa, ou dieta, este material será alimentado com outros materiais. Dependendo em cima do conteúdo nutritivo dos outros materiais, e/ou das exigências nutricionais do animal ao qual a ração é fornecida, os resíduos de fermentação modificados podem variar de 15% da ração a 100% da ração. Em algumas modalidades, os resíduos de fermentação em questão podem fornecer menor porcentagem de mistura devido ao alto conteúdo de nutrientes. Em outras modalidades, os resíduos de fermentação em questão podem fornecer uma fração muito alta da ração, por exemplo mais de

75%. Em modalidades adequadas, a composição de ração compreende pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, ou pelo menos cerca de 75% do resíduo de fermentação em questão. Geralmente, a composição de ração compreende pelo menos cerca de 20% de resíduos da fermentação pelo peso. Mais geralmente, a composição de ração compreende pelo menos cerca de 15 a 25%, 25 a 20%, 20 a 25%, 30% a 40%, 40% a 50%, 50% a 60%, ou 60% a 70% em peso de resíduos de fermentação. Onde desejado, os resíduos de fermentação em questão podem ser usados como uma única fonte da ração, particularmente para aves domésticas (por exemplo, galinha, patos e gansos) e porcos. Um nutriente pode também ser adicionado à ração contendo os resíduos de fermentação.

A ração animal completa pode ter conteúdo de aminoácido aumentado no que diz respeito a um ou mais aminoácidos essenciais para uma variedade de finalidades, por exemplo, para a produção de leite, para o aumento do peso e para melhoria geral da saúde de animais. A ração animal completa pode ter um conteúdo de aminoácido aumentado por causa da presença de aminoácidos livres e/ou da presença de proteínas ou peptídeos que incluem um aminoácido essencial, nos resíduos da fermentação. Os aminoácidos essenciais podem incluir histidina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, isoleucina, e/ou triptofano, os quais podem estar presentes na ração animal completa como um aminoácido livre ou como parte de uma proteína ou de um peptídeo que é rico no aminoácido selecionado. Pelo menos um peptídeo ou uma proteína rica em aminoácido essencial pode ter pelo menos 1% de resíduos de aminoácido essencial do total dos resíduos de aminoácido no peptídeo ou na proteína, pelo menos 5% de resíduos de aminoácido essencial do total de resíduos de aminoácido no peptídeo ou proteína, ou pelo menos 10% de resíduos de aminoácido essencial do total de resíduos de aminoácido na proteína. Por dar uma dieta balanceada em nutrientes aos animais, é feito uso máximo do conteúdo nutritivo, requerendo menos ração para conseguir taxas de crescimento comparáveis, produção de leite, ou uma redução nos

nutrientes presentes nos excretas reduzindo a biocarga dos dejetos.

Uma ração animal completa com um conteúdo aumentado de um aminoácido essencial pode ter um conteúdo de aminoácido essencial (incluindo aminoácido essencial livre e aminoácido essencial presente em uma proteína ou peptídeo) de pelo menos de 2,0% em peso em relação ao peso da proteína bruta e do conteúdo de aminoácido total, e mais adequadamente pelo menos 5,0% em peso em relação ao peso da proteína bruta e do conteúdo total de aminoácido. A composição de ração animal completa inclui outros nutrientes derivados de microorganismos modificados incluindo, mas não limitados a, gorduras, ácidos graxos, lipídios tal como fosfolipídio, vitaminas, carboidratos, esteróis, enzimas, e minerais-traço.

A composição de ração animal completa pode incluir a composição na forma de ração completa, composição na forma concentrada, composição na forma misturada, e composição na forma de base. Se a composição estiver na forma de uma ração completa, o nível percentual de nutrientes, onde os nutrientes são obtidos do microorganismo modificado em um resíduo de fermentação, pode ser cerca de 10 a cerca de 25 por cento, mais adequadamente cerca de 14 a cerca de 24 por cento; enquanto que, se a composição estiver na forma de um concentrado, o nível nutrientes pode ser de cerca de 30 a cerca de 50 por cento, mais adequadamente cerca de 32 a cerca de 48 por cento. Se a composição estiver na forma de uma mistura, o nível de nutrientes na composição pode ser de cerca de 20 a cerca de 30 por cento, mais adequadamente cerca de 24 a cerca de 26 por cento; e se a composição estiver na forma de uma mistura de base, o nível de nutrientes na composição pode ser de cerca de 55 a cerca de 65 por cento. A menos que indicado de outra maneira aqui, as porcentagens são indicadas em uma base de porcentagem do peso. Se o DDGS for elevado em um único nutriente, por exemplo Lys, ele será usado como um suplemento em uma taxa baixa; se for balanceado nos aminoácidos e nas vitaminas, por exemplo, vitamina A e E, ele será uma ração mais completa e será alimentado em uma taxa mais elevada e suplementado com um estoque de reação com poucos nutrientes e pouca proteína, como forragem de milho.

A composição de ração pode incluir um peptídeo ou uma fração de proteína bruta presente em um resíduo da fermentação que têm um conteúdo do aminoácido essencial de pelo menos cerca de 2%. Em modalidades adequadas, uma fração do peptídeo ou da proteína bruta pode ter um conteúdo de aminoácido essencial de pelo menos cerca de 3%, pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, e em modalidades adequadas, pelo menos cerca de 50%. Em algumas modalidades, o peptídeo pode ser formado de 100% de aminoácidos essenciais.

5 Geralmente, a composição de ração pode incluir uma fração de peptídeo ou proteína bruta presente em um resíduo de fermentação tendo um conteúdo de aminoácido essencial de até cerca de 10%. Mais geralmente, a composição de ração pode incluir uma fração de peptídeo ou de proteína bruta presente em um resíduo de fermentação tendo um conteúdo do aminoácido essencial

10 de cerca de 2 a 10%, 3,0 a 8,0%, ou 4,0 a 6,0%.

A composição de ração pode incluir uma fração de peptídeo ou proteína bruta presente em um resíduo de fermentação tendo um conteúdo de lisina de pelo menos cerca de 2%. Em modalidades adequadas, a fração de peptídeo ou proteína bruta pode ter um conteúdo de lisina de pelo menos

20 cerca de 3%, pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, e em modalidades apropriadas, pelo menos cerca de 50%. Tipicamente, a composição de ração pode incluir a fração de peptídeo ou proteína bruta tendo um conteúdo de lisina de até cerca de

25 10%. Onde desejado, a composição de ração pode incluir uma fração de peptídeo ou proteína bruta que tendo um conteúdo de lisina de cerca de 2 a 10%, de 3,0 a 8,0%, ou de 4,0 a 6,0%.

A composição de ração pode incluir nutrientes no resíduo de fermentação de cerca de 1g/kg de sólidos secos a 900g/kg de sólidos secos. Em

30 algumas modalidades, os nutrientes em uma composição de ração podem estar presentes em pelo menos cerca de 2g/kg de sólidos secos, 5g/kg de sólidos secos, 10g/kg de sólidos secos, 50g/kg de sólidos secos, 100g/kg de

sólidos secos, 200g/kg de sólidos secos, e cerca de 300 g/kg sólidos secos. Em modalidades adequadas, os nutrientes podem estar presentes em pelo menos cerca de 400g/kg de sólidos secos, pelo menos cerca de 500g/kg de sólidos secos, pelo menos cerca de 600g/kg de sólidos secos, pelo menos  
5 cerca de 700g/kg de sólidos secos, pelo menos cerca de 800g/kg de sólidos secos e/ou pelo menos cerca de 900g/kg de sólidos secos.

A composição de ração pode incluir um aminoácido essencial ou um peptídeo que contém pelo menos um aminoácido essencial presente em um resíduo de fermentação que têm um conteúdo de cerca de 1g/kg de sólidos secos a 900g/kg de sólidos secos. Em algumas modalidades, o aminoácido essencial ou um peptídeo que contém pelo menos um aminoácido essencial em uma composição de ração pode estar presente em pelo menos  
10 cerca de 2g/kg de sólidos secos, 5g/kg de sólidos secos, 10g/kg de sólidos secos, 50g/kg de sólidos secos, 100g/kg de sólidos secos, 200g/kg de sólidos secos, e cerca de 300 g/kg de sólidos secos. Em modalidades adequadas, o aminoácido essencial ou um peptídeo que contém pelo menos um aminoácido essencial pode estar presente em pelo menos cerca de 400g/kg de sólidos secos, pelo menos cerca de 500g/kg de sólidos secos, pelo menos cerca de 600g/kg de sólidos secos, pelo menos cerca de 700g/kg de  
15 sólidos secos, pelo menos cerca de 800g/kg de sólidos secos e/ou pelo menos cerca de 900g/kg de sólidos secos.

A composição de ração pode incluir uma fonte de aminoácido com proteção contra o rúmen de origem não-animal que pode incluir a lisina com proteção contra o rúmen ou outros aminoácidos essenciais e/ou uma proteína  
25 ou peptídeo rico em aminoácido com proteção contra o rúmen, mais preferivelmente uma proteína ou um peptídeo do rico do aminoácido essencial. O aminoácido essencial livre ou a proteína ou o peptídeo rico em aminoácido essencial podem ser protegidos do rúmen por reagir com pelo menos o um carboidrato redutor (por exemplo, um açúcar redutor) ou com pelo menos um  
30 ácido graxo. Carboidratos redutores adequados podem incluir xilose, lactose, e/ou glicose. Ácidos graxos adequados podem incluir óleos vegetais pelo menos parcialmente hidrogenados, tal como óleo de soja. A fonte de aminoácido

com proteção contra o rúmen pode ser capaz de liberar pelo menos cerca de 40% de aminoácido com proteção contra o rúmen pós-ruminalmente. Mais geralmente, a fonte de aminoácido com proteção contra o rúmen pode ser capaz de liberar pelo menos cerca de 50%, 60%, 70%, 80%, ou 90% de aminoácido com proteção contra o rúmen pós-ruminalmente.

A composição de ração animal completa pode conter resíduos de fermentação enriquecidos com nutrientes na forma de uma biomassa formada durante a fermentação e pelo menos um componente nutriente adicional. Em outro exemplo, a composição de ração contém um resíduo de fermentação enriquecido com nutrientes que é dissolvido e suspenso a partir de um caldo de fermentação formado durante a fermentação e pelo menos um componente nutriente adicional. Em uma modalidade adicional, a composição de ração tem uma fração de proteína bruta que inclui pelo menos uma proteína rica em aminoácido essencial. A composição de ração pode ser formulada para liberar um balanço melhorado de aminoácidos essenciais pós-ruminalmente.

A composição na forma de ração completa pode conter um ou mais ingrediente tais como intermediários de trigo ("mids de trigo"), milho, farelo de soja, farelo de glúten de milho, grãos de destilador ou grãos de destilador com solúveis, sal, macrominerais, minerais-traço e vitaminas. Outros ingredientes potenciais podem geralmente incluir, mas não estar limitados a farelo de girassol, brotos de malte e cascas de soja. A composição na forma da mistura pode conter intermediários de trigo, farelo de glúten de milho, grãos de destilador ou grãos de destilador com solúveis, sal, macrominerais, minerais-traço e vitaminas. Ingredientes alternativos incluiriam geralmente, mas não seriam limitados a, milho, farelo de soja, farelo de girassol, farelo de semente de algodão, broto de malte e cascas de soja. A composição na forma de base pode conter intermediários de trigo, farelo de glúten de milho, e grãos de destilador ou grãos de destilador com solúveis. Os ingredientes alternativos incluiriam geralmente, mas não são limitados a, farelo de soja, farelo de girassol, broto de malte, macrominerais, minerais-traço e vitaminas (Messman et al. Publicação U.S. Nº 2006/0039955, que está incorporada aqui em sua totalidade).

Ácidos graxos altamente insaturados (HUFAs) em microorganismos modificados, quando expostos a condições oxidantes podem ser convertidos em ácidos graxos insaturados menos desejáveis ou em ácidos graxos saturados. Entretanto, a saturação de HUFAs de ômega-3 pode ser reduzida ou impedida pela introdução de antioxidantes sintéticos ou de antioxidantes naturais, tais como o beta-caroteno, a vitamina E e a vitamina C, na ração. Os antioxidantes sintéticos, tais como BHT, BHA, TBHQ ou etoxiquina, ou antioxidantes naturais tais como tocoferóis, podem ser incorporados nos produtos de alimento ou ração por adicioná-los aos produtos, ou eles podem ser incorporados pela produção *in situ* em um organismo adequadamente modificado. A quantidade de antioxidantes incorporados desta maneira depende, por exemplo, das exigências subseqüentes do uso, tais como da formulação do produto, dos métodos de empacotamento, e da vida útil desejada.

Resíduo de fermentação ou ração completa contendo o resíduo de fermentação da presente invenção, também pode ser utilizado como um suplemento nutricional para o consumo humano se o processo começar com os materiais de entrada de grau humano, e padrões de qualidade para alimentos humanos sejam observados durante todo o processo. O resíduo de fermentação ou ração completa descrita na invenção tem alto conteúdo nutricional. Os nutrientes, tal como proteína e fibra, estão associados com dietas saudáveis. Podem ser desenvolvidas receitas para utilizar resíduos de fermentação ou a ração completa da invenção em alimentos tais como cereal, bolachas, tortas, biscoitos, bolos, massa de pizza, molho de verão, almôndegas, vitaminas e qualquer forma de alimento comestível. Outra escolha pode ser desenvolver os resíduos de fermentação ou a ração completa da invenção em petiscos ou uma barra, similares a uma barra de granola que poderia ser facilmente comida, conveniente para distribuição. Uma barra pode incluir proteína, fibra, gérmen, vitaminas, minerais, do grão, dos nutracêuticos tais como glicosamina, HUFAs, ou co-fatores, tais como vitamina Q-10. O resíduo de fermentação nutricional da invenção também pode ser incorporado em programas domésticos de alimentação tais como merenda escolar e veículos para venda de alimentos.

A ração animal ou suplemento alimentar para seres humanos que compreende os resíduos de fermentação em questão pode ser suplementado adicionalmente com sabores desejáveis. A escolha de um sabor particular depende do animal ao qual a ração é proporcionada. Os sabores e aromas, tanto naturais como artificiais, podem ser usados ao fazer rações mais aceitáveis e saborosas. Essas suplementações podem se misturar bem com todos os ingredientes e podem estar disponíveis como uma forma de produto líquido ou seco. Sabores e aromas adequados a ser suplementados nas rações animais incluem, mas não são limitados ao feno-grego, banana, cereja, alecrim, cominho, cenoura, orégano, hortelã, baunilha, anis, rum, bordo, caramelo, óleos cítricos, butirato de etila, anetol, maçã, canela, e qualquer combinação natural ou artificial disso. Em geral, sabores que incluem feno-grego, banana, e cereja são altamente desejáveis para cavalos, bordo, baunilha e anis para vacas, e rum, baga e coco para porcos. Os sabores e os aromas podem ser trocados entre animais diferentes. Similarmen- te, uma variedade de sabores da fruta, artificiais ou naturais, pode ser adicionada aos suplementos alimentares que compreendem os resíduos de fermentação em questão para o consumo humano.

C. Vida útil

A vida útil dos resíduos de fermentação ou da ração completa da presente invenção pode tipicamente ser mais longa do que a vida útil de um resíduo de fermentação que é deficiente no microorganismo modificado. A vida útil pode depender de fatores tais como, o conteúdo de umidade do produto, quanto ar pode correr através da massa da ração, das condições ambientais e do uso dos conservantes. Um conservante pode ser adicionado à ração completa para aumentar a vida útil para semanas e meses. Outros métodos para aumentar a vida útil incluem controle similar ao controle da silagem tal como misturar com outras rações e embalar, cobrir com plástico ou ensacar. Condições frescas, conservantes e retirar o ar da massa da ração estendem a vida útil de subprodutos úmidos. A ração completa pode ser armazenada em caixas ou sacos de silo. Secar os resíduos de fermentação úmidos ou ração completa também pode aumentar a vida útil do produto e

melhorar a consistência e a qualidade.

A ração completa da presente invenção pode ser armazenada por longos períodos de tempo. A vida útil pode ser estendida por ensilar, adicionar conservantes tais como ácidos orgânicos, ou misturar com outras alimenta-  
 5 ções tais como casca de soja. Caixas de produto ou galpões de armazenamento em massa podem ser usados para armazenar as rações completas.

### III. MICROORGANISMOS MODIFICADOS

Microorganismos adequados que podem ser usados na reação de fermentação da presente invenção incluem células procarióticas e eucari-  
 10 óticas. Microorganismos preferidos produzem uma toxicidade baixa ou uns resíduos de fermentação não-tóxicos para uso como uma ração ou suplemento nutricional. Sistemas biológicos preferidos incluem sistemas fúngicos, bacterianos, e de microalgas. Sistemas biológicos mais preferidos são culturas de células fúngicas, mais preferivelmente uma cultura de célula de levedura, e o mais preferivelmente uma cultura de célula de *Saccharomyces ce-*  
 15 *revisiae*. Os fungos podem ser manipulados por técnicas microbiológicas clássicas e de manipulação genética. O procarioto preferido é *E. coli*. A microalga preferida para o uso na presente invenção inclui *Chlorella* e *Proto-*  
 20 *theca*. Alguns dos exemplos de levedura que podem ser modificados para o processo de fermentação aqui descrito incluem, apenas como forma de exemplo, leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces lactis*, *K. marxianus*, ou *K. fragilis* e *Brettanomyces* sp. etc. Alguns dos exemplos das bactérias que podem ser  
 25 modificadas para o processo da fermentação descrito aqui incluem, apenas como forma de exemplo, *Zymomonas* sp., *E. coli*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus* ssp. etc. A fermentação pode ser uma fermentação homocética usando um acetógeno tal como um microorganismo do gênero *Clostridium*, por exemplo, microorganismos da espécie *Clostridium thermoaceticum* ou *Clostridium formicoaceticum*. A fermentação pode ser fermenta-  
 30 ção de ácido láctico usando um microorganismo do gênero *Lactobacillus*. Alternativamente, a fonte do carboidrato pode ser convertida em ácido láctico, lactato, ácido acético, acetato, ou misturas disso em uma fermentação inicial

usando uma bifido bactéria.

O microorganismo é modificado de tal maneira que o microorganismo modificado tem conteúdo nutricional aumentado. O microorganismo modificado pode ser enriquecido em nutrientes como, apenas como forma de exemplo, gorduras, ácidos graxos, lipídios tais como fosfolipídio, vitaminas, aminoácidos essenciais, peptídeos, proteínas, carboidratos, esteróis, enzimas, e minerais-traço tais como, ferro, cobre, zinco, manganês, cobalto, iodo, selênio, molibdênio, níquel, flúor, vanádio, estanho e silicone. Os ácidos graxos incluem ácidos graxos saturados e insaturados onde os ácidos graxos insaturados incluem ácido graxo altamente insaturado ômega-3. Os exemplos de ácido graxo altamente insaturado ômega-3 incluem, mas não são limitados a, ácido eicosapentaenóico, ácido docosapentaenóico, ácido alfa linolênico, ácido docosaexaenóico, e conjugados dos mesmos.

Alternativamente, algas ou fungos, por exemplo, *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* etc. podem fermentar grãos hidrolisados ou não-hidrolisados triturado para produzir HUFAs de ômega-3. Isso pode ser usado para qualquer tipo de grão, incluindo sem limitação, milho, milo, sorgo, arroz, trigo, aveia, centeio e painço. Este processo adicional inclui o uso alternativo de xarope de milho não-hidrolisado ou de produtos agrícolas/de fermentação tal como a vinhaça, um produto residual em milho para fermentações alcoólicas, como uma fonte barata. Grãos e os produtos residuais podem ser hidrolisados por qualquer método conhecido na técnica, tal como hidrólise ácida ou hidrólise enzimática (Barclay, William R. Patente U.S. Nº 5.656.319, incorporada aqui por referência em sua totalidade) com um ou mais tipos e/ou cepas de microorganismos para fermentação paralela ou seqüencial. Sem limitação, um exemplo é fermentação com a levedura que secreta a alfa amilase para hidrolisar amido, seguido por uma levedura para fermentar a glicose em etanol.

Outros exemplos de microorganismos incluem, mas não são limitados a, fungos *Blakeslea trispora*, *Dunaliella salina*, *Phaffia rhodozyma*, *Hematococcus pluvialis*, gênero *Flavobacterium*, *Agrobacterium aurantiacum*, *Erwinia herbicola* ou *Erwinia uredovora*, gênero *Paracoccus*, *Agrobacterium*,

e *Alcaligenes* etc. Vários microorganismos que produzem produtos úteis são descritos na

TABELA A:

<u>Acético</u> <i>C. formicoaceticum</i> <i>C. thermoaceticum</i> <i>A. woodii</i>	<u>Butírico</u> <i>C. butyricum</i> <i>C. thermosaccharolyticum</i> <i>S. maxima</i> <i>B. methylotrophicum</i>
<u>Láctico</u> <i>L. amylophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. brevis</i> <i>T. Brockii</i>	<u>Propiônico</u> <i>C. propionicum</i> <i>P. arabinosum</i>
<u>Butírico</u> <i>C. butyricum</i> <i>C. thermosaccharolyticum</i> <i>S. maxima</i> <i>B. methylotrophicum</i>	<u>Succínico</u> <i>R. flavofaciens</i> <i>B. succinogenes</i>
<u>Propiônico</u> <i>C. Propionicum</i>	<u>Capróico</u> <i>C. kluyveri</i>
<u>Lático</u> <i>L. amylophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. brevis</i> <i>T. Brockii</i>	<u>Etanol</u> <i>Clostridium thermocellum str. LQRI</i> <i>Clostridium thermohydrosulfuricum str. 39E</i> <i>Thermoanaerobium Brockii str. HTD4</i> <i>Sarcina ventriculi</i> <i>Ruminococcus albus</i>
<u>Butanol, Acetona-Isopropanol</u> <i>Clostridium acetobutylicum</i> <i>Clostridium butylicum</i> <i>Ruminococcus albus</i>	<u>Butanol, Acetona-Isopropanol</u> <i>Clostridium acetobutylicum</i> <i>Clostridium butylicum</i>

Onde desejado, cepas de bactérias ou levedura podem ser selecionadas para produção de sabores agradáveis. Por exemplo, os microorga-

nismos em questão podem ser modificados de tal maneira que uma ou mais intensificadores de sabor sejam produzidos pelos microorganismos. Intensificadores de sabor podem ser derivados de RNA de levedura. Leveduras como a *Candida* podem ser cultivadas com tanto quanto 15% de RNA. Leveduras *Saccharomyces* podem ser usadas fazer compostos ativos de sabor. Nucleosídeos como, inosina-5'-morfosfato e guanosina-5'-monofosfato os quais em combinação com glutamato monossódico, podem ser usados para a melhoria do sabor.

Em algumas modalidades, os microorganismos que foram modificados para aumentar a produção de álcool ou alceno em uma reação de fermentação podem ser modificados adicionalmente de acordo com os métodos em questão para gerar os microorganismos em questão que têm um conteúdo nutritivo intensificado.

Em algumas modalidades da presente invenção, os microorganismos em questão podem ser modificados de tal maneira que um ou mais pigmentos ou corantes sejam produzidos pelo microorganismo. Algumas leveduras, por exemplo, *Phaffia rhodozyma*, produzem um pigmento cor-de-rosa chamado de astaxantina. A astaxantina é a cor natural encontrada nas lagostas, camarão, salmão e nos flamingos. A levedura inteira ou a ração animal completa da presente invenção podem ser alimentados a peixes ou crustáceos criados em cativeiro, onde raramente ganham a cor natural, fornecendo desse modo a cor característica da carne aos salmões ou aos frutos do mar para melhorar a comercialização. Ao mesmo tempo, outros nutrientes fornecidos pela levedura também são de benefício para os peixes.

#### 25 A. Modificação de microorganismo

Em algumas modalidades, o microorganismo modificado útil para uma reação de fermentação compreende um microorganismo quimicamente modificado ou geneticamente modificado. Preferivelmente as células usadas na cultura celular são modificadas geneticamente por técnicas de manipulação genética (isto é, tecnologia recombinante), técnicas microbiológicas clássicas, ou por uma combinação de tais técnicas e também podem incluir variantes genéticas naturais. Algumas de tais técnicas são descritas geral-

mente, por exemplo, em Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Labs Press. A referência Sambrook et al., *ibid*, está incorporada aqui por referência em sua totalidade.

5 Esta invenção contempla várias maneiras nas quais modificações genéticas podem ser usadas para criar um microorganismo que produza uma quantidade maior de um nutriente em um processo de fermentação do que o mesmo microorganismo antes da modificação. Todos estes métodos são bem conhecidos no campo de genética e engenharia genética.

10 Em uma abordagem, os microorganismos que demonstram produção aumentada de um nutriente são produzidos usando mutagênese tradicional e seleção de microorganismos que exibem as propriedades desejadas. Por exemplo, Gasnet-Ramireza descreveu o uso de mutagênese química tradicional para mutagenizar levedura, seguida pela seleção das células de levedura que mostram produção aumentada de lisina. Stepanova et al.  
15 (“Lysine Overproduction Mutations in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Are Introduced into Industrial Yeast Strains,” *Russian J. Genetics*, (2001) 37:460-463) mutagenizaram células de levedura para aumentar a produção de lisina. As mudanças foram direcionadas a um gene que aumentou a resistência a um análogo tóxico de lisina e a um gene envolvido no regulamento da produção de lisina.  
20

Em outra abordagem, os microorganismos são modificados geneticamente usando as ferramentas de genética recombinante. Os genomas completos de vários microorganismos úteis nos métodos desta invenção foram seqüenciados, incluindo *E. coli*, *Saccharomyces* e *Clostridium acetobutylicum*. O genoma de *C. acetobutílico*, por exemplo, pode ser encontrado em:  
25

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=genome&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list\\_uids=14097&window=9525&begin=0](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=genome&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=14097&window=9525&begin=0). Genética de *E. coli* e de levedura, em particular, é bem compreendida. O genoma de *S. cerevisiae* tem um site da internet devotado a ele:  
30 [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org). Vias bioquímicas em levedura estão bem caracterizadas. As enzimas de dúzias de vias e os genes que codificam estas enzi-

mas estão disponíveis na internet:

[http://pathway.yeastgenome.org:8555/YEAST/new-](http://pathway.yeastgenome.org:8555/YEAST/new-image?type=OVERVIEW&force=t)

image?type=OVERVIEW&force=t. A figura 14 fornece uma visão geral do mapa metabólico de *S. cerevisiae* deste site da internet, com notas para i-

5 identificar vias sintéticas para um aminoácido (lisina) um cofator (FAD), uma esteróide (ergosterol) e um lipídio (triglicerídeo). Cada item se liga à enzima que catalisa a reação e ao gene que codifica a enzima.

Muitas estratégias estão disponíveis para modificar geneticamente um microorganismo para aumentar a produção de um nutriente. Estas

10 incluem, por exemplo, introduzir no microorganismo um gene que codifica um polipeptídeo que compreende um aminoácido essencial; superexpressar uma enzimas ao longo de uma via sintética para o nutriente, reprimir um gene cujo produto inibe a produção do nutriente, inibir o transporte de um nutriente para fora de uma célula, aumentar o transporte de um nutriente para

15 dentro de uma célula e introduzir genes nas células os quais codificam enzimas para terminar ou criar uma via sintética para a enzima e/ou produto.

A levedura pode ser modificada para aumentar a produção de nutrientes, por exemplo, por superexpressar enzimas ao longo das vias sintéticas. Esta abordagem é descrita em Lin et al., "Heterologous protein ex-

20 pression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*," FEMS Microbiology Reviews (2000) 24:45-66. Um outro exemplo disso é He et al. ("Overexpression of a sterol C-24(28) reductase increases ergosterol production in *Saccharomyces cerevisiae*," Biotechnology Letters (2003) 25:773-778) no qual as células de levedura transformadas com genes de esterol redutase

25 C24(28) aumentaram a produção de ergosterol. Rippert et al. ("Engineering Plant Shikimate Pathway for Production of Tocotrienol and Improving Herbicide Resistance," Plant Physiol. (2004) 134:92-100) demonstraram produção aumentada de vitamina E por transfectar tabaco com o gene de prefenato desidrogenase de *S. cerevisiae* e superexpressar o gene. Este gene catalisa

30 uma reação na via da vitamina E. Embora o método tenha sido usado em tabaco, o gene era originado de levedura. Portanto, a mesma estratégia pode ser aplicada à levedura para aumentar a produção de vitamina E.

Outra estratégia para aumentar a produção de um nutriente é desrepressão de uma enzima sintética. Esta estratégia foi demonstrada por Dansen et al. ("Regulation of sterol carrier protein gene expression by the Forkhead transcription factor FOXO3a," J. Lipid Research, 45:81-88, January 5 2004). Células humanas em cultura foram modificadas geneticamente para diminuir a produção de FOXO3a, uma proteína transportadora de esterol que reprime a produção de esterol. A diminuição na atividade de FOXO3a resultou em menos repressão da produção de esterol, que, por sua vez, resultou em aumento da produção de esterol.

10 Outra estratégia para aumentar a produção de um nutriente em levedura é alterar geneticamente as células para acumular o nutriente ao invés de excretá-lo. Um exemplo disto é Kim et al. ("A role in vacuolar arginine transport for yeast Btn1p and for human CLN3, the protein defective in Batten disease," PNAS (2003) 100:15458-15462), onde os autores aumentaram a acumulação de arginina intracelular fazendo "knocking out" de um gene de levedura, *bnt1*, responsável pelo transporte da arginina para dentro de vacúolos.

Uma estratégia oposta envolve aumentar o número de cópias de um gene que transporta nutrientes de fora da célula para o interior. Veja, por exemplo, Sychrova et al., "Kinetic properties of yeast lysine permeases coded by genes on multi-copy vectors," FEMS Microbiol Lett, (1993) 113(1):57-61.

Em outra estratégia, uma levedura foi modificada para produzir o hormônio hidrocortisona por transfectar a levedura com vários genes da via sintética de hidrocortisona. (Szczbara et al., "Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast," Nature Biotechnology (2003) 21:143).

Um microorganismo modificado geneticamente pode incluir um microorganismo no qual as moléculas de ácido nucléico foram introduzidas, suprimidas ou modificadas (isto é, mutadas; por exemplo, pela inserção, deleção, substituição, e/ou inversão de nucleotídeos), de tal maneira que tais modificações fornecem o efeito desejado de rendimentos aumentado de nutrientes dentro do microorganismo ou no sobrenadante da cultura. Como

usado aqui, as modificações genéticas que resultam em uma diminuição na expressão do gene, na função do gene, ou na função do produto do gene (isto é, o nutriente, tal como proteína codificada pelo gene) podem ser referidas como inativação (completa ou parcial), deleção, interrupção, bloqueio ou

5 regulação negativa de um gene. Por exemplo, uma modificação genética em um gene a qual resulta em uma diminuição na função da proteína codificada por tal gene, pode ser o resultado de uma deleção completa do gene (isto é, o gene não existe, e portanto a proteína não existe), uma mutação no gene que resulta em tradução incompleta ou abolida da proteína (por exemplo, a

10 proteína não é expressa), ou uma mutação no gene que diminui ou abole a função natural da proteína (por exemplo, uma proteína é expressa a qual tem atividade enzimática diminuída ou abolida). As modificações genéticas que resultam em um aumento na expressão ou na função do gene podem ser referidas como amplificação, superprodução, superexpressão, ativação,

15 intensificação, adição, ou regulação positiva de um gene. A adição de genes clonados para aumentar a expressão do gene pode incluir manter o(s) gene(s) clonado(s) em plasmídeos em replicação ou integrar o(s) gené(s) clonado(s) no genoma do organismo da produção. Além disso, aumentar a expressão de genes clonados desejados pode incluir ligar operativamente o(s)

20 gene(s) clonado(s) aos elementos de controle transcricional nativos ou heterólogos.

Um microorganismo pode ser modificado por métodos conhecidos na técnica e estão dentro do escopo da invenção. Apenas como exemplo, o método inclui manipular pelo menos um dos genes estruturais na via

25 biossintética dos nutrientes, opcionalmente manipular os controles regulatórios da via sintética, e opcionalmente manipular os processos de transporte dos nutrientes para fora e para dentro do microorganismo. Por exemplo, o microorganismo pode ter mutações em um gene particular para a biossíntese do aminoácido. O método inclui preferivelmente manipular pelo menos

30 um dos genes estruturais para regular a síntese de um peptídeo que contém pelo menos um aminoácido essencial.

Os microorganismos em questão podem ser modificados para

superproduzir um nutriente tal como um aminoácido essencial, uma vitamina, um hormônio, uma proteína, e/ou um lipídio. Onde desejado, a produção de um ou mais nutrientes está sob o controle de uma seqüência regulatória que controla diretamente ou indiretamente a produção em uma forma dependente do tempo durante uma reação de fermentação. Preferivelmente, as seqüências regulatórias controlam diretamente ou indiretamente a produção tal que o nutriente desejado é produzido quando a reação de fermentação alcançou uma porcentagem desejada do término, preferivelmente pelo menos cerca de 50% do término, mais preferivelmente pelo menos cerca de 60% do término, e mais preferivelmente pelo menos cerca de 70% até de cerca de 90% do término, e mais preferivelmente pelo menos cerca de 95% do término. Quando controlado desta maneira, o rendimento de produtos da fermentação, tais como álcool e produtos gasosos é improvável ser afetado.

A progressão da fermentação pode ser monitorada por uma variedade das maneiras. Por exemplo, pelo menos 50% do término de uma reação de fermentação podem ser pelo consumo de pelo menos 50% da glicose total na fermentação desejada, quando comparada a fermentações similares, ou quando 50% da glicose total foi adicionada, ou quando a quantidade total de dióxido de carbono emitido e dissolvido é 50% da quantidade total emitida em fermentações similares. Mais especificamente, pelo menos 50% do término de uma reação de fermentação podem ser evidenciados por uma diminuição no conteúdo de glicose para menos do que cerca de 50% do conteúdo inicial de glicose presente em uma mistura de reação de fermentação (isto é, o nível de glicose presente antes do começo da reação de fermentação), ou menor do que um nível de limite desejado (por exemplo, cerca de 100 gramas por litro de reação de fermentação). Alternativamente, a porcentagem para o término pode ser determinada pela quantidade de tempo durante o qual a fermentação ocorreu, tipicamente, pelo menos cerca da metade do tempo levado por uma fermentação similar. A duração do tempo da fermentação pode variar de cerca de uma hora a vários dias, dependendo das quantidades relevantes de microorganismos e de material inicial de fermentação fornecidos. Um versado na técnica pode verificar prontamente a

duração normal de uma reação de fermentação sem experimentação excessiva quando dadas as quantidades de microorganismos e de materiais iniciais.

Em algumas modalidades, a invenção inclui um microorganismo modificado útil para uma reação de fermentação, compreendendo uma seqüência exógena que codifica um polipeptídeo, por exemplo, que codifica uma enzima em uma via sintética para um nutriente ou que compreende pelo menos um resíduo de aminoácido essencial, em que a expressão da seqüência exógena está sob o controle de uma seqüência regulatória. Preferivelmente, as seqüências regulatórias suprimem diretamente ou indiretamente a expressão da seqüência exógena até que a reação de fermentação tenha atingido uma porcentagem desejada do término, preferivelmente pelo menos cerca de 50% do término, mais preferivelmente pelo menos cerca de 60% do término, e mais preferivelmente pelo menos o cerca de 70% até cerca de 90%, do término e mais preferivelmente pelo menos cerca de 95% do término. Uma variedade de seqüências regulatórias adequadas pode ser empregada na presente invenção. Em certas modalidades, as seqüências regulatórias são sensíveis às condições ambientais, tais como a concentração de glicose ou o grau de calor ou de luz. Por exemplo, se o composto pretendido para inclusão nos resíduos for tóxico para o microorganismo, pode-se querer começar a produção até que a produção do produto comercial tenha ocorrido ou esteja quase completa. Exemplos não-limitantes incluem Rgt1, um fator de transcrição normalmente regula a expressão de hexoquinase (A. Palomino, *Biochem. J.* (2005) 388, 697–703) somente quando a concentração de glicose cai abaixo de um determinado nível, ou uma seqüência que suprime a expressão do gene exógeno quando ligada operativamente até que a fermentação tenha atingido por exemplo pelo menos 50% do término, assim como uma ampla gama de seqüências regulatórias dos genes de choque térmico (por exemplo, gene *rpoH*, como descrito em Nagai et al. *J Bacteriol.* 1990 maio; 172(5): 2710–2715), genes de toxicidade, e genes de formação de esporo. Em particular, o início do operon supressor de glicose pode causar a indução de expressão da seqüên-

cia exógena que codifica um polipeptídeo desejado. O operon supressor de glicose pode ser iniciado quando a reação de fermentação atingiu pelo menos de cerca de 50% do término. A reação de fermentação pode ser controlada por monitorar o conteúdo de glicose da mistura de fermentação ou por  
5 monitorar a quantidade do produto gasoso formado durante a reação de fermentação.

Um polinucleotídeo é dito codificar um polipeptídeo se, em seu estado nativo ou quando manipulado por métodos conhecidos daqueles versados na técnica, ele puder ser transcrito e/ou traduzido para produzir o polipeptídeo ou um fragmento disso. A fita anti-sentido de tal polinucleotídeo  
10 também é dita codificar a seqüência.

Em algumas modalidades, um microorganismo modificado é induzido com um veículo genético tal como, um vetor de expressão que compreende uma seqüência exógena que codifica um polipeptídeo que compreende pelo menos um resíduo de aminoácido essencial. Construtos de polinucleotídeo preparados para introdução em um hospedeiro procariótico ou eucariótico podem tipicamente, mas não sempre, compreender um sistema da replicação (isto é, vetor) reconhecido pelo hospedeiro, incluindo o fragmento de polinucleotídeo pretendido que codifica o polipeptídeo desejado, e  
15 podem preferivelmente, mas não necessariamente, incluir também seqüências regulatórias de início de transcrição e de tradução ligadas operativamente ao segmento que codifica o polipeptídeo. Os sistemas de expressão (vetores de expressão) podem incluir, por exemplo, uma origem de replicação de seqüência de replicação autônoma (ARS) e seqüências de controle  
20 de expressão, um promotor, um intensificador e sítios de informação de processamento necessárias, tais como sítios de ligação de ribossomo, sítios de splice de RNA, sítios de poliadenilação, seqüências de terminação de transcrição e seqüências estabilizadoras do mRNA. Peptídeos de sinal também podem ser incluídos onde apropriado, preferivelmente a partir de polipeptídeos secretados da mesma espécie ou de espécies relacionadas, os quais  
25 permitem que a proteína atravesse e/ou se aloje nas membranas da célula ou seja secretada da célula.  
30

Um grande número de veículos genéticos adequados para a presente invenção está disponível na técnica. Eles incluem vetores de expressão virais e não-virais. Os vetores de expressão virais exemplares não-limitantes são vetores derivados de vírus de RNA tais como retrovírus, e vírus de DNA tais como adenovírus e vírus adeno-associados. Os vetores de expressão não-virais incluem, mas não são limitados a plasmídeos, cosmídeos, e complexos de DNA/lipossoma. Onde desejado, os veículos genéticos podem ser manipulados para carregar as seqüências regulatórias que direcionam a expressão organela-específica dos genes exógenos carregados por eles. Por exemplo, seqüência-líder ou de sinal pode ser adicionada para direcionar a seqüência exógena para os corpos de inclusão de um microorganismo adequado. Os veículos genéticos podem ser introduzidos em um microorganismo hospedeiro por qualquer um de vários de meios adequados, incluindo eletroporação, transfecção empregando cloreto de cálcio, cloreto de rubídio, fosfato de cálcio, DEAE-dextran, ou outras substâncias, bombardeio de microprojéteis, lipofecção, e infecção.

O vetor de expressão pode ser empregado para qualquer aminoácido ou peptídeo e pode ser usado no caso de *E. coli*, levedura, ou outros microorganismos para aumentar a produção de aminoácido ou de peptídeo. Preferivelmente, o peptídeo consiste pelo menos em um aminoácido essencial.

As variantes ou as seqüências que têm identidade ou homologia substancial com os polinucleotídeos que codificam as enzimas podem ser utilizadas na prática da invenção. Tais seqüências podem ser referidas como variantes ou seqüências modificadas. Isto é, uma seqüência de polinucleotídeo pode ser modificada, contudo ainda retendo a habilidade de codificar um polipeptídeo que exhibe a atividade desejada. Tais variantes ou seqüências modificadas são assim equivalentes. Geralmente, a seqüência variante ou modificada pode compreender pelo menos cerca de 40% a 60%, preferivelmente cerca de 60% a 80%, mais preferivelmente cerca de 80% a 90%, e ainda mais preferivelmente cerca de 90% a 95% de identidade de seqüência com a seqüência nativa.

O controle genético da síntese das enzimas da via da galactose em *Saccharomyces cerevisiae* obedece, em certos aspectos, o modelo do operon para o sistema de  $\beta$ -galactosídeo de *E. coli*. Por exemplo, em *E. coli*, histidina livre reprime o operon através da inibição por retroalimentação da primeira enzima na via, 5'-trifosfato de adenosina fosforribosiltransferase, HisG. A mutação do gene hisG em *S. typhimurium* pode resultar em um aumento de 3 a 4 na concentração intracelular das enzimas do operon da histidina. (Vide Meyers et al., J. Bacteriology 1975, 124 (3) 1227-1235).

A levedura pode ser um hospedeiro particularmente adequado para expressar um peptídeo ou proteína rico em um aminoácido particular e/ou aminoácidos livres. Em levedura acumuladora de lisina, a maior parte da lisina pode estar contida nos vacúolos que são estáveis quando incubados com líquido do rúmen, mas é liberada imediatamente quando expostos à pepsina, uma das enzimas de digestão de proteína do abomaso. Assim, este organismo pode ser um hospedeiro útil para expressar proteínas e/ou aminoácidos e fornecer uma suplemento de ração protegido que pode aumentar a quantidade de proteínas e/ou de aminoácidos disponíveis para a absorção intestinal. O aminoácido pode incluir, apenas como exemplo, lisina, histidina, metionina, fenilalanina, e treonina. Os produtos ricos em aminoácido podem ser produzidos por métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, um caldo de fermentação rico em lisina pode ser usado como uma fonte da lisina. O caldo de fermentação rico em lisina pode ser produzido por organismos unicelulares (por exemplo, microorganismos tais como bactérias ou levedura) que são selecionados ou manipulados para superproduzir lisina. Microorganismos adequados podem incluir microorganismos que pertencem ao gênero de *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Arthrobacter*, *Serratia*, e *Corynebacterium*. Como tal, bactérias gram-negativas tais como *E. coli* podem ser adequadas para produzir um caldo de histidina.

Pode ser desejável usar hospedeiros microbianos que não contêm lipopolissacarídeos ("LPS") os quais têm efeitos endotóxicos, por exemplo, bactérias Gram-positivas, tais como *Corynebacteria* e *Brevibacterium*. Bactérias Gram-negativas, tais como *E. coli*, incluem freqüentemente LPS, o

qual tem um efeito endotóxico. A seleção de uma bactéria que não inclui LPS endotóxico pode ser particularmente importante quando uma biomassa for preparada e usada como uma fonte de aminoácido, porque a maioria dos LPS permanece associada as bactérias e não é liberada substancialmente no caldo de fermentação a menos que as bactérias sejam lisadas. Como tal, é esperado que LPS endotóxico esteja localizado dentro da biomassa após a fermentação.

Em uma modalidade, esta invenção contempla modificar geneticamente um microorganismo hospedeiro que superexpressa um peptídeo ou uma proteína que é rica em um aminoácido essencial, em particular lisina, metionina, triptofano ou treonina. Tais polipeptídeos podem ser expressos, por exemplo, por fornecer o microorganismo com um vetor de expressão que compreende uma seqüência de controle regulatória operativamente ligada a uma seqüência de nucleotídeo que codifica o polipeptídeo. Contanto que o polipeptídeo seja secretado pelo microorganismo, o polipeptídeo tem, de forma útil, um comprimento maior do que aquele que pode ser absorvido de forma eficaz por outros microorganismos, resultando assim em um aumento líquido do aminoácido no resíduo. Em levedura, tal polipeptídeo deve ter pelo menos 4, mais preferivelmente pelo menos 10 aminoácidos de extensão.

Uma proteína ou um peptídeo particular rico em aminoácido pode ser superexpresso em um hospedeiro microbiano (tal como uma espécie de *Escherichia*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, levedura), em plantas e similares. Em algumas modalidades preferidas, a proteína rica em aminoácido é composta de aminoácidos essenciais e não-essenciais. Em algumas modalidades preferidas, a proteína rica em aminoácido é composta apenas de aminoácidos essenciais. Uma proteína particular rica em aminoácido particular pode ser selecionada daquelas proteínas ricas em aminoácido descritas na literatura, por exemplo, uma proteína II rica em histidina de *Plasmodium falciparum* e uma ou mais das proteínas da classe das proteínas chamadas de "histatinas," as quais demonstram atividades antibacterianas e antifúngicas (Mervyn et al. Pub U.S. Nº 2006/0008546, incorporada aqui por referência em sua totalidade). Uma proteína rica em aminoácido

particular também pode compreender fragmentos específicos de proteínas ricas em aminoácido conhecidas que têm um conteúdo aumentado deste aminoácido particular comparado à proteína de extensão completa. Por exemplo, uma proteína II rica em histidina de *Plasmodium falciparum* tem uma composição de histidina de cerca de 32%. O fragmento do aminoácido 61 ao 130 desta proteína tem uma composição de histidina de cerca de 44%. O fragmento do aminoácido 58 ao 80 desta proteína tem uma composição de histidina de cerca de 55%. Outra classe exemplar de proteínas compreende proteínas ricas em lisina. Proteínas ricas em lisina exemplares incluem seqüências naturais, recombinantes e/ou sintéticas. Qualquer uma das proteínas ou fragmentos listados na tabela 1 podem ser expressos pelos organismos em questão. Uma proteína rica em aminoácido não precisa reter sua função nativa para ser adequada para as composições ou os métodos aqui descritos.

15 Tabela 1. Proteínas ricas em lisina exemplares

Nome da proteína	Número de acesso primário do UniProtKB/Swiss-Pro
proteína ribossomal L44	P17843
proteína ribossômica 40S S27a	P29504
proteína ribossômica 40S S27a	P47905
proteína ribossômica 40S S27a (bovino)	P62992
proteína ribossômica 40S S27a (porco-da-índia)	P62978
proteína ribossômica 40S S27a (ser humano)	P62979
proteína ribossômica 40S S27a <i>Plutella xylostella</i>	P68202
proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Kluyveromyces lactis</i> (Levedura))	P69061
proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Gallus gallus</i> (Galinha))	P79781
proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Mus musculus</i> (Camundongo))	P62983
proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Rattus norvegicus</i> (Rato))	P62982
proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lagarta do cartucho))	P68203

Nome da proteína	Número de acesso primário do UniProtKB/Swiss-Pro
proteína ribossômica 60S L44 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> (agrião orelha de camundongo))	O23290
proteína ribossômica 40S S27a-1 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> (agrião orelha de camundongo))	P59271
proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Ictalurus punctatus</i> (peixe gato canal))	P68200
proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Asparagus officinalis</i> (aspargo de jardim))	P31753
proteína ribossômica 40S S27a-3( <i>Arabidopsis thaliana</i> (Agrião orelha de camundongo))	P59233
proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Drosophila melanogaster</i> (Mosca das frutas))	P15357
Proteína Hipotética 17,7 kDa em ABP1 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levedura do pão))	P37263
Proteína ribossômica 60S L44 ( <i>Phaffia rhodozyma</i> (Levedura) ( <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> ))	O59870
Proteína ribossômica 40S S27a-2 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> (Agrião orelha de camundongo))	P59232
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Neurospora crassa</i> )	P14799
Proteína hipotética de 9,7 kDa em lcnC ( <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> ( <i>Streptococcus lactis</i> ))	Q00571
Proteína do capsídeo C (por similaridade) (vírus da diarreia viral bovina (cepa CP7) (BVDV) (Vírus da doença das mucosas))	Q96662
Proteína hipotética MJ0331( <i>Methanococcus jannaschii</i> )	Q57777
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Lycopersicon esculentum</i> (Tomate))	P62980
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Solanum tuberosum</i> (Batata))	P62981
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Zea mays</i> (Milho))	P27923

Nome da proteína	Número de acesso primário do UniProtKB/Swiss-Pro
Proteína ribossômica 60S L44 ( <i>Plasmodium falciparum</i> (isolado 3D7))	O97231
Proteína do capsídeo C (por similaridade) (Vírus da diarreia viral bovina (isolado NADL) (BVDV) (Vírus da doença das mucosas))	P19711
Proteína hipotética HI0235 ( <i>Haemophilus influenzae</i> )	P44588
Proteína ribossômica 60S L44 ( <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> )	P49213
Proteína ribossômica 60S L36a ( <i>Brachydanio rerio</i> (peixe-zebra) (Danio rerio))	P61485
proteína ribossômica 60S L36a ( <i>Fugu rubripes</i> (Baiaçu japonês) (Takifugu rubripes))	P61486
proteína ribossômica 60S L36a ( <i>Ictalurus punctatus</i> (Peixe-gato de canal))	P61487
Proteína ribossômica 30S S27ae ( <i>Sulfolobus tokodaii</i> )	Q975Q8
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Dictyostelium discoideum</i> (Mixomiceto))	P14797
Proteína ribossômica 50S L23 ( <i>Aquifex aeolicus</i> )	O66433
Proteína ribossômica 60S L44 ( <i>Gossypium hirsutum</i> (Algodão mexicano))	Q96499
Proteína do grupo de alta mobilidade ( <i>Tetrahymena pyriformis</i> )	P40625
Proteína ribossômica 50S L33 ( <i>Vibrio parahaemolyticus</i> )	Q87T84
Proteína da biogênese de ribossomo Nop10 ( <i>Methanococcus maripaludis</i> )	Q6LWK3
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Oryza sativa</i> (Arroz))	P51431
Proteína ribossômica 60S L31 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levedura de pão))	P14063
Proteína ribossômica 50S L28 ( <i>Nicotiana tabacum</i> (tabaco comum))	P30956

Nome da proteína	Número de acesso primário do UniProtKB/Swiss-Pro
Proteína ribossômica 60S L38 ( <i>Caenorhabditis elegans</i> )	O17570
Proteína nucleolar de 40kDa ( <i>Mus musculus</i> (Camundongo))	Q9ESX4
Proteína semelhante a FAM32A ( <i>Brachydanio rerio</i> (Peixe-zebra) (Danio rerio))	Q6GQN4
Enkurin. /FTId=PRO_0000086976 ( <i>Mus musculus</i> (Camundongo))	Q6SP97
Proteína ribossômica 60S L44 ( <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (levedura de fissão))	Q9UT18
Proteína ribossômica 60S L36a ( <i>Rattus norvegicus</i> (Rato))	P83883
Proteína ribossômica 60S L36a ( <i>Sus scrofa</i> (Porco))	P83884
Proteína ribossômica 60S L36a ( <i>Mus musculus</i> (Camundongo))	P83882
Proteína ribossômica 60S L36a ( <i>Homo sapiens</i> (Humano))	P83881
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Caenorhabditis elegans</i> )	P37165
Proteína ribossômica 40S S25 ( <i>Drosophila melanogaster</i> (Mosca das frutas))	P48588
Proteína ribossômica 30S S27ae ( <i>Methanococcus jannaschii</i> )	P54031
Proteína ribossômica 30S S27ae ( <i>Sulfolobus solfataricus</i> )	Q97ZY7
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Hordeum vulgare</i> (Cevada))	P22277
Proteína ribossômica 50S L33 ( <i>Rhodospirellula baltica</i> )	Q7UMNO
Proteína do capsídeo C (Por similaridade) (Vírus da febre suína clássica (cepa Alfort) (CSFV) (Vírus da cólera canina))	P19712
Pequena citocina indutível B14 ( <i>Mus musculus</i> (Camundongo))	Q9WUQ5

Nome da proteína	Número de acesso primário do UniProtKB/Swiss-Pro
Proteína do capsídeo C (Por similaridade) (Vírus da diarreia viral bovina (cepa SD-1) (BVDV) (Vírus da doença das mucosas))	Q01499
Subunidade 2 de metanol desidrogenase ( <i>Methylobacterium extorquens</i> )	P14775
Proteína hipotética yqbP ( <i>Bacillus subtilis</i> )	P45932
Proteína UPF0291 lmo1304 ( <i>Listeria monocytogenes</i> )	Q8Y7H5
Proteína ribossômica 60S L32 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levedura de pão))	P25348
Proteína ribossômica 60S L27 ( <i>Caenorhabditis elegans</i> )	P91914
Proteína Nucleolar de 40 kDa ( <i>Macaca fascicularis</i> (Macaco comedor de caranguejo) ( <i>Cynomolgus monkey</i> ))	Q95KF9
Proteína ribossômica 60S L44 ( <i>Coprinus cinereus</i> (Fungo "Inky cap"))	Q9UWE4
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Schizosaccharomyces pombe</i> (levedura de fissão))	P0C016
Proteína ribossômica 50S L35 ( <i>Thermus thermophilus</i> (cepa HB8 / ATCC 27634 / DSM 579))	Q5SKU1
Proteína ribossômica 50S L35 ( <i>Thermus thermophilus</i> )	P80341
Proteína hipotética de 9,4 kDa em nrdB (Bacteriófago T4)	P39505
Proteína hipotética de 31,3 kDa TAF145 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levedura de pão))	P53335
Proteína ribossômica 50S L33 ( <i>Vibrio vulnificus</i> )	Q8DDY2
Proteína ribossômica 50S L33 ( <i>Vibrio vulnificus</i> (cepa YJ016))	Q7MPS5
Partícula de reconhecimento de sinal de 14 kDa ( <i>Caenorhabditis elegans</i> )	O16927
Endonuclease-1./FTId=PRO_0000207691 ( <i>Buchnera aphidicola</i> subsp. <i>Acyrtosiphon pisum</i> ( <i>Acyrtosiphon pisum symbiotic bacterium</i> ))	P57487

Nome da proteína	Número de acesso primário do UniProtKB/Swiss-Pro
Proteína ribossômica 30S S17 ( <i>Onion yellows phytoplasma</i> )	Q6YR12
Proteína nucleolar de 40 kDa ( <i>Homo sapiens</i> (Homem))	Q9NP64
Proteína de biogênese de ribossomo Nop10 ( <i>Sulfolobus solfataricus</i> )	Q97Z78
DNA topoisomerase 1 ( <i>Rattus norvegicus</i> (Rato))	Q9WUL0
Provável proteína da biogênese de ribossomo ( <i>Homo sapiens</i> (Homem))	Q9UHA3
DNA topoisomerase 1 ( <i>Mus musculus</i> (Camundongo))	Q04750
Proteína hipotética aq_1894 ( <i>Aquifex aeolicus</i> )	O67734
DNA topoisomerase 1 ( <i>Cricetulus griseus</i> (hamster Chinês))	Q07050
Proteína dedo de zinco 273 ( <i>Homo sapiens</i> (Homem))	Q14593
DNA topoisomerase 1 ( <i>Homo sapiens</i> (Homem))	P11387
Proteína ribossômica 50S L28 ( <i>Wigglesworthia glossinidia brevipalpis</i> )	Q8D2F1
DNA topoisomerase 1 ( <i>Cercopithecus aethiops</i> (Macaco verde) (Grivet))	Q7YR26
RNA exonuclease 4 ( <i>Candida glabrata</i> (Levedura) ( <i>Torulopsis glabrata</i> ))	Q6FQA0
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Caenorhabditis briggsae</i> )	P37164
Proteína ribossômica 30S S14 ( <i>Mycoplasma capricolum subsp. capricolum</i> (cepa California kid / ATCC 27343 / NCTC 10154))	P10130
Proteína ribossômica 50S L28 ( <i>Clostridium perfringens</i> )	Q8XJM2
Proteína ribossômica 50S L33 ( <i>Neisseria meningitidis sorogrupo A</i> )	P66225
Proteína ribossômica 50S L33 ( <i>Neisseria meningitidis</i> )	P66226

Nome da proteína	Número de acesso primário do UniProtKB/Swiss-Pro
<i>sorogroup B</i> )	
Proteína ribossômica 50S L33 ( <i>Yersinia pestis</i> )	Q8ZJP1
Proteína ribossômica 40S S25 ( <i>Ictalurus punctatus</i> (Peixe-gato de canal))	Q90YP9
Pleiotrofina ( <i>Mus musculus</i> (Camundongo))	P63089
Proteína ribossômica 60S L44 ( <i>Trypanosoma brucei brucei</i> )	P17843
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Manduca sexta</i> (Larva da mariposa do tabaco) (Larva do tabaco))	P29504
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Lupinus albus</i> (Tremoço branco))	P47905
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Bos taurus</i> (Bovino))	P62992
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Cavia porcellus</i> (Porco-da-índia))	P62978
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Homo sapiens</i> (Homem))	P62979
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Plutella xylostella</i> (Mariposa diamante))	P68202
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Kluyveromyces lactis</i> (Levedura))	P69061
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Gallus gallus</i> (Galinha))	P79781
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Mus musculus</i> (Camundongo))	P62983
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Rattus norvegicus</i> (Rato))	P62982
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lagarta do cartucho))	P68203
Proteína ribossômica 60S L44 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> (Agrião orelha de camundongo))	O23290
Proteína ribossômica 40S S27a-1 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	P59271

Nome da proteína	Número de acesso primário do UniProtKB/Swiss-Pro
(Agrião orelha de camundongo))	
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Ictalurus punctatus</i> (Peixe-gato de canal))	P68200
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Asparagus officinalis</i> (Garden asparagus))	P31753
Proteína ribossômica 40S S27a-3 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> (Agrião orelha de camundongo))	P59233
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Drosophila melanogaster</i> (Mosca das frutas))	P15357
Proteína hipotética de 17,7 kDa em ABP1 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levedura de pão))	P37263
Proteína ribossômica 60S L44 ( <i>Phaffia rhodozyma</i> (Levedura) ( <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> ))	O59870
Proteína ribossômica 40S S27a-2 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> (Agrião orelha de camundongo))	P59232
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Neurospora crassa</i> )	P14799
Proteína hipotética de 9,7 kDa em IcnC ( <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> (Streptococcus lactis))	Q00571
Proteína do capsídeo C (Por similaridade) (Vírus da diarreia viral bovina (cepa CP7) (BVDV) (Vírus da doença das mucosas))	Q96662
Proteína hipotética MJ0331 ( <i>Methanococcus jannaschii</i> )	Q57777
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Lycopersicon esculentum</i> (Tomate))	P62980
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Solanum tuberosum</i> (Batata))	P62981
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Zea mays</i> (Milho))	P27923
Proteína ribossômica 60S L44 ( <i>Plasmodium falciparum</i> )	O97231

Nome da proteína	Número de acesso primário do UniProtKB/Swiss-Pro
(isolado 3D7))	
Proteína do capsídeo C (Por similaridade)(Vírus da diarreia viral bovina (isolado NADL) (BVDV) (Vírus da doença das mucosas))	P19711
Proteína hipotética HI0235 ( <i>Haemophilus influenzae</i> )	P44588
Proteína ribossômica 60S L44 ( <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> )	P49213
Proteína ribossômica 60S L36a ( <i>Brachydanio rerio</i> (Peixe-zebra) (Danio rerio))	P61485
Proteína ribossômica 60S L36a ( <i>Fugu rubripes</i> (Baiacu japonês) (Takifugu rubripes))	P61486
Proteína ribossômica 60S L36a ( <i>Ictalurus punctatus</i> (Peixe-gato de canal))	P61487
Proteína ribossômica 30S S27ae ( <i>Sulfolobus tokodaii</i> )	Q975Q8
Proteína ribossômica 40S S27a ( <i>Dictyostelium discoideum</i> (Mixomiceto))	P14797
Proteína ribossômica 50S L23 ( <i>Aquifex aeolicus</i> )	O66433
Proteína ribossômica 60S L44 ( <i>Gossypium hirsutum</i> (Algodão mexicano))	Q96499
Proteína do grupo de alta mobilidade ( <i>Tetrahymena pyriformis</i> )	P40625

Um peptídeo ou proteína rica em aminoácido particular pode ser clonada em um vetor de expressão e introduzida em uma célula hospedeira adequada. Alternativamente, uma proteína manipulada recombinantemente que tem um perfil de aminoácido escolhido pode ser clonado em um vetor de expressão e introduzido em uma célula hospedeira adequada (por exemplo, microorganismo). As proteínas manipuladas recombinantemente podem ter um conteúdo aumentado de um ou mais aminoácidos essenciais, ou as pro-

teínas podem ter um conteúdo aumentado de um ou mais dos outros amino-ácidos limitantes para a produção de leite, os quais podem incluir lisina, metionina, fenilalanina, treonina, isoleucina, e triptofano. Como tais, as proteínas manipuladas recombinantemente podem ser manipuladas para incluir

5 um perfil selecionado de aminoácidos. As proporções dos aminoácidos nas proteínas manipuladas recombinantemente podem ser variadas ou manipuladas para combinar as proporções que são previstas para serem ótimas para o gado leiteiro baseado em estudos ou em previsões de alimentação. Em uma modalidade, o perfil selecionado dos aminoácidos, por exemplo,

10 uma proteína produzida recombinantemente, é similar ao perfil do farinha de sangue. Depois que uma proteína foi manipulada e seu gene foi clonado em um vetor de expressão, a proteína pode ser expressa (ou superexpressa) em um hospedeiro microbiano tal como *E. coli*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, levedura, etc.

15 A fim de otimizar a expressão do peptídeo ou da proteína no hospedeiro, a seqüência do peptídeo ou da proteína pode ser selecionada para utilizar tRNAs específicos que são prevalentes no hospedeiro. Alternativamente, os tRNAs selecionados podem ser co-expressos no hospedeiro para facilitar a expressão do peptídeo ou proteína. Alternativamente,

20 padrões únicos e múltiplos de uso de códon podem ser ajustados para rendimento, enovelamento, e localização ótimos. O peptídeo ou proteínas manipuladas recombinantemente podem incluir seqüências específicas para facilitar a purificação do peptídeo ou proteínas. As proteínas podem também incluir "seqüências-líder" para direcionar a proteína para locais específicos

25 na célula do hospedeiro tal como o periplasma, ou para direcionar a proteína para secreção. O peptídeo ou proteínas manipuladas recombinantemente podem também incluir sítios de clivagem por protease para facilitar a clivagem das proteínas no abomaso e para aumentar a liberação dos aminoácidos no peptídeo ou na proteína para o intestino delgado. Por exemplo, uma

30 tal protease é a pepsina, uma das enzimas de digestão de proteína do abomaso em gado. A pepsina demonstra uma clivagem preferencial de peptídeos nos resíduos hidrofóbicos preferivelmente aromáticos nas posições P1

e P1'. Em particular, a pepsina cliva proteínas no lado carbóxi da fenilalanina, do triptofano, da tirosina, e da leucina. Mais favoravelmente, o polipeptídeo é facilmente clivável por proteases animais geralmente.

Em algumas modalidades da invenção, um microorganismo é  
5 modificado de tal maneira que o microorganismo modificado seja enriquecido em vitaminas. As vitaminas incluem, mas não são limitadas a, vitamina A (retinol), vitamina B1 (tiamina), vitamina B2 (riboflavina), vitamina B3 (Niacina), vitamina B5 (ácido pantotênico), vitamina B6 (Piridoxina), vitamina B7 (Biotina), vitamina B9 (ácido fólico), vitamina B12 (cianocobalamina), vitami-  
10 na C<sup>[3]</sup> (ácido ascórbico), vitamina D1 a D4 (lamisterol, ergocalciferol, calciferol, diidrotaquisterol, desidrosterol 7), vitamina E (tocoferol), e vitamina K (naftoquinona).

Em outra modalidade, o microorganismo é modificado para aumentar a quantidade de um micronutriente, tal como uma vitamina, um mine-  
15 ral-traço, um antioxidante, ou determinados lipídios, por exemplo, os tocoferóis.

Em outra modalidade, o microorganismo é modificado para aumentar a quantidade de um cofator ou uma coenzima, tal como NADH, FA-  
DH, ATP, coenzima A, coenzima Q<sub>10</sub> ou molibdopterina.

20 Organismos diferentes precisam de substâncias orgânicas-traço diferentes. A maioria dos mamíferos necessita, com poucas exceções, das mesmas vitaminas que os seres humanos. Uma exceção é a vitamina c, que pode ser sintetizada por todos os outros mamíferos exceto outros primatas superiores e porcos da guiné. Quanto menos a espécie for relacionada aos  
25 mamíferos, mais diferentes as necessidades dos organismos podem se tornar.

A presente invenção inclui métodos de produzir vitaminas em microorganismos modificados qualquer meio como o material inicial. A presente invenção inclui vários aspectos de materiais e intermediários biológi-  
30 cos úteis na produção biológica de vitaminas. Por exemplo, a vitamina E (d- $\alpha$ -tocoferol) é um suplemento nutricional importante em humanos e nos animais. Os ésteres de  $\alpha$ -tocoferol, tocoferol e  $\alpha$ -tocoferila podem ser produzi-

dos a partir de farnesol ou de geranylgeraniol (GG). Farnesol pode ser usado como um material inicial para sintetizar quimicamente o produto final, ésteres de  $\alpha$ -tocoferila. Alternativamente, o farnesol pode ser convertido quimicamente em GG. GG produzido biologicamente ou pela síntese a partir de farnesol, pode então ser usado como um material inicial para fazer  $\alpha$ -tocoferila e ésteres de  $\alpha$ -tocoferila. Farnesol e GG são álcoois de prenila produzidos pela desfosforilação de farnesilpirofosfato (FPP) e de geranylgeranilpirofosfato (GGPP), respectivamente. FPP e GGPP são intermediários na biossíntese de compostos de isoprenóide, incluindo esteróis, ubiquinonas, heme, dolicois, e carotenóides, e são usados na prenilação pós-traducional e proteínas. FPP e GGPP são derivados do isopentilpirofosfato (IPP). Millis et al. Patente U.S. Nº 6.410.755, incorporados aqui por referência na sua totalidade.

Os isoprenóides são a maior família de produtos naturais, com cerca de 22.000 estruturas diferentes conhecidas. Todos os isoprenóides são derivados do composto  $C_5$  IPP. Assim, os esqueletos de carbono de todos os compostos do isoprenóide são criados por adições seqüenciais das unidades  $C_5$  à cadeia crescente de poliprenóide. Existem duas vias diferentes que levam a IPP. Fungos (tal como a levedura) e animais possuem a via dependente de mevalonato que pode usar a acetil CoA como o precursor inicial. As bactérias e plantas superiores, por um lado, podem possuir uma via independente do mevalonato, também referida como a via de não-mevalonato, partindo de piruvato e gliceraldeído 3-fosfato.

Modalidades da presente invenção incluem a produção biológica de vitaminas ou de qualquer material ou intermediário inicial para a produção de vitaminas, em culturas de células procarióticas ou eucarióticas e em sistemas livres de célula, independente de qual via o organismo utilize. Por exemplo, a biossíntese do precursor de todos os isoprenóides, IPP utiliza a via dependente de mevalonato ou a independente. Preferivelmente as células usadas na cultura celular são modificadas geneticamente para aumentar o rendimento de vitaminas ou intermediário ou de um material inicial para estes. As células podem ser modificadas geneticamente por técnicas de ma-

nipulação genética (isto é, tecnologia recombinante), por técnicas microbiológicas clássicas, ou por uma combinação de tais técnicas e também podem incluir variantes genéticas naturais.

Modalidades da presente invenção incluem a produção biológica de farnesol ou de GG por cultivar um microorganismo, preferivelmente a levedura, que foi modificada geneticamente para modular a atividade de uma ou mais das enzimas em sua via biossintética de isoprenóide, diminuir (incluindo eliminar) a ação da atividade da esqualeno sintase, aumentar a ação da HMG-CoA redutase, aumentar a ação da GGPP sintase, aumentar a ação da FPP sintase, ou aumentar a ação da fosfatase para aumentar a conversão de FPP em farnesol ou de GGPP a GG.

Um aminoácido, um peptídeo ou uma proteína particular que tem um conteúdo de aminoácido aumentado podem ser pelo menos parcialmente purificado do caldo de fermentação ou da biomassa lisada. Por exemplo, lisina ou proteínas ricas em lisina podem ser isoladas com base no ponto isoelétrico da lisina. Similarmente, a presença da lisina em uma proteína rica em lisina pode ser usada isolar a proteína, com base no ponto isoelétrico da proteína. O ponto isoelétrico desejado para uma proteína particular rica em um aminoácido pode ser variado usando tecnologia recombinante para alterar a composição do aminoácido da proteína (por exemplo, criar uma proteína que tem um conteúdo selecionado de lisina).

O ponto isoelétrico (pI) único de um aminoácido particular comparado a outros aminoácidos pode permitir a precipitação seletiva desse aminoácido, a extração preferencial em solventes orgânicos, e ligação a várias matrizes de quelação de metal resina ou de troca de íon. Um aminoácido ou um peptídeo particular pode se ligar a metais de transição tais como níquel (Ni) e pode se usado para facilitar o isolamento da proteína (por exemplo, por ligar a proteína a uma matriz contendo níquel). Outros metais da transição podem ser usados, tal como o cobre (Cu). Além disso, um tamanho do aminoácido pode permitir o uso de combinações únicas de cromatografia de exclusão de tamanho e de resinas de troca de íon isolar esse aminoácido do caldo de fermentação contendo outros aminoácidos e subprodu-

tos. Adicionalmente, o pl único de um aminoácido pode resultar em valores de pl específicos e únicos para essa proteína rica em aminoácido que permite assim a precipitação seletiva destas proteínas a partir de outras proteínas celulares para uso em ração ou alimento.

5 B. Aminoácidos essenciais e não-essenciais

Os microorganismos modificados da presente invenção podem ser modificados para produzir níveis elevados de nutrientes incluindo aminoácidos essenciais e não-essenciais. A ração completa ou os resíduos de fermentação que contêm tais microorganismos modificados contêm níveis elevados dos nutrientes incluindo aminoácidos essenciais e não-essenciais.

Um aminoácido essencial para um organismo é um aminoácido que não pode ser sintetizado pelo organismo a partir de outros recursos disponíveis, e deve conseqüentemente ser fornecido como parte de sua dieta. O aminoácido essencial pode ser um que é essencial para um ser humano, um mamífero, um pássaro ou um peixe. São contemplados particularmente os aminoácidos essenciais para animais domésticos, por exemplo, animais de fazenda ou animais de estimação. Oito aminoácidos são considerados geralmente como essenciais para seres humanos: lisina, metionina, fenilalanina, treonina, isoleucina, triptofano, valina, e leucina. Dois outros, histidina e arginina podem ser essenciais nas crianças e possivelmente nos idosos. A taurina pode ser necessária para conservar a maleabilidade arterial e do colágeno. Os aminoácidos essenciais variam de espécie para espécie, já que metabolismos diferentes são capazes de sintetizar substâncias diferentes. Por exemplo, a taurina é essencial para gatos, mas pode não ser para cães. Alguns aminoácidos podem ser produzidos a partir de outros. Os aminoácidos que contêm enxofre, metionina e homocisteína, podem ser convertidos um nos outros, mas nenhum deles pode ser sintetizado *de novo* em seres humanos. Do mesmo modo, a cisteína pode ser feita a partir de homocisteína, mas não *de novo*. Os aminoácidos contendo enxofre podem ser considerados como um único grupo de aminoácidos equivalentes nutricionalmente. Do mesmo modo, arginina, ornitina, e citrulina, que são interconvertíveis pelo ciclo da uréia, podem ser considerados como um único grupo.

Os aminoácidos essenciais para gatos incluem: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina, e taurina. A taurina é um aminoácido que é necessário para a formação adequada da bile, da saúde do olho, e da função adequada do coração.

5 Os gatos requerem uma quantidade elevada de taurina para suas funções corporais, contudo têm enzimas limitadas que podem produzir taurina a partir de outros aminoácidos tais como metionina e cisteína. Conseqüentemente, eles precisam de uma dieta rica em taurina. Se a taurina não for suficiente, sinais tais como uma condição cardíaca chamada cardiomiopatia dilatada, degeneração da retina, falha reprodutora, e desenvolvimento anormal

10 dos filhotes podem ocorrer. A maioria dos animais pode produzir o aminoácido ornitina a partir de vários processos, alguns dos quais podem requerer arginina. Em gatos, o método para produzir a ornitina é convertê-la a partir de arginina. Se gatos forem deficientes em arginina, não pode haver ornitina

15 suficiente para se ligar à amônia, e sinais severos tais como salivação, vocalização, ataxia, e até mesmo morte podem resultar dos níveis elevados de amônia. Estes sinais ocorrem freqüentemente várias horas após uma refeição, quando a maioria da amônia é produzida. A ração completa com conteúdo nutritivo elevado conforme a presente invenção pode ajudar a tratar ou

20 aliviar estes distúrbios nos animais. Qualquer um dentre lisina, metionina, triptofano ou treonina é uma adição valiosa à ração de animal de fazenda, por exemplo, ração de gado.

Uma dieta nutritiva equilibrada para uma variedade de animais domésticos é conhecida na técnica. O Committee on Animal Nutrition, National Research Council publicou várias diretrizes para facilitar aqueles versados na técnica a formular uma ração animal equilibrada. Veja, por exemplo, Nutrient Requirements of Beef Cattle: 7ª Edição revisada (2000, ISBN 0309069343), Nutritional Requirements of Swine: 10ª Edição revisada (1998, ISBN 0309059933), de Nutritional Requirements of Dairy Cattle: 7ª Edição

25 revisada (2001, ISBN 0309069971), os quais estão incorporados aqui por referência em sua totalidade.

C. Meios e condições da fermentação

O microorganismo modificado como discutido acima pode ser cultivado em um meio de fermentação para a produção de nutrientes. Um meio de fermentação adequado ou eficaz, refere-se a qualquer meio em que um microorganismo modificado da presente invenção, quando cultivado, for capaz de produzir nutrientes. Tal meio é tipicamente um meio aquoso que compreende fontes assimiláveis de carbono, nitrogênio e fosfato. Tal meio pode também incluir sais, minerais, metais, e outros nutrientes adequados. Deve-se reconhecer, entretanto, que várias condições da fermentação são adequadas e podem ser selecionadas por aqueles versados na técnica.

As fontes de carbono assimiláveis que podem ser usadas em um meio adequado de fermentação incluem, mas não são limitadas a, açúcares e seus polímeros, incluindo, dextrina, sacarose, maltose, lactose, glicose, frutose, manose, sorbose, arabinose e xilose; ácidos graxos; ácidos orgânicos tais como acetato; alcoóis primários tais como etanol e n-propanol; e polialcoóis tais como glicerina. As fontes preferidas do carbono na presente invenção incluem monossacarídeos, dissacarídeos e trissacarídeos. A fonte de carbono a mais preferida é glicose.

A concentração de uma fonte de carbono, tal como glicose, no meio de fermentação deve promover o crescimento da célula, mas não ser alta o suficiente para reprimir o crescimento do microorganismo usado. Tipicamente, as fermentações são realizadas com uma fonte de carbono, tal como glicose, sendo adicionada em níveis para se obter o nível desejado de crescimento e de biomassa. Em outras modalidades, a concentração de uma fonte de carbono, tal como glicose, no meio da fermentação é maior do que cerca de 1 g/L, preferivelmente maior do que cerca de 2 g/L, e mais preferivelmente maior do que cerca de 5 g/L. Além disso, a concentração de uma fonte de carbono, tal como a glicose, no meio de fermentação pode ser menor do que cerca de 100 g/L, menor do que cerca de 50 g/L, ou menor do que cerca de 20 g/L. Deve-se observar que as referências às concentrações de componentes da fermentação podem referir-se à inicial e/ou às concentrações de componentes iniciais ou produtos. Em alguns casos, pode ser desejável permitir que o meio de fermentação torne-se esgotado de uma fonte

de carbono durante a fermentação.

Fontes de nitrogênio assimiláveis que podem ser usadas em um meio adequado de fermentação incluem, mas não são limitadas a, fontes simples do nitrogênio, fontes orgânicas de nitrogênio, e fontes complexas de nitrogênio. Tais fontes do nitrogênio incluem amônia anidra, sais de amônio, e substâncias de origem animal, vegetal, e/ou microbiana. Fontes adequadas de nitrogênio incluem, mas não são limitadas a, hidrolisados de proteína, hidrolisados de biomassa microbiana, peptona, extrato de levedura, sulfato de amônio, uréia, e aminoácidos. Produtos de grão hidrolisado formam uma fonte adequada de nitrogênio. Tipicamente, a concentração de fontes de nitrogênio, no meio de fermentação pode ser maior do que cerca de 0,1 g/L, maior do que cerca de 0,25 g/L, ou maior do que cerca de 1,0 g/L. Além de determinadas concentrações, entretanto, a adição de uma fonte de nitrogênio ao meio de fermentação não é vantajosa para o crescimento dos microorganismos. Em conseqüência, a concentração das fontes de nitrogênio, no meio de fermentação pode ser menor do que cerca de 20 g/L, menor do que cerca de 10 g/L ou menor do que cerca de 5 g/L. Além disso, em alguns casos pode ser desejável permitir que o meio da fermentação se torne esgotado de fontes do nitrogênio durante a fermentação.

O meio eficaz de fermentação pode conter outros compostos tais como sais inorgânicos, vitaminas, metais-traço, ou promotores de crescimento. Tais outros compostos também podem estar presentes em fontes de carbono, nitrogênio ou mineral no meio eficaz ou podem ser adicionados especificamente ao meio.

O meio de fermentação também pode conter uma fonte adequada de fosfato. Tais fontes de fosfato incluem fontes inorgânicas e orgânicas de fosfato. As fontes preferidas de fosfato incluem, mas não são limitadas a, sais de fosfato tais como fosfatos de sódio e potássio mono ou dibásicos, fosfato de amônio e misturas dos mesmos. Tipicamente, a concentração de fosfato no meio de fermentação é maior do que cerca de 1,0 g/L, preferivelmente maior do que cerca de 2,0 g/L e mais preferivelmente maior do que cerca de 5,0 g/L. Além de determinadas concentrações, entretanto, a adição

de fosfato ao meio de fermentação não é vantajosa para o crescimento dos microorganismos. Conseqüentemente, a concentração de fosfato no meio de fermentação é tipicamente menor do que cerca de 20 g/L, preferivelmente menor do que cerca de 15 g/L, e mais preferivelmente menor do que cerca de 10 g/L.

Um meio adequado de fermentação pode incluir também uma fonte de magnésio, preferivelmente na forma de um sal fisiologicamente aceitável, tal como o sulfato de magnésio heptahidrato, embora outras fontes de magnésio em concentrações que contribuem com quantidades similares de magnésio possam ser usadas. Tipicamente, a concentração de magnésio no meio da fermentação é maior do que cerca de 0,5 g/L, preferivelmente maior do que cerca de 1,0 g/L, e mais preferivelmente maior do que cerca de 2,0 g/L. Além de determinadas concentrações, entretanto, a adição de magnésio ao meio de fermentação não é vantajosa para o crescimento dos microorganismos. Conseqüentemente, a concentração de magnésio no meio de fermentação é tipicamente menor do que cerca de 10 g/L, preferivelmente menor do que cerca de 5 g/L, e mais preferivelmente menor do que cerca de 3 g/L. Além disso, em alguns casos pode ser desejável permitir que o meio de fermentação se torne esgotado de uma fonte do magnésio durante a fermentação.

O meio de fermentação pode também incluir um agente quelante biologicamente aceitável, tal como o diidrato de citrato trissódico. Em tal caso, a concentração de um agente quelante no meio de fermentação é maior do que cerca de 0,2 g/L, preferivelmente maior do que cerca de 0,5 g/L, e mais preferivelmente maior do que cerca de 1 g/L. Além de determinadas concentrações, entretanto, a adição de um agente quelante ao meio de fermentação não é vantajosa para o crescimento dos microorganismos. Conseqüentemente, a concentração de um agente quelante no meio de fermentação é tipicamente menor do que cerca de 10 g/L, preferivelmente menor do que cerca de 5 g/L, e mais preferivelmente menor do que cerca de 2 g/L.

O meio de fermentação também pode incluir inicialmente um ácido ou uma base biologicamente aceitável para manter o pH desejado do

meio de fermentação. Os ácidos biologicamente aceitáveis incluem, mas não são limitados a, ácido clorídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico e misturas dos mesmos. As bases biologicamente aceitáveis incluem, mas não são limitadas a, hidróxido de amônio, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio e misturas dos mesmos.

O meio de fermentação também pode incluir uma fonte biologicamente aceitável de cálcio, incluindo, mas não limitada a, cloreto de cálcio. Tipicamente, a concentração da fonte de cálcio, tal como cloreto de cálcio, diidrato, no meio de fermentação está dentro da faixa de cerca de 5 mg/L a 10 mg a cerca de 2000/L, preferivelmente dentro da faixa de cerca de 20 mg/L a cerca de 1000 mg/L, e mais preferivelmente na faixa de cerca de 50 mg/L a cerca de 500 mg/L.

O meio de fermentação também pode incluir cloreto de sódio. Tipicamente, a concentração de cloreto de sódio no meio de fermentação está dentro da faixa de cerca de 0,1 g/L a cerca de 5 g/L, preferivelmente dentro da faixa de cerca de 1 g/L a cerca de 4 g/L, e mais preferivelmente na faixa de cerca de 2 g/L a cerca de 4 g/L.

O meio de fermentação também pode incluir metais-traço. Tais metais-traço podem ser adicionados ao meio de fermentação como uma solução estoque que, por conveniência, pode ser preparada separadamente do resto do meio de fermentação. Tipicamente, a quantidade de tal solução dos metais-traço adicionada ao meio da fermentação é maior do que cerca de 1 ml/L, preferivelmente maior do que cerca de 5 ml/L, e mais preferivelmente maior do que cerca de 10 ml/L. Além de determinadas concentrações, entretanto, a adição de metais-traço ao meio da fermentação não são vantajosos para o crescimento dos microorganismos. Conseqüentemente, a quantidade de tal solução dos metais-traço adicionada ao meio de fermentação é tipicamente menor do que cerca de 100 ml/L, preferivelmente menor do que cerca de 50 ml/L, e mais preferivelmente menor do que cerca de 30 ml/L. Deve-se observar que, além de adicionar metais-traço em uma solução estoque, os componentes individuais podem ser adicionados separadamente cada um dentro das faixas que correspondem independentemente às quan-

tidades dos componentes ditadas pelas faixas acima da solução dos metais-traço.

Uma solução adequada de metais-traço pode incluir, mas não é limitada ao selenato de sódio; sulfato ferroso; heptaidrato; sulfato cúprico, pentaidrato; sulfato de zinco, heptaidrato; molibdato de sódio, diidrato; cloreto de cobalto; solução de selênio ou de cromo; hexaidrato; e monoidrato de sulfato do manganês. O ácido clorídrico pode ser adicionado à solução estoque para manter os sais de metal-traço em solução.

O meio de fermentação também pode incluir vitaminas. Tais vitaminas podem ser adicionadas ao meio de fermentação como uma solução estoque que, por conveniência, pode ser preparada separadamente do resto do meio de fermentação. Tipicamente, a quantidade de tal solução de vitamina adicionada ao meio de fermentação é maior do que 1 ml/L, preferivelmente maior de 5 ml/L e mais preferivelmente maior de 10 ml/L. Além de determinadas concentrações, entretanto, a adição das vitaminas ao meio de fermentação não é vantajosa para o crescimento dos microorganismos. Conseqüentemente, a quantidade de tal solução da vitamina adicionada ao meio de fermentação é tipicamente menor do que cerca de 50 ml/L, preferivelmente menor do que 30 ml/L e mais preferivelmente menor do que 20 ml/L. Deve-se notar que, além de adicionar vitaminas em uma solução estoque, os componentes individuais podem ser adicionados separadamente cada um dentro das faixas que correspondem independentemente às quantidades dos componentes ditadas pelas faixas acima da solução estoque de vitamina. Uma solução de vitamina adequada pode incluir, mas não é limitada a, biotina, pantotenato de cálcio, inositol, HCl de piridoxina e HCl de tiamina.

O meio de fermentação pode também incluir esteróis. Tais esteróis podem ser adicionados ao meio de fermentação como uma solução conservada em estoque que é preparada separadamente do resto do meio de fermentação. As soluções estoque do esteroide podem ser preparadas usando um detergente para auxiliar na solubilização do esteroide. Tipicamente, uma quantidade de solução estoque de esteroide é adicionada ao meio de fer-

mentação tal que a concentração final de esterol no meio de fermentação está dentro da faixa de cerca de 1 mg/L a 3000 mg/L, preferivelmente dentro da faixa de cerca de 2 mg/L a mg 2000/L, e mais preferivelmente dentro da faixa de cerca de 5 mg/L a 2000 mg /L.

5 Os microorganismos da presente invenção podem ser cultivados por modos de fermentação convencionais, que incluem, mas não são limitados a, batelada, batelada alimentada, reciclagem de célula, e contínua. Em um modo de batelada alimentada, quando durante a fermentação alguns dos componentes do meio são esgotados, pode ser possível iniciar a fermentação com concentrações relativamente altas de tais componentes de modo que o crescimento seja suportado por um período de tempo antes que as adições sejam necessárias. As faixas preferidas destes componentes são mantidas durante toda a fermentação por fazer adições conforme os níveis são esgotados pela fermentação. Os níveis dos componentes no meio de fermentação podem ser monitorados, por exemplo, por amostrar o meio de fermentação periodicamente e testar as concentrações. Alternativamente, uma vez que um procedimento de fermentação padrão é desenvolvido, as adições podem ser feitas em intervalos programados que correspondem a níveis conhecidos em momentos particulares durante toda a fermentação. As adições ao fermentador podem ser feitas sob o controle de um computador em resposta às condições do fermentador ou por uma programação pré-programada. Além disso, para evitar a introdução de microorganismos estranhos no meio de fermentação, a adição é executada usando métodos de adição assépticos, como é conhecido na técnica. Além disso, uma pequena quantidade de agente antiespumante pode ser adicionada durante a fermentação, ou dispositivo antiespumante pode ser empregado. Os fermentadores podem ser de qualquer tamanho, por exemplo, pelo menos 1 L, pelo menos 10 L, pelo menos 100 L, pelo menos 1000 L, pelo menos 10.000 L, pelo menos 50.000 L ou pelo menos 100.000 L. Muitos fermentadores comerciais têm capacidade de mais do que 25.000 L.

A temperatura do meio de fermentação pode ser qualquer temperatura adequada para o crescimento e a produção dos nutrientes da pre-

sente invenção. Por exemplo, antes da inoculação do meio de fermentação com um inóculo, o meio de fermentação pode ser trazido e mantido em uma temperatura na faixa de cerca de 20°C a cerca de 45°C, preferivelmente para uma temperatura na faixa de cerca de 25°C a cerca de 40°C, e mais preferivelmente na faixa de cerca de 28°C a cerca de 32°C.

O pH do meio de fermentação pode ser controlado pela adição de ácido ou base ao meio de fermentação. Em tais casos quando amônia é usada para controlar o pH, ela também serve convenientemente como uma fonte de nitrogênio no meio de fermentação. Preferivelmente, o pH é mantido de cerca de 3,0 a cerca de 8,0, mais preferivelmente de cerca de 3,5 a cerca de 7,0, e o mais preferivelmente de cerca de 4,0 a cerca de 6,5.

O meio de fermentação pode também ser mantido para ter um conteúdo dissolvido de oxigênio durante a fermentação para manter o crescimento da célula e para manter o metabolismo da célula para a produção dos nutrientes. A concentração de oxigênio do meio de fermentação pode ser monitorada usando métodos conhecidos, como através do uso de um eletrodo de oxigênio. O oxigênio pode ser adicionado ao meio de fermentação usando métodos conhecidos na técnica, através de agitação e aeração do meio por agitar, sacudir ou borrifar. Preferivelmente, a concentração de oxigênio em um meio de fermentação aeróbica pode estar na faixa de cerca de 20% a cerca de 100% do valor de saturação de oxigênio no meio baseado na solubilidade de oxigênio no meio de fermentação em pressão atmosférica e em uma temperatura na faixa cerca de 20°C a cerca de 40°C. Reduções periódicas na concentração de oxigênio abaixo desta faixa podem ocorrer durante a fermentação, entretanto, sem afetar adversamente a fermentação.

Embora a aeração do meio tenha sido descrita aqui em relação ao uso de ar, outras fontes de oxigênio podem ser usadas. Particularmente útil é o uso de um gás de aeração que contém uma fração do volume do oxigênio maior do que a fração de volume de oxigênio no ar ambiental. Adicionalmente, tais gases de aeração podem incluir outros gases que não afetam negativamente a fermentação. Em algumas modalidades, a fermentação é

executada sob condições bem estabelecidas na técnica.

O meio de fermentação pode ser inoculado com uma cultura de microorganismos da presente invenção em crescimento ativo em uma quantidade suficiente para produzir, após um período de crescimento razoável, uma densidade elevada de células. As densidades celulares típicas de inoculação estão dentro da faixa de cerca de 0,01 g/L a cerca de 10 g/L, preferivelmente de cerca de 0,2 g/L a cerca de 5 g/L e mais preferivelmente de cerca de 0,05 g/L a cerca de 1,0 g/L, com base no peso seco das células. Em fermentadores de escala de produção, entretanto, densidades celulares maiores do inóculo são preferidas. As células são então cultivadas para uma densidade celular na faixa de cerca de 10 g/L a cerca de 100 g/L preferivelmente de cerca de 20 g/L a cerca de 80 g/L, e mais preferivelmente de cerca de 50 g/L a cerca de 70 g/L. Os tempos de residência para os microorganismos alcançarem as densidades celulares desejadas durante a fermentação são tipicamente de menos do que cerca de 200 horas, preferivelmente menos do que cerca de 120 horas, e mais preferivelmente menos do que cerca de 96 horas.

Em uma modo de operação da presente invenção, a concentração da fonte de carbono, tal como a concentração de glicose, do meio de fermentação é monitorada durante a fermentação. A concentração de glicose do meio de fermentação pode ser monitorada usando técnicas conhecidas, como, por exemplo, uso do teste da enzima glicose oxidase ou de cromatografia líquida de alta pressão, os quais podem ser usados monitorar a concentração de glicose no sobrenadante, por exemplo, um componente livre de célula do meio de fermentação. Como indicado previamente, a concentração da fonte de carbono deve ser mantida abaixo do nível em que a inibição do crescimento celular ocorre. Embora tal concentração possa variar de organismo para organismo, tipicamente para glicose como uma fonte de carbono, a inibição do crescimento celular pode ocorrer em concentrações de glicose maiores do que em cerca de 60 g/L, e pode ser facilmente determinada por experimentação. A concentração de glicose no meio de fermentação é mantida na faixa de cerca de 1 g/L a cerca de 100 g/L, mais preferi-

velmente na faixa de cerca de 2 g/L a cerca de 50 g/L, e ainda mais preferi-  
velmente na faixa de cerca de 5 g/L a cerca de 20 g/L embora a concentra-  
ção da fonte de carbono possa ser mantida dentro de níveis desejados pela  
adição de, por exemplo, uma solução substancialmente pura de glicose, é  
5 aceitável, e pode ser preferido, manter a concentração da fonte de carbono  
do meio de fermentação pela adição de alíquotas do meio de fermentação  
original. O uso de alíquotas do meio de fermentação original pode ser dese-  
jável porque as concentrações de outros nutrientes no meio (as fontes, por  
exemplo, de nitrogênio e fosfato) podem ser mantidas simultaneamente. Do  
10 mesmo modo, as concentrações de metais-traço podem ser mantidas no  
meio de fermentação pela adição de alíquotas da solução dos metais-traço.

D. Revestimento e modificação estrutural dos nutrientes

O microorganismo modificado enriquecido nutricionalmente pode  
ainda ser tratado para facilitar a passagem pelo rúmen. O peptídeo ou a pro-  
15 teína devem escapar da degradação ruminal e passar para o intestino del-  
gado para fornecer quantidades suficientes de aminoácidos. Métodos preli-  
minares desenvolvidos para impedir a digestão fermentativa de aminoácidos  
incluem (1) revestimento de um produto que tem um conteúdo aumentado  
de aminoácido com uma composição que protege o produto da degradação  
20 no rúmen e/ou (2) manipulação estrutural do aminoácido para produzir aná-  
logos de aminoácido que demonstram degradação reduzida no rúmen.

As proteínas com estrutura secundária ou terciária significativa  
(por exemplo, ligações de dissulfeto) podem apresentar melhor proteção do  
rúmen. Além de fornecer uma fonte de aminoácidos essenciais para a ração  
25 do ruminante, uma proteína rica em aminoácido essencial pode assemelhar-  
se intimamente às proteínas "ricas em aminoácido essencial" que estão pre-  
sentes na farinha de sangue. Por exemplo, a farinha de sangue pode incluir  
a cadeia de alfa hemoglobina de porco. Apenas como exemplo, um peptídeo  
ou proteína rica em aminoácido essencial em um microorganismo modifica-  
30 do pode ser revestido com os compostos poliméricos, ou ser polimerizados,  
com proteína, gordura, misturas de gordura e cálcio, misturas da gordura e  
proteína, e com os sais de metal de ácidos graxos de cadeia longa. O peptí-

deo ou proteína rica em aminoácido essencial pode também ser revestida com polímeros sensíveis ao pH. Um polímero sensível ao pH é estável no pH ruminal, mas desnatura quando é exposto ao pH do abomaso, liberando o peptídeo ou a proteína para digestão nos abomasos e absorção no intesti-

5 no delgado. Como tais, aminoácidos livres podem ser revestidos para fornecer proteção da degradação no rúmen. O aminoácido essencial ou o peptídeo ou proteína rico em aminoácido essencial podem ser reagidos com um ou mais carboidratos redutores (por exemplo, xilose, lactose, glicose, e similares).

10 Os nutrientes podem ser revestidos com uma variedade de materiais de revestimento. Por exemplo, óleos vegetais (tais como óleo de feijão de soja), uma mistura de um composto hidrofóbico, de elevado ponto de fusão e um lipídio. A combinação de um ou mais compostos hidrofóbicos de elevado ponto de fusão (por exemplo, sais minerais de ácidos graxos, tais

15 como estearato de zinco de classe comercial) com um ou mais tipos de lipídio forma um material de revestimento que pode proteger o conteúdo e a funcionalidade do(s) ingrediente(s) revestido(s). Estes revestimentos podem ser formulados para satisfazer as necessidades das condições de proces-

20 samento em alta temperatura e pressão assim como proteção da carga de aminoácido do ambiente microbiano do rúmen. Revestimentos adequados são descritos de patente U.S. Nº 2003/0148013, que está incorporada aqui por referência em sua totalidade. Os compostos hidrofóbicos de elevados ponto de fusão têm tipicamente um ponto de fusão de pelo menos cerca de 70°C, e mais desejavelmente, maior do que 100°C. Em particular, sais de

25 zinco de ácidos graxos, que têm um ponto de derretimento entre cerca de 115°C e 130°C, são compostos hidrofóbicos de elevado ponto de fusão adequados.

O componente de lipídio tem tipicamente um ponto de fusão de pelo menos cerca de 0°C e mais adequadamente não menos do que cerca

30 de 40°C. O componente de lipídio pode incluir óleo vegetal, tal como o óleo de soja. Em outras modalidades, o componente de lipídio pode ser um triacilglicerol com um ponto de fusão de cerca de 45 a 75°C. Ácido esteárico de

classe comercial pode ser selecionado como um lipídio representativo de um grupo que inclui mas não é limitado a: ácido esteárico, gordura animal hidrogenada, gordura animal (por exemplo, sebo animal), óleo vegetal, (tal como óleo vegetal bruto e/ou óleo vegetal hidrogenado, parcialmente ou completamente hidrogenado), lecitina, ácido palmítico, óleos animais, cera, ésteres de ácidos graxos ( $C_8$  a  $C_{24}$ ), ácidos graxos ( $C_8$  a  $C_{24}$ ). O revestimento pode estar presente no produto revestido em uma quantidade de 1 a 2000% em peso, em relação ao peso do ingrediente revestido. Geralmente, o revestimento representa cerca de 15 a 85% em peso, em relação ao peso do ingrediente revestido. Mais geralmente, o revestimento representa cerca de 20 a 60% em peso e/ou 30 a 40% em peso, em relação ao peso do ingrediente revestido. O revestimento pode ser preparado a partir de mistura hidrofóbica. O revestimento pode incluir um tensoativo.

O revestimento pode usar um ou mais compostos hidrofóbicos insolúveis combinados com um lipídio. Por exemplo, estearato de zinco de grau comercial é extremamente hidrofóbico e completamente insolúvel em água. A adição de estearato de zinco de grau comercial à fórmula de revestimento pode melhorar o nível de proteção do ingrediente e sua funcionalidade, de forma significativa quando comparado a um revestimento apenas de lipídio. Por exemplo, por combinar estearato de zinco com um lipídio um tanto insolúvel tal como ácido esteárico de grau comercial, o composto de revestimento pode fornecer melhor proteção de lixiviação (isto é, perda do ingrediente ativo do produto revestido), quando o produto revestido está em um meio aquoso. Como tal, o benefício da presente composição de revestimento pode ser utilizado em rações feitas para ruminantes para passar pelo rúmen e liberar o ingrediente ativo no intestino delgado.

Além de facilitar a passagem pelo rúmen, o revestimento também pode ser útil para proteger os nutrientes revestidos contra o calor e pressão sofridas durante o processo de fabricação (peletização e extrusão). A composição de revestimento pode ser útil em todos os tipos de processos de produção onde calor é aplicado e ingredientes suscetíveis do calor são usados. Ingredientes que podem se beneficiar desta forma de proteção são

os ingredientes que são submetidos a dano ou degradação por calor, tais como aminoácidos, proteínas, enzimas, vitaminas, pigmentos e "attractants". Além de proteger os ingredientes do dano ou perda relacionada ao calor, também há a necessidade de proteger os ingredientes de dano ou perda atribuível à associação ou reação química com outros ingredientes. O método de encapsulamento pode impedir a associação prejudicial, ou reações com outros ingredientes, ou oxidação. Como tal, o método do encapsulamento fornece a habilidade de pré-empacotar ou combinar ingredientes em uma formulação, onde os ingredientes seriam geralmente empacotados individualmente.

A composição de revestimento pode ser preparada de várias maneiras. Preferivelmente, o processo de preparação inclui fazer uma solução sólida do componente de sal orgânico de zinco e do componente de lipídio. Em uma modalidade, o sal orgânico de zinco e o componente de lipídio podem ser derretidos até que ambos se dissolvam e formem uma solução. A solução pode então ser deixada solidificar para formar uma solução sólida. Além do componente de ácido orgânico de zinco e do componente de lipídio, o revestimento pode incluir outros ingredientes. Por exemplo, o revestimento pode incluir um ou mais agentes emulsificantes tais como glicerina, polissacarídeos, lecitina, agentes de gelificação, e sabões, os quais podem melhorar a velocidade e a eficácia do processo de encapsulamento. Adicionalmente, o revestimento pode incluir um antioxidante para fornecer proteção melhorada contra os efeitos da oxidação. Além disso, a composição de revestimento pode incluir outros componentes que podem ou não se dissolver no processo de formação da solução sólida. Por exemplo, a composição de revestimento pode incluir pequenas quantidades de óxido de zinco e outros elementos ou compostos.

Um revestimento adequado pode ser preparado a partir de um óleo vegetal parcialmente hidrogenado tal como o óleo de soja. Outros óleos vegetais adequados, que são pelo menos parcialmente hidrogenados, incluem óleo de palma, óleo de semente de algodão, óleo de milho, óleo de amendoim, óleo de semente de palma, óleo de babaçu, óleo de girassol, óleo

de açafroa, e misturas das mesmas. Um revestimento adequado pode ser preparado a partir de uma mistura que inclui um óleo vegetal parcialmente hidrogenado e constituintes adicionais, tal como uma cera. Ceras adequadas incluem cera de abelha, cera de petróleo, cera de farelo de arroz, cera de 5 rícino, cera microcristalina, e misturas disso. Em algumas modalidades, um revestimento adequado é preparado a partir de uma mistura que inclui cerca de 85 a 95% (preferivelmente cerca de 90%) de óleo vegetal parcialmente hidrogenado e cerca de 5 a 15% (preferivelmente cerca de 10%) de cera. O revestimento pode incluir um agente para modificar a densidade do substrato 10 revestido, por exemplo, um tensoativo, tal como polissorbato 60, polissorbato 80, propileno glicol, dioctilsulfossuccinato de sódio, lauril sulfato de sódio, ésteres lactílicos de ácidos graxos, ésteres de poliglicerol de ácidos graxos, e misturas dos mesmos.

Um substrato revestido (ou substrato pré-revestido) pode ser 15 preparado por pulverizar uma mistura hidrofóbica que inclui um óleo vegetal parcialmente hidrogenado (85% a 95%) e uma cera (5% a 15%) sobre um substrato que inclui o L-His e/ou uma proteína rica em histidina. Opcionalmente, um substrato pré-revestido pode ainda ser revestido por pulverizar a superfície do substrato pré-revestido com um tensoativo para formar um 20 substrato revestido. O substrato revestido pode ter a seguinte composição: substrato (40 a 80%); mistura hidrofóbica (20 a 60%); tensoativo (0 a 40%) (opcional). O substrato revestido pode ter uma gravidade específica de cerca de 0,3 a 2,0 (mais adequadamente cerca de 1,3 a 1,5). Em uma modalidade, o substrato revestido inclui: cerca de 50% de substrato; cerca de 35% de 25 mistura hidrofóbica; e cerca de 15% de tensoativo. O substrato revestido pode ser preparado por pré-revestir o substrato com uma mistura hidrofóbica, e subseqüentemente revestir o substrato pré-revestido com um tensoativo.

Depois que a composição de revestimento é preparada, ela pode 30 então ser usada para preparar o nutriente protegido. Um procedimento adequado para preparar o ingrediente protegido usa a tecnologia de encapsulamento, preferivelmente tecnologia de microencapsulamento. O microencap-

5 sulamento é um processo pelo qual pequenas quantidades de gás, líquido, ou ingredientes sólidos são incluídos ou envolvidos por um segundo material, neste caso uma composição de revestimento, para proteger o ingrediente do ambiente circundante. Vários processos de microencapsulamento podem ser usados para preparar o ingrediente protegido tal como disco giratório, pulverização, co-extrusão, e outros métodos químicos tais como a coacervação complexa, separação de fase, e gelatinização. Um método adequado e microencapsulamento é o método de disco rotatório. No método de disco rotatório, uma emulsão e/ou suspensão do ingrediente ativo e da composição de revestimento é preparada e alimentada por gravidade à superfície de um disco rotatório aquecido. Enquanto o disco gira, a emulsão/suspensão se espalha ao longo da superfície do disco para formar uma fina camada por causa das forças centrífugas. Na borda do disco, a emulsão/suspensão é cisalhada em gotas distintas nas quais o ingrediente ativo está envolvido pelo revestimento. Conforme as gotas caem do disco para um funil de coleta, as gotas esfriam para formar um ingrediente microencapsulado (isto é, um produto revestido). Pelo fato da emulsão ou suspensão não ser expelida através dos orifícios, esta técnica permite o uso de um revestimento de viscosidade mais elevada e permite um carregamento maior de ingrediente no revestimento. O encapsulamento dos ingredientes para o uso nas rações animais é descrito na Publicação de Patente U.S. Nº 2003/0148013, que está incorporada aqui por referência em sua totalidade.

25 Aminoácidos (tal como histidina) e/ou proteínas (tais como proteínas ricas em histidina) também podem ser alterados quimicamente para proteger o aminoácido no rúmen e para aumentar a oferta de aminoácidos específicos fornecidos ao abomaso e ao intestino delgado. Por exemplo, a metionina hidroxila análoga (MHA) tem sido usada como um suplemento de aminoácido. Além disso, os aminoácidos podem ser fornecidos como quelatos de aminoácido/mineral. Complexos de zinco-metionina e zinco-lisina têm sido usados como suplementos de aminoácido.

E. Necessidade de aminoácido

Na formulação de dieta para um mamífero, uma contribuição

prevista de aminoácidos microbianos digeríveis a partir da fermentação do rúmen é subtraída das necessidades de aminoácido do animal, conforme determinado pelo perfil do animal. A quantidade de aminoácidos que precisa ser fornecida como aminoácido essencial não-degradável (UEAA) a partir da

5 ração é a diferença entre as necessidades de aminoácido do animal e os aminoácidos fornecidos pelos aminoácidos microbianos digeríveis. O perfil de aminoácidos do leite pode ser comparado ao perfil dos aminoácidos produzidos por microorganismos modificados dentro do trato digestivo do animal (isto é, perfil de aminoácido microbiano). As diferenças entre os perfis de

10 aminoácido microbiano e do leite indicam os aminoácidos que podem estar em excesso ou restrição. Entretanto, esta comparação de perfil de aminoácido fornece somente parte da informação necessária a fim de aumentar a produção de um produto animal escolhido. A eficiência com a qual o corpo incorpora aminoácidos no intestino delgado em um produto animal escolhido

15 também pode ser considerada. Por determinar a relação do perfil de saída/entrada do aminoácido e por determinar a eficiência da incorporação, as necessidades de aminoácidos digeríveis do leite podem ser determinadas. Foi estabelecido que histidina, lisina, metionina, fenilalanina, e treonina são prováveis aminoácidos limitantes para a produção de leite em vacas leiteiras. Uma determinação similar pode ser executada para o perfil de amino-

20 ácidos do músculo.

Os aminoácidos necessários nas rações para vacas leiteiras são chamados Aminoácidos Digeríveis do Leite (“ddAA”). A soma do aminoácido microbiano digerível mais a concentração de aminoácido essencial não-

25 degradada no rúmen digerível (UEAA) desse mesmo aminoácido é o ddAA. Os Aminoácidos Digeríveis do Leite representam o suprimento de AA digerível total para o intestino delgado. As necessidades de aminoácidos totais de um animal leiteiro podem ser determinadas como segue. A quantidade total de um aminoácido necessário (“TAAR”) é igual à quantidade necessária para

30 a manutenção ( “Aminoácido de Manutenção” ou “MAA”) mais a quantidade, do aminoácido necessária para a produção de leite (“Saída de Aminoácido do Leite” ou “MAAO”) mais a quantidade do aminoácido necessária para o

crescimento ("Aminoácido de Crescimento" ou "GAA") (isto é,  $TA-AR=MAA+MAAO+GAA$ ).

Aminoácidos limitantes podem ser fornecidos a um animal para aumentar a produção de um produto animal escolhido (por exemplo, leite) por suplementar a ração animal com o aminoácido limitante. Aminoácidos limitantes podem ser identificados por analisar o perfil de aminoácido do produto animal escolhido (isto é, perfil de saída) e comparar este perfil ao perfil de aminoácidos fornecidos ao animal (isto é, perfil de entrada). Métodos para determinar as necessidades de aminoácido são conhecidos na técnica e descritos na Patente U.S. Nº 5.145.695 e Patente U.S. Nº 5.219.596, as quais estão incorporadas aqui por referência em suas totalidades. Por exemplo, o perfil de aminoácido do leite pode ser comparado ao perfil de aminoácidos produzidos por micróbios dentro do trato digestivo do animal (isto é, perfil de aminoácido microbiano). As diferenças entre os perfis de aminoácido microbiano e do leite indicam onde os aminoácidos podem estar em excesso ou restrição.

Alternativamente, os resíduos de fermentação deixados pela fermentação de microorganismos geneticamente modificados ou não-modificados podem ser suplementados com os nutrientes exogenamente (isto é, com nutrientes além daqueles já produzidos pelos microorganismos) para aumentar seu valor nutritivo e, portanto, seu valor comercial. Isto permite que se balanceie o conteúdo nutricional de resíduos de fermentação que pode ser deficiente em um ou mais nutrientes

#### IV. MÉTODOS COMERCIAIS

A presente invenção fornece métodos comerciais para desenvolver e avaliar processos e produtos para aumentar o valor de subprodutos do milho-ao-etanol, tais como grãos secos de destilador. Isso é conseguido por usar microorganismos modificados para melhorar o conteúdo nutricional destes subprodutos formados na produção do etanol para formar ração animal enriquecida com nutriente e outros produtos de valor adicionado, assim aumentando a economia da produção de etanol. A indústria do etanol representa o terceiro mercado o maior para o milho dos Estados Unidos. A produ-

ção de etanol combustível é uma parte integrante do desenvolvimento econômico rural, da melhoria ambiental, e do comércio de gasolina. O método comercial da invenção fornece subprodutos valiosos na forma da ração completa enriquecida nutricionalmente que adicionaria valor comercial significativo à indústria de fermentação do etanol.

As economias agrícolas e rurais têm sofrido com os efeitos de preços baixos das mercadorias. Falando de forma geral, o preço de muitas mercadorias agrícolas recebido pelo fazendeiro tem estado abaixo do custo de produção. Esta situação fez com que muitos fazendeiros saíssem do negócio o que, por sua vez, causou o colapso de muitas economias rurais. Além disso, a segurança energética dos Estados Unidos se tornou instável porque os Estados Unidos importam, cada vez mais, grandes quantidades de petróleo. Adicionalmente, a economia dos Estados Unidos sofre quando a disponibilidade, e assim o custo, do petróleo importado flutua acentuadamente. A ração completa da presente invenção ajuda a estabelecer subprodutos de valor adicionado obtidos a partir da produção de etanol, os quais ajudariam a sustentar o desenvolvimento da indústria doméstica de bioetanol, fornecer rendimentos aumentados e sustentáveis em economias rurais, desenvolver novos produtos bio-baseados que substituirão os produtos feitos atualmente a partir do petróleo, e aumentar a produção doméstica de energia renovável que, por sua vez, pode melhorar a segurança energética dos Estados Unidos. O consumidor e o público em geral podem se beneficiar da presente invenção através da estabilização da disponibilidade do combustível assim como do preço da gasolina na bomba. Já que a ração completa enriquecida nutricionalmente é feita de mercadorias agrícolas, a presente invenção irá melhorar também as economias rurais e agrícolas, e preservar a qualidade do ar e da água.

Um aspecto da invenção refere-se a um método comercial de aumentar valor do rendimento de uma fábrica de fermentação, por executar uma reação de fermentação com o uso de um microorganismo modificado; e comercializar ou vender um ou mais dos produtos da reação de fermentação que compreendem o microorganismo modificado. O microorganismo é modi-

ficado de tal maneira que o microorganismo modificado tem seu conteúdo nutricional aumentado. O microorganismo modificado é enriquecido em nutrientes tais como, apenas como exemplo, gorduras, ácidos graxos, lipídios tais como fosfolipídio, vitaminas, aminoácidos essenciais, peptídeos, proteínas, carboidratos, esteróis, enzimas, e minerais-traço tais como, ferro, cobre, zinco, manganês, cobalto, iodo, selênio, molibdênio, níquel, flúor, vanádio, estanho e silicone. Um outro aspecto da presente invenção é um método comercial de aumentar o valor de rendimento de uma fábrica de fermentação, por executar uma reação de fermentação usando material contendo carbono na presença de um microorganismo modificado para gerar os resíduos de fermentação que têm um valor comercial mais elevado do que se a reação de fermentação fosse executada na ausência dos microorganismos modificados. Os resíduos de fermentação enriquecidos em nutrientes levam a rações animais completas que contêm um conteúdo nutricional elevado. Os resíduos de fermentação preferíveis produzidos de acordo com a presente invenção têm um valor comercial maior do que o resíduos de fermentação convencionais. Por exemplo, os resíduos de fermentação podem incluir aumento de sólidos secos tais como DDGS conteúdo de aminoácido e outro nutriente melhorado.

A composição dos resíduos de fermentação enriquecidos em nutrientes da presente invenção difere daquela de DDG e de outros subprodutos de destilador produzidos a partir do processo de produção tradicional de etanol com moagem seca, os quais são obtidos através da fermentação do amido presente no milho inteiro triturado sem os microorganismos modificados em questão. Os resíduos de fermentação enriquecidos com nutrientes desta invenção podem ter um conteúdo de nutriente pelo menos de cerca de 1% a cerca de 95% em peso. O conteúdo de nutrientes está preferivelmente na faixa de pelo menos cerca de 10% a 20%, 20% a 30%, 30% a 40%, 40% a 50%, 50% a 60%, e 60% a 70% em peso.

Em algumas modalidades do método comercial, a composição de ração compreende pelo menos cerca de 15% de resíduos de fermentação em peso. Em modalidades adequadas, a composição de ração compre-

ende pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, ou pelo menos cerca de 75%. Geralmente, a  
5 composição de ração compreende pelo menos cerca de 20% de resíduos de fermentação em peso. Mais geralmente, a composição de ração compreende pelo menos cerca de 15 a 25%, 25 a 20%, 20 a 25%, 30% a 40%, 40% a 50%, 50% a 60%, ou 60% a 70% pelo peso dos resíduos de fermentação. As composições de ração podem adicionalmente conter outros nutrientes,  
10 sabores, aromas, conservantes etc. A ração animal pode também ser customizada para um animal específico com necessidades de nutrientes específicas.

A venda do grão do destilador é uma parte importante da rentabilidade total e é crucial para o crescimento da indústria do etanol. A comercialização eficaz do grão de destilador como ração animal seria essencial  
15 para manter a eficiência e a rentabilidade das fábricas de etanol. A ração animal pode ser usada para qualquer organismo que pertença ao reino Animalia e inclui, sem limitação, aves domésticas, gado, suínos, cabra, carneiros, gato, cão, rato, aquicultura, cavalo, e etc. O conteúdo de nutriente da  
20 ração animal pode ser modificado por modificar os microorganismos de tal maneira que os microorganismos produzam certos nutrientes particulares para um animal para o qual a ração é feita. Portanto, as rações animais podem ser feitas para o animal específico com nutrientes específicos, fornecendo uma parcela inteira do mercado de rações animais e assim aumentando o valor comercial da ração. Assim, o método comercial descrito aqui  
25 de comercializar ou vender um ou mais dos produtos da reação de fermentação que compreende o microorganismo modificado, aumentaria o valor de rendimento de uma fábrica de fermentação.

Em algumas modalidades do método comercial, o aumento no  
30 valor do rendimento é conseguido sem diminuir substancialmente a quantidade de produtos de fermentação que são produzidos pela reação da fermentação. O aumento na produção do componente nutricional pelos micro-

organismos modificados pode ser induzido em um momento em que a fermentação tiver substancialmente terminado, preferivelmente pelo menos cerca de 50% do término, mais preferivelmente pelo menos cerca de 70% do término, mais preferivelmente cerca de 90% do término. Tal regulação permite a produção de resíduos de fermentação com valor nutritivo aumentado sem sacrificar a quantidade de produtos de fermentação tais como alcoóis e subprodutos gasosos. O término da reação da fermentação pode ser monitorado por medir o conteúdo de glicose no meio de fermentação ou medir os produtos gasosos tais como o dióxido de carbono.

5  
10                Em uma modalidade do método comercial, os resíduos de fermentação têm uma vida útil que é mais longa do que aquela de um resíduo de fermentação é sejam deficientes no dito microorganismo modificado. Os resíduos de fermentação como tais podem ser transportados de um local de fabricação para um local de armazenamento e ainda para um local de venda. Em qualquer local, ele pode ser vendido como é, ou ser misturado para fazer uma ração animal completa, cuja ração completa pode compreender resíduos de fermentação, outro nutrientes, conservantes, sabores, e/ou os aromas etc. A vida útil dos resíduos de fermentação pode ser aumentada pelo uso de microorganismos modificados enriquecidos com nutriente que podem ser modificados de tal maneira que a vida útil do resíduos de fermentação é maior. Por exemplo, os microorganismos podem ser modificados de tal maneira que o microorganismo modificado faça um composto que serve como conservante. A vida útil do resíduo de fermentação também pode ser aumentada por empregar um processo de fermentação que produz resíduos de fermentação que permanecem intactos em diferentes condições de clima, umidade, temperatura. Este processo pode incluir produzir resíduos de fermentação como sólidos secos que têm menor conteúdo de umidade e por isso, são estáveis em condições climáticas quentes. A vida útil dos resíduos de fermentação pode ainda ser aumentada por embalar, armazenar e transportar os resíduos de fermentação de tal maneira que os resíduos de fermentação permaneçam intactos.

Em algumas modalidades do método comercial, os microorga-

nismos são modificados de tal maneira que eles são enriquecidos em nutrientes tais como aminoácidos, preferivelmente aminoácidos essenciais e/ou limitantes. Aminoácidos limitantes podem ser fornecidos a um animal para aumentar a produção de um produto animal escolhido (por exemplo, leite) por suplementar a ração do animal com o aminoácido limitante. Aminoácidos limitantes podem ser identificados por analisar o perfil de aminoácido do produto animal escolhido (isto é, perfil de saída) e comparar este perfil ao perfil dos aminoácidos fornecidos ao animal (isto é, perfil de entrada). Por exemplo, os gatos requerem uma quantidade elevada de taurina para suas funções corporais, contudo eles têm enzimas limitadas que podem produzir taurina a partir de outros aminoácidos tais como metionina e cisteína. Conseqüentemente, eles precisam de uma dieta rica em taurina. Se a taurina estiver escassa, sinais tais como uma condição cardíaca chamada cardiomiopatia dilatada, degeneração da retina, deficiência reprodutora e desenvolvimento anormal dos filhotes podem ocorrer. A ração completa da invenção que contém microorganismos modificados com conteúdo nutricional elevado pode ajudar a tratar ou aliviar estas desordens nos animais. Portanto, as rações animais completas da presente invenção não podem apenas ser feitas para animais diferentes mas também podem ser feitas para animais deficientes em um determinado nutriente ou os animais que estão sofrendo de um ou de mais distúrbios relacionados aos níveis dos nutrientes no corpo.

Embora as modalidades preferidas da presente invenção tenham sido mostradas e descritas aqui, será óbvio para aqueles versados na técnica que tais modalidades são fornecidas apenas como exemplo. Várias alterações, mudanças, e substituições serão agora sugeridas para aqueles versados na técnica sem desconsiderar a invenção. Deve ser compreendido que várias alternativas às modalidades da invenção descrita aqui podem ser empregadas na prática da invenção. Pretende-se que as reivindicações a seguir definam o escopo da invenção e que os métodos e estruturas dentro do escopo destas reivindicações e seus equivalentes estejam, desse modo, cobertos.

(iv) EXEMPLOS

Construção de vetores de expressão:

Um vetor de expressão adequado para produzir uma seqüência exógena em um microorganismo tal como uma célula de levedura é construído de acordo com técnicas recombinantes usuais. O vetor compreende um operon de replicação capaz da replicação em célula de levedura, uma seqüência exógena de interesse que é operativamente ligada a uma seqüência regulatória que controla a expressão. O vetor é feito opcionalmente replicável em procariotos (isto é, um vetor "shuttle") tal como uma bactéria para facilitar a clonagem. Além disso, o vetor compreende uma seqüência regulatória tal como um operon supressor de glicose que normalmente suprime a expressão das seqüências exógenas até mesmo quando o conteúdo de glicose no meio está baixo ou quase depletado.

O vetor de expressão é construído tipicamente para conter um marcador selecionável (por exemplo, um gene que codifica uma proteína necessária para a sobrevivência ou crescimento de uma célula hospedeira transformada com o vetor), embora tal gene marcador possa ser carregado em outra seqüência de polinucleotídeo co-introduzida na célula hospedeira. Somente aquelas células hospedeiras dentro das quais um gene selecionável foi introduzido sobreviverão e/ou crescerão sob condições seletivas. Os genes típicos de seleção codificam proteína(s) que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras substâncias tóxicas, por exemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, etc.; (b) complementam deficiências auxotróficas; ou (c) fornecem nutrientes críticos não disponíveis nos meios complexos. A escolha do gene adequado do marcador dependerá da célula hospedeira, e os genes adequados para diferentes hospedeiros são conhecidos na técnica. Vetores de clonagem e de expressão também contêm tipicamente um sistema de replicação reconhecido pelo hospedeiro.

O vetor de expressão exemplar é ligado operativamente a elementos de controle transcricional adequados, tais como promotores, intensificadores e terminadores. Para a expressão (isto é, transdução), um ou os mais elementos de controle traducional são também geralmente requeridos, tais como sítios de ligação de ribossomo, sítios de iniciação de transdução e có-

dons de parada. Estes elementos de controle (transcricional e transducional) podem ser derivados de genes regulatórios tais como genes de choque térmico, genes implicados na toxicidade e genes de formação de esporo. Uma sequência de polinucleotídeo que codifica um peptídeo de sinal também pode ser incluída para permitir que a seqüência exógena codificada cruze e/ou se aloje nas membranas da célula ou seja secretada da célula, se desejado.

Expressão de seqüência exógena (por exemplo, enriquecida em um ou mais aminoácidos essenciais):

Os vetores que contêm a seqüência exógena de interesse podem ser introduzidos na célula hospedeira de levedura por qualquer um de vários meios apropriados, incluindo eletroporação, transfecção, bombardeio, e infecção. As células de levedura transformadas são cultivadas em meio seletivo (por exemplo, com antibióticos adequados) para selecionar aquelas que estão sendo transformadas com o vetor de expressão. Uma cultura substancialmente homogênea dos transformantes é então preparada para uso em uma reação de fermentação. A reação de fermentação é deixada prosseguir sob condições anaeróbicas usuais para produzir álcool e produtos gasosos. Os resíduos da reação de fermentação contêm transformantes de levedura que têm conteúdo nutricional aumentado, devido, por exemplo, a superprodução de seqüências exógenas que são enriquecidas em um ou mais aminoácidos essenciais (por exemplo, ricas em lisina).

EXEMPLO 1

Construção de pKS-1-ST:G060205

Um vetor designado pKS-1-ST:G060205 que contém uma fase aberta de leitura que codifica uma endopeptidase prolina-específica de *Flavobacterium meningosepticum* (GO6205) foi construído para expressar a endopeptidase no citoplasma de uma célula de levedura. A endopeptidase é ligada em fase com um Strep-Tag para a purificação rápida da proteína e um HA-Tag para facilidade de detecção por Western blotting. A seqüência da endopetidase é subclonada na estrutura principal de pKS-1-ST através dos locais de restrição de BamHI e Xhd. Veja a figura 3A para os componentes de seqüência adicionais contidos em pKS-1-ST:G060205. Em particular, a

configuração do vetor de pKS-1-ST carrega um marcador de resistência KanMX, um promotor ADH2 que controla a expressão do gene de endopeptidase prolina-específico. O promotor ADH2 é tipicamente inativo durante a fase inicial da fase de crescimento das células de levedura. Uma vez que as células alcançam a fase estacionária inicial da curva de crescimento, a glicose é esgotada do meio, por exemplo, o caldo YPD, induzindo desse modo a atividade do promotor ADH2.

### EXEMPLO 2

#### Construção de PKS-2-ST:GO6205

Um vetor designado pKS-2-ST:G060205 que contém uma fase aberta de leitura que codifica uma endopeptidase prolina-específica de *Flavobacterium meningosepticum* (GO6205) foi construído. A endopeptidase é operativamente ligada a uma seqüência-líder Suc2 para direcionar a endopeptidase sintetizada para fora de uma célula de levedura. Além disso, a seqüência de endopeptidase é ligada em fase com um Strep-Tag para a purificação rápida da proteína e um HA-Tag para facilidade de detecção por Western blotting. A seqüência de endopeptidase é subclonada na estrutura principal de pKS-2-ST através dos sítios de restrição de BamHI e Xhd. Veja a figura 3B para os componentes de seqüência adicionais contidos em pKS-2-ST:G060205. Em particular, a configuração do vetor pKS-2-ST carrega um marcador de resistência KanMX, um promotor ADH2 esse controla a expressão do gene de endopeptidase prolina-específico. O promotor ADH2 é tipicamente inativo durante a fase inicial do crescimento das células de levedura. Uma vez que as células alcançam a fase estacionária inicial da curva de crescimento, a glicose é esgotada do meio, por exemplo, o caldo YPD, induzindo desse modo a atividade do promotor ADH2.

Expressão da seqüência exógena (por exemplo, enriquecida em um ou mais aminoácidos essenciais):

### EXEMPLO 3

Expressão citoplasmática de endopeptidase prolina-específica a partir do vetor pKS-1-ST:GO6205

As células de levedura (cepa de *Saccharomyces cerevisiae*

ATCC 4132) que são altamente eficientes na produção de etanol foram transformadas com os vetores pKS-1-ST:GO6205 contendo um gene que codifica endopeptidase prolina-específica, uma grande proteína rica em lisina. A seqüência de aminoácido da endopeptidase prolina-específica é mostrada na figura 4A. Além da endopeptidase, a seqüência expressa contém um Strep-Tag, um epítipo de HA, e os resíduos de aminoácido que correspondem ao sítio de restrição de BamHI. A seqüência foi modificada em duas posições (mostradas nos triângulos na figura 4A), onde os resíduos de serina e histidina selvagens foram substituídos por alanina a fim de inativar a atividade da peptidase.

As células de levedura transformadas foram deixadas crescer no meio de crescimento padrão. Lisados das células de controle transformadas com o vetor de estrutura principal pKS e com o vetor pKS1:GO6205 foram analisados através de SDS-PAGE. A figura 6 descreve um gel no qual as respectivas proteínas do lisado foram separadas de acordo com seus pesos moleculares. Como mostrado na figura 6, os lisados preparados a partir das células de levedura transformadas com pKS1:GO6205 continham uma banda extra correspondendo ao peso molecular esperado (kDa ~79) da endopeptidase prolina-específica. Tal banda está ausente no lisado preparado a partir das células de levedura de controle transformadas com o vetor pKS2.

#### EXEMPLO 4

##### Expressão e secreção de endopeptidase prolina-específica através do vetor pKS-2-ST:GO6205

As leveduras (cepa de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4132) que eram altamente eficientes na produção de etanol foram transformadas com os vetores pKS-2-ST: GO6205 contendo um gene que codifica a endopeptidase prolina-específica, uma grande proteína rica em lisina. A seqüência codificada é mostrada na figura 4B. Além da endopeptidase, a seqüência expressa continha um sinal de exportação SUC2 para causar a secreção da proteína a partir das células transformadas. A seqüência codificada também tinha uma seqüência de Strep-Tag, e do epítipo de HA, e os resíduos de aminoácido que correspondem ao sítio de restrição de

BamHI. A seqüência foi modificada em duas posições (mostradas nos triângulos na figura 4A), onde os resíduos de serina e histidina selvagens foram substituídos por alanina a fim de inativar a atividade da peptidase. As células de levedura transformadas foram deixadas crescer em meio de crescimento padrão. Os sobrenadantes da cultura das células de controle transformadas com o vetor de arcabouço pKS2 e com o vetor pKS2:GO6205 foram analisados através de SDS-PAGE. A figura 5A mostra um cromatograma do sobrenadante da cultura em 24 horas para as células transformadas com pSK2:GO6205, e para as células transformadas com pKS2. O gel na figura 5A mostra que o sobrenadante das células transformadas com pSK2:GO6205 mostra uma banda com MW ~ 79 kDa, correspondendo à proteína endopeptidase prolina-específica, enquanto que as células apenas com pSK2 não mostram esta banda. A figura 5B mostra um cromatograma do sobrenadante da cultura após 48 horas para as células transformadas com pSK2:GO6205, e para as células transformadas com pKS2. O gel na figura 5B mostra que o sobrenadante das células transformadas com pSK2:GO6205 mostra uma banda com MW ~ 79 kDa, correspondendo à proteína endopeptidase prolina-específica, enquanto que as células apenas com pSK2 não têm esta banda.

## REIVINDICAÇÕES

1. Método de fermentação usando material que contém carbono, compreendendo:

- 5 (a) misturar um material que contém carbono com uma cultura que compreende microorganismos geneticamente modificados que, em um processo de fermentação, produzem um primeiro produto e um resíduo de fermentação que compreende um nutriente, em que o conteúdo do nutriente no resíduo de fermentação é maior do que aquele de microorganismos correspondentes não-modificados quando usados no processo de fermentação;
- 10 (b) fermentar a cultura sob condições adequadas para a produção comercial do primeiro produto e sob condições adequadas para a produção do nutriente;
- (c) separar o primeiro produto da cultura; e
- (d) produzir o resíduo da fermentação.

15 2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que os microorganismos compreendem um vetor de expressão recombinante que compreende uma seqüência de nucleotídeo exógena que codifica um polipeptídeo e uma seqüência regulatória que controla a expressão do polipeptídeo exógeno, em que a expressão do polipeptídeo exógeno resulta em aumento do

20 conteúdo nutricional do resíduo de fermentação comparado com aquele do microorganismo não-modificado.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o nutriente é selecionado do grupo que consiste em uma gordura, um ácido graxo, um lipídio, uma vitamina, um aminoácido essencial, um peptídeo, uma proteína,

25 um carboidrato, um esteroide, uma enzima, e um mineral-traço.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o nutriente é um aminoácido essencial selecionado do grupo que consiste em lisina, metionina, fenilalanina, treonina, isoleucina, triptofano, valina, leucina, arginina, taurina e histidina.

30 5. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a expressão da seqüência exógena está sob o controle de uma seqüência regulatória selecionada do grupo que consiste em uma seqüência regulatória de um

gene de choque térmico, em uma seqüência regulatória de um gene de toxicidade e uma seqüência regulatória de um gene de formação de esporo.

5 6. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a expressão da seqüência exógena é induzida quando a reação de fermentação tiver atingido pelo menos cerca de 50% do término.

7. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a expressão da seqüência de nucleotídeo exógena depende da concentração de glicose.

10 8. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a modificação genética modifica pelo menos um dos genes estruturais na via sintética do nutriente.

9. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a modificação genética modifica um controle regulatório da via sintética do nutriente.

15 10. Método de acordo com a reivindicação 9. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a modificação genética modifica um controle regulatório da via sintética do nutriente. em que a via sintética é para um aminoácido essencial selecionado do grupo que consiste em lisina, metionina, fenilalanina, treonina, isoleucina, triptofano, valina, leucina, arginina, taurina e histidina.

20 11. Método de acordo com a reivindicação 1. Método de fermentação usando material que contém carbono, compreendendoem que a modificação genética modifica os processos de transporte do nutriente para fora ou para dentro do microorganismo.

25 12. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o nutriente é um aminoácido essencial selecionado do grupo que consiste em lisina, metionina, fenilalanina, treonina, isoleucina, triptofano, valina, leucina, arginina, taurina e histidina.

13. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o nutriente é uma vitamina.

30 14. Método de acordo com a reivindicação 13,13. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o nutriente é uma vitamina. em que a vitamina é selecionada do grupo que consiste em vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B7, vitamina

B9, vitamina B12, vitamina C, vitamina D1 a D4, um tocoferol, e vitamina K.

15. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o nutriente é um lipídio.

5 16. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o primeiro produto é um álcool.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, em que o álcool é etanol.

18. Método de acordo com a reivindicação 16, em que o álcool é selecionado do grupo que consiste em metanol, propanol e butanol.

10 19. Método de acordo com a reivindicação 16, em que o álcool é separado por destilação.

20. Método de acordo com a reivindicação 16, compreendendo adicionalmente misturar o álcool com outro combustível.

15 21. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o primeiro produto é selecionado de um solvente ou um gás.

22. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o primeiro produto é um composto farmacêutico.

20 23. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o material que contém carbono é selecionado do grupo que consiste em celulose, lascas de madeira, vegetais, biomassa, excretas, resíduos animais, aveia, trigo, milho, cevada, inhame, painço, do arroz, do centeio, sorgo, batata, beterraba, cará, mandioca, frutas, sucos de fruta, e cana-de-açúcar.

25 24. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o resíduo de fermentação compreende grãos secos de destilador, solúveis secos de destilador ou grãos secos de destilador com solúveis.

25. Método de acordo com a reivindicação 1, que compreende incorporar o resíduo de fermentação em ração animal.

26. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o nutriente é produzido quando a fermentação estiver substancialmente terminada.

30 27. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o microorganismo é levedura.

28. Método de acordo com a reivindicação 27, em que a levedu-

ra é *Saccharomyces*.

29. Método de acordo com a reivindicação 1, em que os microorganismos compreendem a levedura, a fonte de carbono compreende o amido de milho ou sacarose, o primeiro produto compreende o etanol e o nutriente é selecionado de lisina, metionina, triptofano e treonina.

30. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o microorganismo é *Clostridium*.

31. Método de acordo com a reivindicação 30, em que o produto é butanol ou acetona.

32. Método de acordo com a reivindicação 1, em que os microorganismos compreendem o *Clostridium*, a fonte de carbono compreende amido de milho ou sacarose, o primeiro produto compreende etanol e o nutriente é selecionado de lisina, metionina, triptofano e treonina.

33. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o microorganismo é selecionado do grupo que consiste em *Zymomonas* sp., *E. coli*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium* e *Bacillus* ssp.

34. Método de acordo com a reivindicação 1, ainda compreendendo comercializar o primeiro produto e o resíduo da fermentação.

35. Método de fermentação usando o material que contém carbono, compreendendo:

(a) misturar um material que contém carbono com uma cultura que compreende microorganismos geneticamente modificados que, durante a fermentação, produzem um primeiro produto e um resíduo de fermentação, em que o valor do resíduo de fermentação é maior do que aquele de um resíduo de fermentação produzido por fermentar um microorganismo correspondente não-modificado;

(b) fermentar a cultura sob condições adequadas para a produção do primeiro produto e para a produção do resíduo de fermentação que tem o maior valor;

(c) separar o primeiro produto da cultura; e

(d) coletar o resíduo de fermentação.

36. Método da reivindicação 35. Método de fermentação usando

o material que contém carbono, compreendendo: em que o resíduo de fermentação compreende uma quantidade aumentada de um produto industrial ou farmacêutico.

5 37. Método de acordo com a reivindicação 35, em que o resíduo de fermentação exibe uma propriedade física melhorada.

38. Método de acordo com a reivindicação 37, em que a propriedade física melhorada é selecionada dentre aderência aumentada ou a densidade aumentada.

10 39. Microorganismo geneticamente modificado que, em um processo de fermentação, produz um primeiro produto para comercialização e um resíduo de fermentação que compreende um nutriente, em que o conteúdo do nutriente no resíduo de fermentação é maior do que aquele de um microorganismo correspondente não-modificado quando usado na reação de fermentação.

15 40. Microorganismo geneticamente modificado de acordo com a reivindicação 39, compreendendo um vetor de expressão recombinante que compreende uma seqüência de nucleotídeo exógena que codifica um polipeptídeo e uma seqüência regulatória que controla a expressão do polipeptídeo exógeno, em que a expressão do polipeptídeo exógeno resulta em  
20 conteúdo nutricional aumentado do resíduo de fermentação comparado com aquele do microorganismo não-modificado.

25 41. Microorganismo geneticamente modificado de acordo com a reivindicação 40, em que o nutriente é selecionado do grupo que consiste em uma gordura, um ácido graxo, um lipídio, uma vitamina, um aminoácido essencial, um peptídeo, uma proteína, um carboidrato, um esteroide, uma enzima, e um mineral-traço.

30 42. Microorganismo geneticamente modificado de acordo com a reivindicação 40, em que o nutriente é um aminoácido essencial para pelo menos um animal domesticado e o polipeptídeo exógeno compreende o aminoácido essencial.

43. Microorganismo geneticamente modificado de acordo com a reivindicação 42, em que o aminoácido essencial é selecionado do grupo

que consiste em lisina, metionina, fenilalanina, treonina, isoleucina, triptofano, valina, leucina, arginina, taurina e histidina.

5 44. Microorganismo geneticamente modificado de acordo com a reivindicação 40, em que a expressão da seqüência exógena está sob o controle de uma seqüência regulatória selecionada do grupo que consiste em uma seqüência regulatória de um gene de choque térmico, uma seqüência regulatória de um gene de toxicidade e uma seqüência regulatória de um gene de formação de esporo.

10 45. Microorganismo geneticamente modificado de acordo com a reivindicação 39, em que a modificação genética modifica pelo menos um dos genes estruturais na via sintética do nutriente.

46. Microorganismo geneticamente modificado de acordo com a reivindicação 39, em que a via sintética é para um aminoácido essencial para um animal domesticado.

15 47. Microorganismo geneticamente modificado de acordo com a reivindicação 39, em que a modificação genética modifica um controle regulatório da via sintética do nutriente.

20 48. Microorganismo geneticamente modificado de acordo com a reivindicação 39, em que a modificação genética modifica um gene estrutural que regula a síntese de um peptídeo que contém pelo menos um aminoácido essencial para um animal domesticado.

49. Microorganismo geneticamente modificado de acordo com a reivindicação 39, em que a modificação genética modifica os processos de transporte do nutriente para fora ou para dentro do microorganismo.

25 50. Microorganismo geneticamente modificado de acordo com a reivindicação 40, em que a expressão da seqüência exógena é induzida quando a reação de fermentação tiver atingido pelo menos cerca de 50% do término.

30 51. Microorganismo geneticamente modificado de acordo com a reivindicação 50, em que pelo menos 50% do término é evidenciado por uma diminuição no conteúdo de glicose para menos do que cerca de 50% do conteúdo de glicose inicial presente em uma mistura de reação de fermentação

antes de começar a reação de fermentação.

52. Microorganismo geneticamente modificado de acordo com a reivindicação 31, em que a expressão da seqüência de nucleotídeo exógena depende da concentração de glicose.

5 53. Microorganismo geneticamente modificado de acordo com a reivindicação 39, em que o nutriente é um aminoácido essencial para pelo menos um animal domesticado.

54. Microorganismo geneticamente modificado de acordo com a reivindicação 53, em que o aminoácido essencial é selecionado do grupo  
10 que consiste em lisina, metionina, fenilalanina, treonina, isoleucina, triptofano, valina, leucina, arginina, taurina e histidina.

55. Microorganismo geneticamente modificado de acordo com a reivindicação 39, em que o nutriente é uma vitamina.

56. Microorganismo geneticamente modificado de acordo com a reivindicação 55, em que a vitamina é selecionada do grupo que consiste em  
15 vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B7, vitamina B9, vitamina B12, vitamina C, vitamina D1 a D4, um tocoferol, e vitamina K.

57. Microorganismo geneticamente modificado de acordo com a reivindicação 55, em que o produto comercial é um álcool.  
20

58. Microorganismo geneticamente modificado de acordo com a reivindicação 57, em que o álcool é etanol.

59. Microorganismo geneticamente modificado de acordo com a reivindicação 55, em que o produto comercial é selecionado dentre um sol-  
25 vente ou um gás.

60. Microorganismo geneticamente modificado de acordo com a reivindicação 55, em que o produto comercial é um composto farmacêutico.

61. Microorganismo geneticamente modificado de acordo com a reivindicação 39, em que o nutriente é um lipídio.

30 62. Microorganismo geneticamente modificado de acordo com a reivindicação 39, em que o álcool é selecionado do grupo que consiste em metanol, propanol, e butanol.

63. Microorganismo geneticamente modificado de acordo com a reivindicação 39, em que o microorganismo é levedura.

64. Microorganismo geneticamente modificado de acordo com a reivindicação 63, em que a levedura é *Saccharomyces*.

5 65. Microorganismo geneticamente modificado de acordo com a reivindicação 39, em que o microorganismo é *Clostridium*.

66. Microorganismo geneticamente modificado de acordo com a reivindicação 39, em que o microorganismo é selecionado do grupo que consiste em *Zymomonas* sp., *E. coli*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium* e  
10 *Bacillus* ssp.

67. Cultura de fermentação que compreende:

(a) um microorganismo geneticamente modificado que, em uma reação de fermentação, produz um primeiro produto para comercialização e um resíduo de fermentação que compreende um nutriente, em que o  
15 conteúdo do nutriente no resíduo de fermentação é maior do que aquele de um microorganismo correspondente não-modificado quando usado na reação de fermentação e

(b) um meio de fermentação que compreende uma fonte do carbono para a produção do nutriente,

20 em que a cultura produz o produto.

68. Cultura de fermentação de acordo com a reivindicação 67, em que o nutriente é selecionado do grupo que consiste em uma gordura, um ácido graxo, um lipídio, uma vitamina, um aminoácido essencial, um peptídeo, uma proteína, um carboidrato, um esteroide, uma enzima, e um mineral-  
25 traço.

69. Cultura de fermentação de acordo com a reivindicação 67, em que a fonte de carbono é selecionada de celulose, de lascas de madeira, vegetais, biomassa, excretas, resíduos animais, aveia, trigo, milho, da cevada, milho, painço, arroz, centeio, sorgo, batata, beterraba, inhame, mandioca, frutas, sucos de fruta, e cana-de-açúcar.  
30

70. Cultura de fermentação de acordo com a reivindicação 67, em que o primeiro produto é um álcool.

71. Cultura de fermentação de acordo com a reivindicação 70, em que o álcool é etanol.

72. Cultura de fermentação de acordo com a reivindicação 67, em que o primeiro produto é selecionado dentre um solvente ou um gás.

5 73. Cultura de fermentação de acordo com a reivindicação 67, em que o primeiro produto é um composto farmacêutico.

74. Cultura de fermentação de acordo com a reivindicação 67, em que o álcool é selecionado do grupo que consiste em metanol, propanol, e butanol.

10 75. Cultura de fermentação de acordo com a reivindicação 67, em que o microorganismo é levedura.

76. Cultura de fermentação de acordo com a reivindicação 75, em que a levedura é *Saccharomyces*.

15 77. Cultura de fermentação de acordo com a reivindicação 67, em que o microorganismo é *Clostridium*.

78. Cultura de fermentação de acordo com a reivindicação 67, em que o microorganismo é selecionado do grupo que consiste em *Zyomonas* sp., *E. coli*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium* e *Bacillus* ssp.

20 79. Cultura de fermentação de acordo com a reivindicação 67, tendo um volume de pelo menos 100 litros.

25 80. Cultura de fermentação de acordo com a reivindicação 67, em que os microorganismos compreendem levedura, a fonte de carbono compreende amido de milho ou sacarose, o primeiro produto compreende etanol e o nutriente é selecionado dentre lisina, metionina, triptofano e treonina.

30 81. Cultura de fermentação de acordo com a reivindicação 67, em que os microorganismos compreendem *Clostridium*, a fonte de carbono compreende amido de milho ou sacarose, o primeiro produto compreende etanol e o nutriente é selecionado dentre lisina, metionina, triptofano e treonina.

82. Vetor da expressão que compreende uma seqüência exógena que codifica um polipeptídeo que compreende pelo menos um aminoáci-

do essencial para um animal domesticado, em que a expressão da seqüência exógena é induzida quando uma reação de fermentação que produz um álcool ou um alceno tiver atingido pelo menos cerca de 50% do término.

5 83. Vetor de expressão de acordo com a reivindicação 82, em que a expressão da seqüência exógena está sob o controle de uma seqüência regulatória selecionada do grupo que consiste em um operon do supressor de glicose, seqüência regulatória de um gene de choque térmico, seqüência regulatória de um gene de toxicidade, seqüência regulatória de um gene de formação de esporo.

10 84. Vetor de expressão de acordo com a reivindicação 82, em que pelo menos cerca de 5% dos resíduos de aminoácido contidos no polipeptídeo são aminoácidos essenciais para um animal domesticado.

15 85. Resíduo de fermentação de um processo de fermentação comercial de um microorganismo geneticamente modificado, o dito resíduo de fermentação tendo uma quantidade maior de um nutriente em comparação a um resíduo de fermentação de um processo de fermentação comercial de um microorganismo não-modificado geneticamente.

86. Resíduo de fermentação de acordo com a reivindicação 85, compreendendo grãos secos de destilador.

20 87. Resíduo de fermentação de acordo com a reivindicação 85, compreendendo solúveis secos de destilador.

88. Resíduo de fermentação de acordo com a reivindicação 85, compreendendo grãos secos de destilador com solúveis.

25 89. Resíduo de fermentação de acordo com a reivindicação 85, compreendendo o microorganismo geneticamente modificado.

30 90. Resíduo de fermentação de acordo com a reivindicação 85, em que o nutriente é selecionado do grupo que consiste em uma gordura, um ácido graxo, um lipídio, uma vitamina, um aminoácido essencial, um peptídeo, uma proteína, um carboidrato, um esteroide, uma enzima, e um mineral-traço.

91. Resíduo de fermentação de acordo com a reivindicação 85, em que o processo de fermentação produziu um produto químico industrial

para isolamento.

5 92. Resíduo de fermentação de acordo com a reivindicação 85, em que o nutriente é um aminoácido essencial selecionado do grupo que consiste em lisina, metionina, treonina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptofano, e arginina.

93. Resíduo de fermentação de acordo com a reivindicação 92, em que o aminoácido essencial está contido em um polipeptídeo heterólogo produzido por um microorganismo usado no processo de fermentação.

10 94. Resíduo de fermentação de acordo com a reivindicação 93, em que pelo menos cerca de 5% dos resíduos do aminoácido contidos no polipeptídeo heterólogo são aminoácidos essenciais.

95. Resíduo de fermentação de acordo com a reivindicação 85, em que o aminoácido essencial está presente em uma quantidade que excede cerca de 3% do resíduo de fermentação em peso seco.

15 96. Resíduo de fermentação de acordo com a reivindicação 85, que é suplementado com um flavorizante.

97. Resíduo de fermentação de acordo com a reivindicação 85, que é embalado com instruções para uso como ração animal.

20 98. Resíduo de fermentação de acordo com a reivindicação 85, que é embalado com instruções para uso como suplemento alimentar.

99. Ração animal completa que compreende pelo menos cerca de 15% do resíduo de fermentação por peso.

25 100. Ração animal completa de acordo com a reivindicação 99, em que o resíduo de fermentação resulta de um processo de fermentação comercial de um microorganismo geneticamente modificado, o dito resíduo de fermentação tendo uma quantidade maior de um nutriente em comparação a um resíduo de fermentação de um processo de fermentação comercial de um microorganismo não-modificado geneticamente.

30 101. Ração animal completa de acordo com a reivindicação 100, compreendendo adicionalmente o microorganismo geneticamente modificado.

102. Ração animal completa de acordo com a reivindicação 100,

compreendendo adicionalmente um sabor evidente para um animal de interesse.

5 103. Ração animal completa de acordo com a reivindicação 100, em que o nutriente é um aminoácido essencial selecionado do grupo que consiste em lisina, metionina, treonina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptofano, e arginina.

104. Ração animal completa de acordo com a reivindicação 103, em que o aminoácido essencial está contido em um polipeptídeo heterólogo produzido por um microorganismo usado na reação de fermentação.

10 105. Método comercial de aumentar o valor de uma instalação de fermentação, compreendendo:

(a) fermentar uma cultura que contém microorganismos geneticamente modificados e uma fonte de carbono para produzir um primeiro produto, separar o primeiro produto da cultura e coletar um resíduo de fermentação, em que o resíduo de fermentação que tem um valor comercial mais elevado do que um resíduo de fermentação produzido por fermentar um microorganismo correspondente não-modificado; e

15

(b) comercializar ou vender o primeiro produto e o resíduo da fermentação.

20 106. Método comercial de acordo com a reivindicação 105, em que o resíduo de fermentação tem uma quantidade aumentada de um nutriente comparado com um resíduo de fermentação produzido por cultivar um microorganismo correspondente não-modificado na reação de fermentação.

25 107. Método comercial de acordo com a reivindicação 106, em que o nutriente é selecionado do grupo que consiste em uma gordura, um ácido graxo, um lipídio, uma vitamina, um aminoácido essencial, um peptídeo, uma proteína, um carboidrato, um esteroide, uma enzima, e um mineral-traço.

30 108. Método comercial de acordo com a reivindicação 105, em que o resíduo de fermentação tem propriedades físicas melhoradas.

109. Método comercial de acordo com a reivindicação 105, em que o resíduo de fermentação tem uma quantidade aumentada de um com-

posto industrial ou farmacêutico.

110. Método comercial de acordo com a reivindicação 106, em que o microorganismo é levedura.

5 111. Método comercial de acordo com a reivindicação 106, em que o microorganismo é *Clostridium*.

112. Método comercial de acordo com a reivindicação 106, em que a fonte de carbono compreende amido de milho ou sacarose.

10 113. Método comercial de acordo com a reivindicação 106, em que o primeiro produto é um álcool selecionado do grupo que consiste em etanol, metanol, propanol, e butanol.

114. Método comercial de acordo com a reivindicação 106, em que o primeiro produto é um biocombustível e o método compreende adicionalmente misturar o biocombustível com outro combustível para a comercialização.

15 115. Método comercial de acordo com a reivindicação 106, em que o nutriente é selecionado do grupo que consiste em uma gordura, um ácido graxo, um lipídio, uma vitamina, um aminoácido essencial, um peptídeo, uma proteína, um carboidrato, um esteroide, uma enzima, e um mineral-traço.

20 116. Método comercial de acordo com a reivindicação 106, em que o resíduo de fermentação compreende grãos secos de destilador, solúveis secos de destilador ou grãos secos de destilador com solúveis.

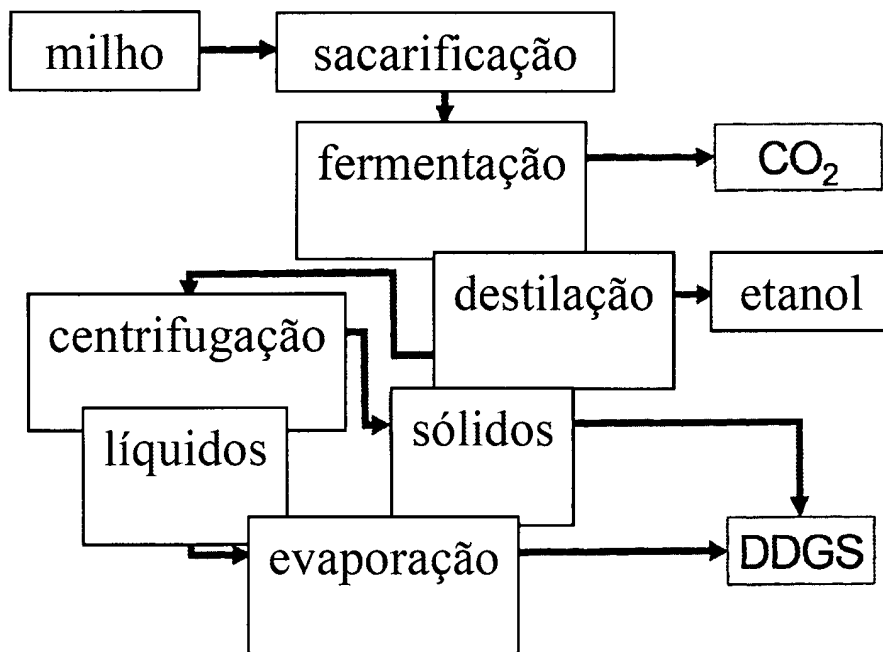
25 117. Método comercial de acordo com a reivindicação 106, que compreende misturar o resíduo de fermentação com outros nutrientes para produzir uma ração completa para um animal domesticado.

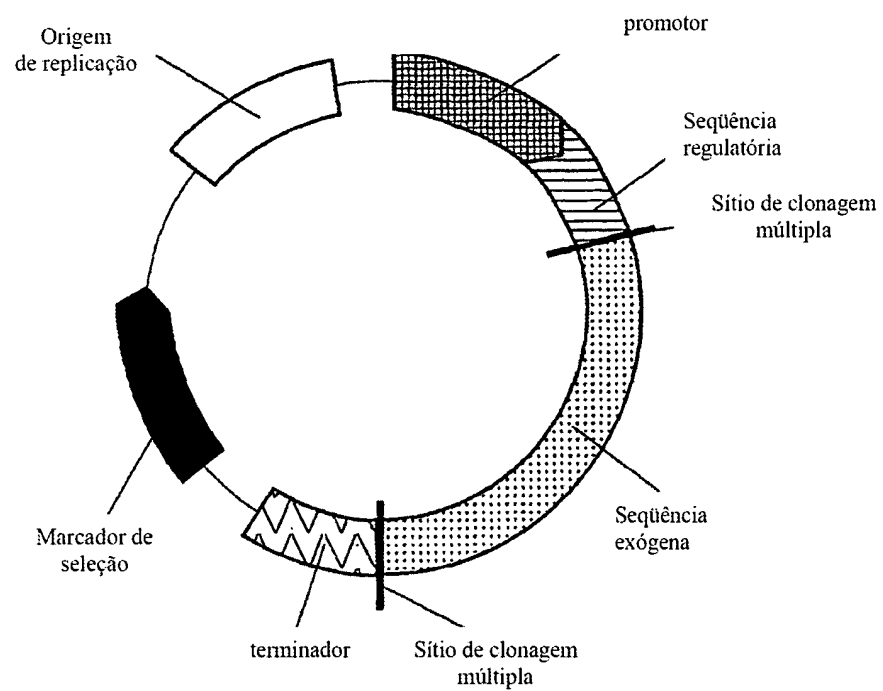
118. Processo que compreende combinar um resíduo de fermentação com um nutriente.

119. Composição que compreende um resíduo de fermentação suplementado com um nutriente exógeno.

FIG. 1

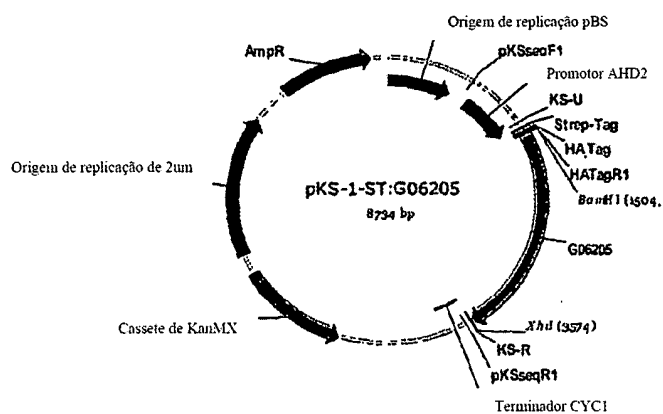
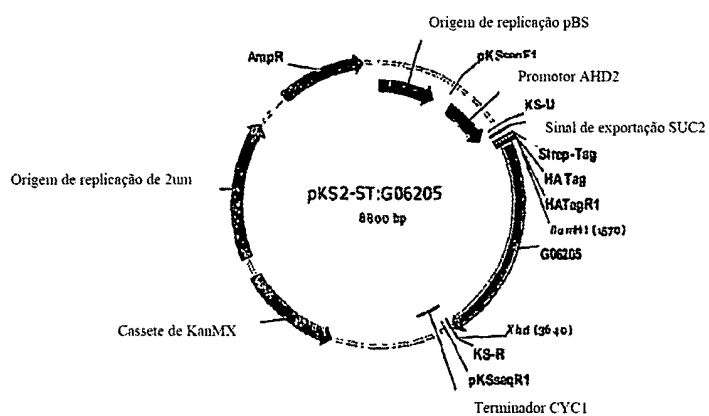
### Biocombustíveis: Etanol



**FIG. 2****Vetor para expressar seqüência exógena em levedura**

Seqüência regulatória exemplar:

- Operon de concentração de glicose
- Seqüência regulatória de um gene de choque térmico
- Seqüência regulatória de um gene de toxicidade
- Seqüência regulatória de um gene de formação de esporo

**FIG. 3A**Expressão citoplasmática a partir do vetor pKS1-ST: G06205Diagrama do vetor**FIG. 3B**Secreção a partir do vetor pKS2-ST: G06205Diagrama do vetor

**FIG. 4A**

Seqüência da proteína expressa: pKS1-ST: G06205

Strep-Tag
Epitopo de HA
BamHI  
 MWSHPQFEKASEYFDVFDYAGSQNSNSLKYPETKKVSHDITYFGTQVSDPYRWLEDDRAEDTK  
 AWVQQEVKFTQDYLAQIPFRDQLKKQLMDIWNYEKISAPFKKGKITYFSKNDGLQAQSVLYRKD  
 AAGKTEVFLDPNKFSEKGTTSLASVSFNKKGTLVAYSISEGGSWKNKIIILDAETKKQLDETL  
 DVKFSGISWLGDEGFFYSSYDKPKESVLSGMTDKHKVYFHKLGTKQSQDELIIGGDKFPRRYI  
 GAYVTDDQRYLVVSAANATNGNELYIKDLKNKTDPIPIITGFDSNVNVADTDGDTLYLFTDKDA  
 PNKRLVKTTIQNPKAETWKDVIAETSEPLEINTGGGYFFATYMKDAIDQVKQYDKNGKLVRAIK  
 LPGSGNASGFGGEKTEKDLIYSFTNYITPPTIFKYNVTTGNSEVYQPKVKFNPNENYVSEQVY  
 TSSDGTKIPMMISYKGLKKGKNTILYSYGGFNISLQPAFSVVNAIWMENGGIYAVPNIRGG  
 GEYGKKWHDAGTKMQKKNVFNDFIAAGEYLQKNGYTSKEYMALSGR<sup>Δ<sub>1</sub></sup>NGLLVGATMTMRPDLA  
 KVAFFPGVGLDMLRYNKFTAGAGWAYDYGTAEDSKEMFEYLKSYSPVHNKAGTCYPSTMVITS  
 DHDDRVPVPAHSFKFGSELQAKQSCKNPILIRIETNAG<sup>Δ<sub>2</sub></sup>AGGRSTEQVVAENADLLSFALYEMGI  
 KSLKL\*\*

Δ<sub>1</sub>: Selvagem contém uma serina      Δ<sub>2</sub>: Selvagem contém uma histidina

**FIG. 4B**

Seqüência da proteína expressa: pKS2-ST: G06205

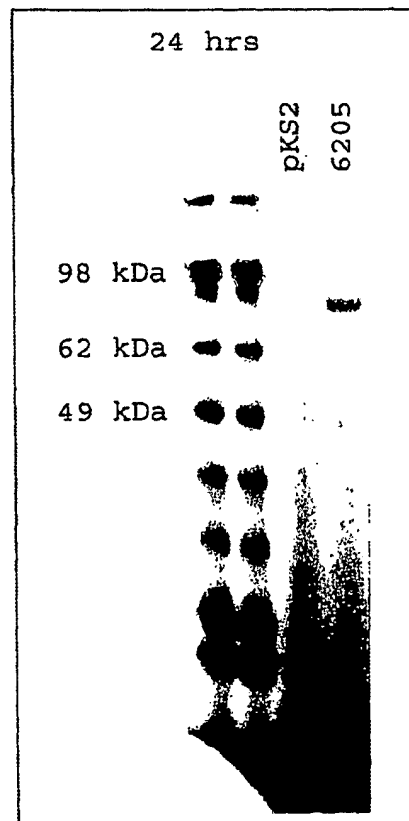
Sinal de secreção SUC2                      Strep-Tag                      Epitopo de HA                      BamHI

MMLLQAFLLLAGFAAKISASMSKSHPEQFEKASPYFDVVDYAGSQNSNSLKYPETKKVSHTDT  
 YFGTQVSDPYRWLEDDRAEDTKAWVQEQEVKFTQDYLAQIPFRDQLKKQLMDIWNYEKISAPFKK  
 GKYTYPFSKNDGLQAQSVLYRKDAAGKTEVFLDPNKFSEKGTSLASVSFNKKGTLVAYSISEGG  
 SDWNKIIILDAETKKQLDETLLDVKFSGISWLGDEGFFYSSYDKPKEGSQLSGMTDKHKVYFHK  
 LGTKQSQDELIIGGDKFPRRYIGAYVTDQRYLVVSAANATNGNELYIKDLKKNKTDPIPIITGF  
 DSNVNVADTDGDTLYLFTDKDAPNKRLVKTTIQNPKAETWKDVIAETSEPLEINTGGGYFFATY  
 MKDAIDQVKQYDKNGKLVRAIKLPGSGNASGFGGEKTEKDLYSPTNYITPPTIFKYNVTGNS  
 EVYQKPKVKFNPENYVSEQVFYTS SDGTKI PMMISYKKGLKKDGKNPTILYSYGGFNI SLQPAF  
 SVVNAIWMENGGIYAVPNIRGGGEYGGKWHDACTKMQKQNVFNDFIAAGEYLQKNGYTSKEYMA  
 LSGR<sup>Δ<sub>1</sub></sup>NGLLVGATMTMRPDLAKVAFPGVGVLDMLRYNKFTAGAGWAYDYGTAEDSKEM<sup>Δ<sub>2</sub></sup>FEYLK  
 SYSPVHNVKAGTCYPSTMVITSDHDDRVVPAHSFKFGSELQAKQSCKNPILIRIETNAG<sup>Δ<sub>2</sub></sup>GAGR  
 STEQVVAENADLLSFALYEMGIKSLKLL\*\*

Δ<sub>1</sub>: Selvagem tem uma serina aqui      Δ<sub>2</sub>: Selvagem tem uma histidina aqui

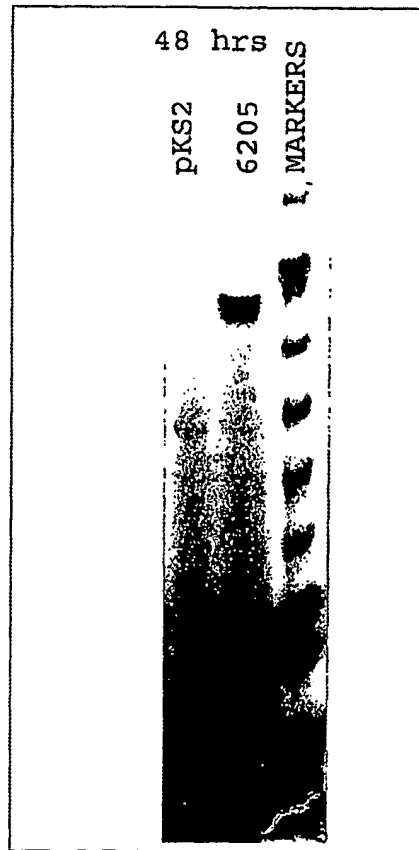
FIG. 5A

Secreção de proteínas ricas em lisina da cepa de *S. cerevisiae* ATCC 4132



**FIG. 5B**

Secreção de proteínas ricas em lisina da cepa de  
*S. cerevisiae* ATCC 4132



**FIG. 6**

Expressão da proteína G06205 cepa de *S. cerevisiae*  
ATCC 4132

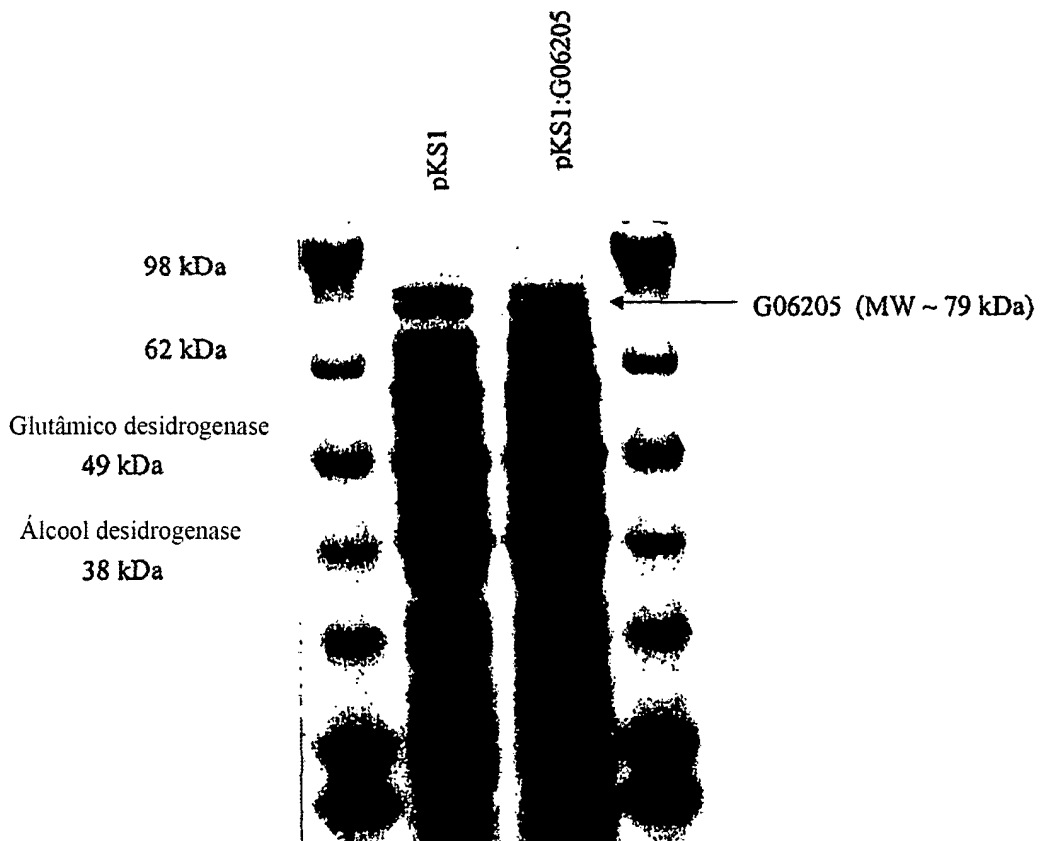
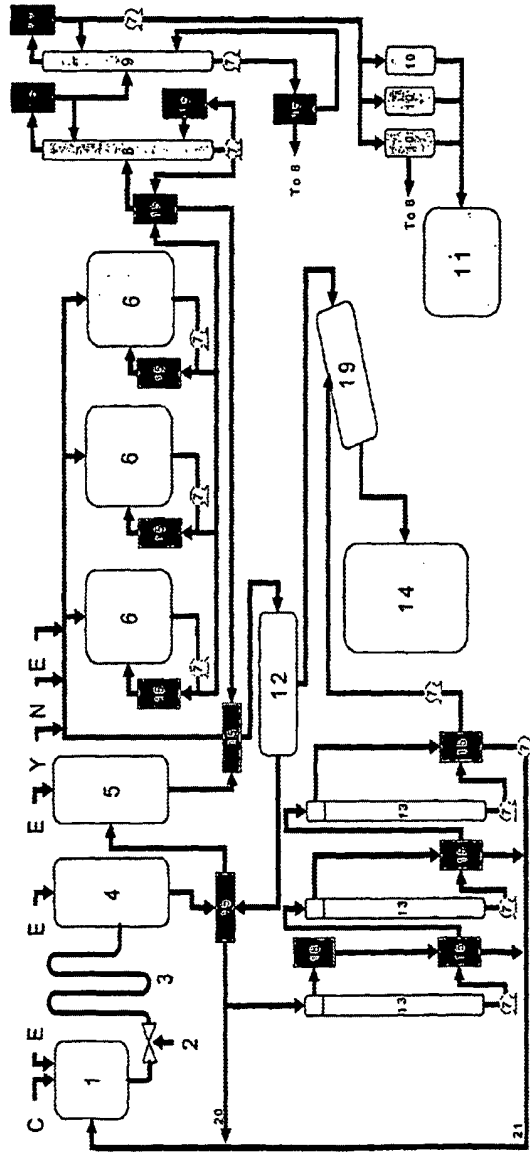


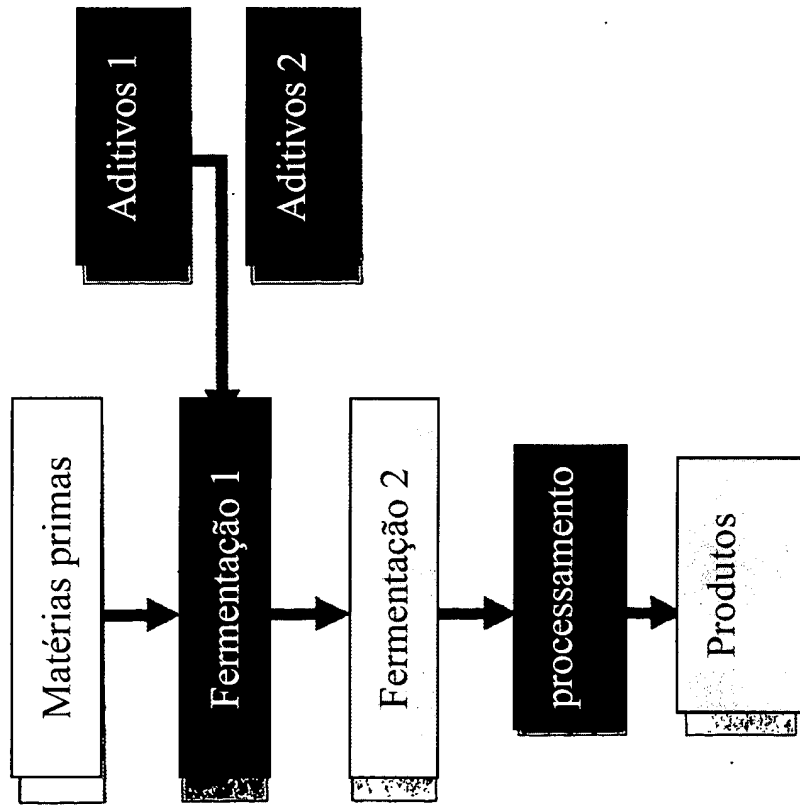
FIG. 7



Processo de produção de etanol

- |                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| 9. Tanque de mistura                | 1. Etanol produzido  |
| 10. Cozedor rápido                  | 2. Decantador  |
| 11. Alça de cozimento               | 3. Evaporador  |
| 12. Tanque de liquefação            | 4. Grãos de destilador secos com solúveis                        |
| 13. Tanque de sacarificação         | 5. Trocador de calor   |
| 14. Tanque de fermentação           | 6. Trocador de calor de refluxo                                  |
| 15. Bomba                           | 7. Condensador de prova  |
| 16. Extrator de cerveja             | 8. Recompresor de vapor mecânico ou recompresor de vapor térmico |
| 17. Coluna de retificação           |  |
| 18. Secadores com peneira molecular |  |
|                                     | 19. Secadora   |
|                                     | 20. Corrente oposta  |
|                                     | 21. Água   |
|                                     | C. Matéria-prima de amido  |
|                                     | E. Enzimas   |
|                                     | Y. Levedura  |
|                                     | N. Nutrientes de levedura  |

**FIG. 8**  
Fermentação sequencial



**FIG. 9**  
Fermentação paralela

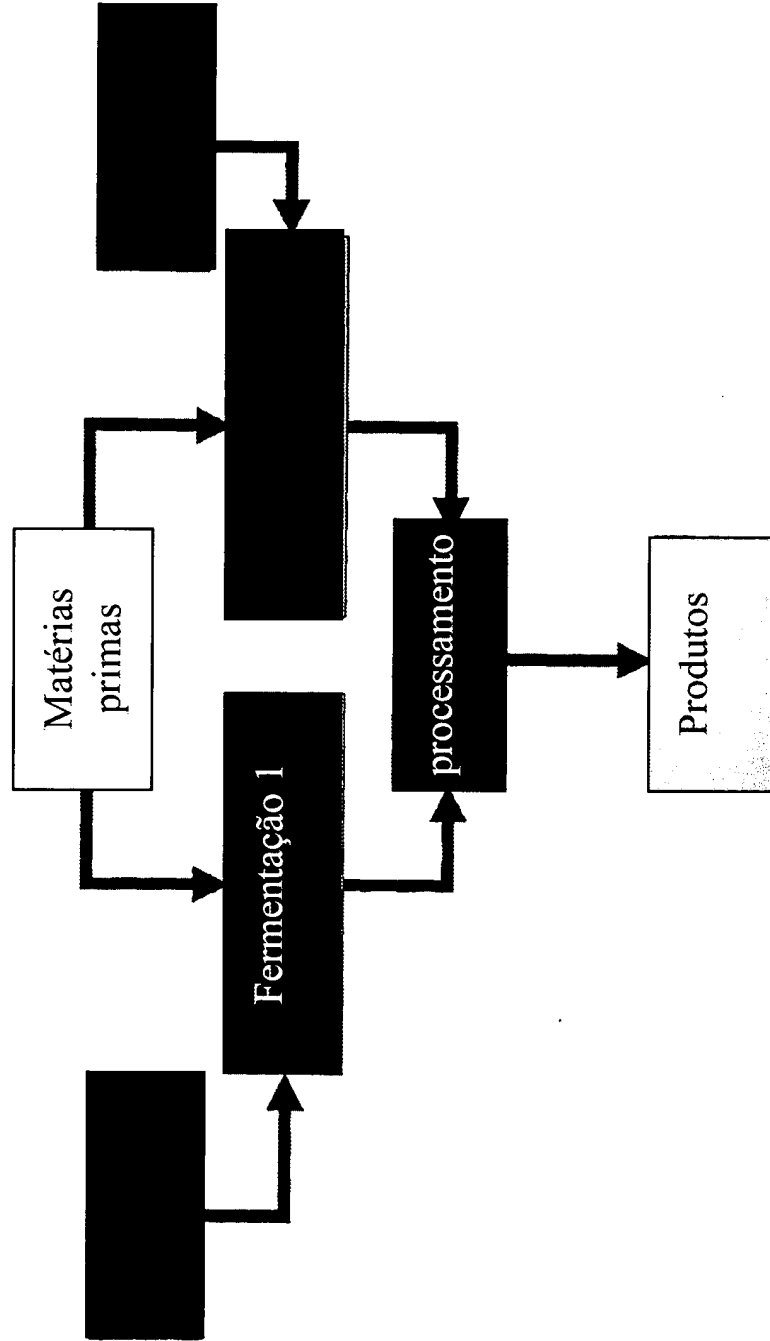


FIG. 10

Fermentação paralela

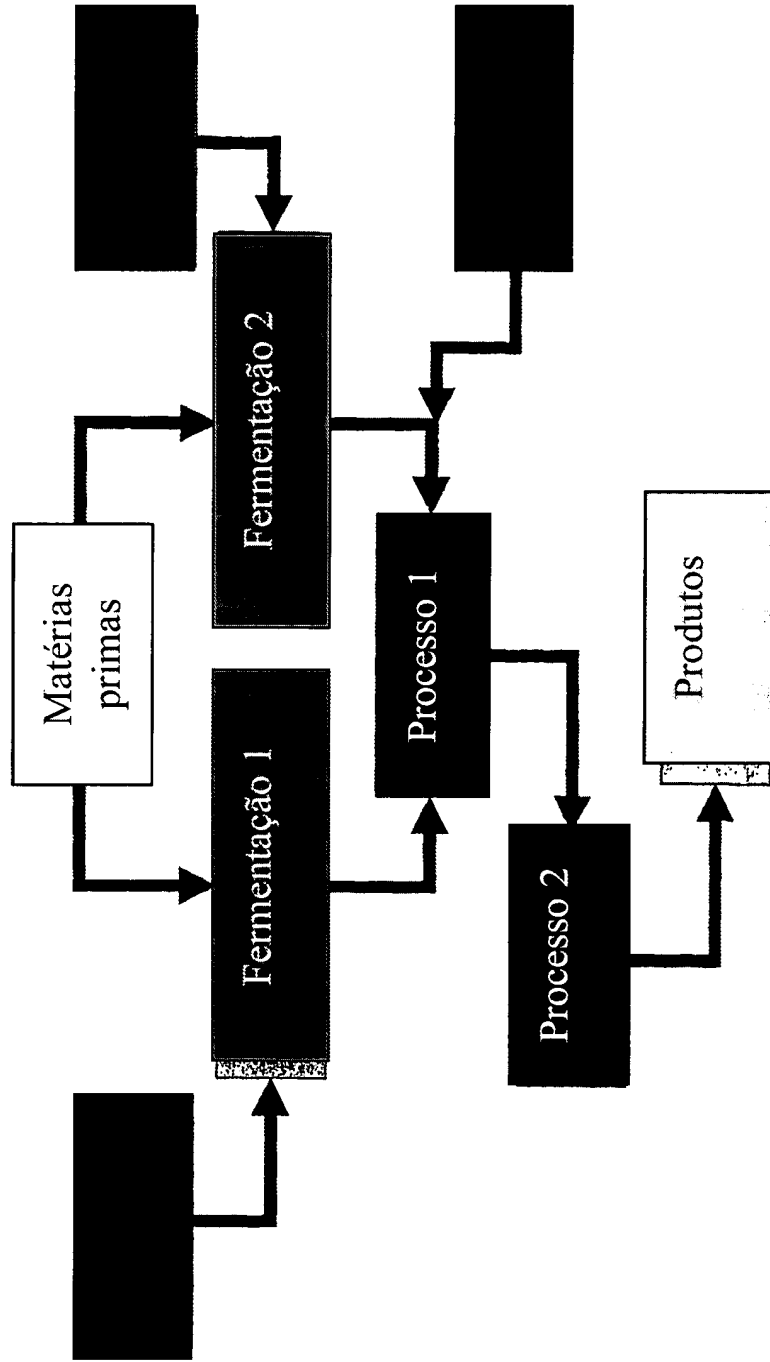


FIG. 11

Fermentação paralela

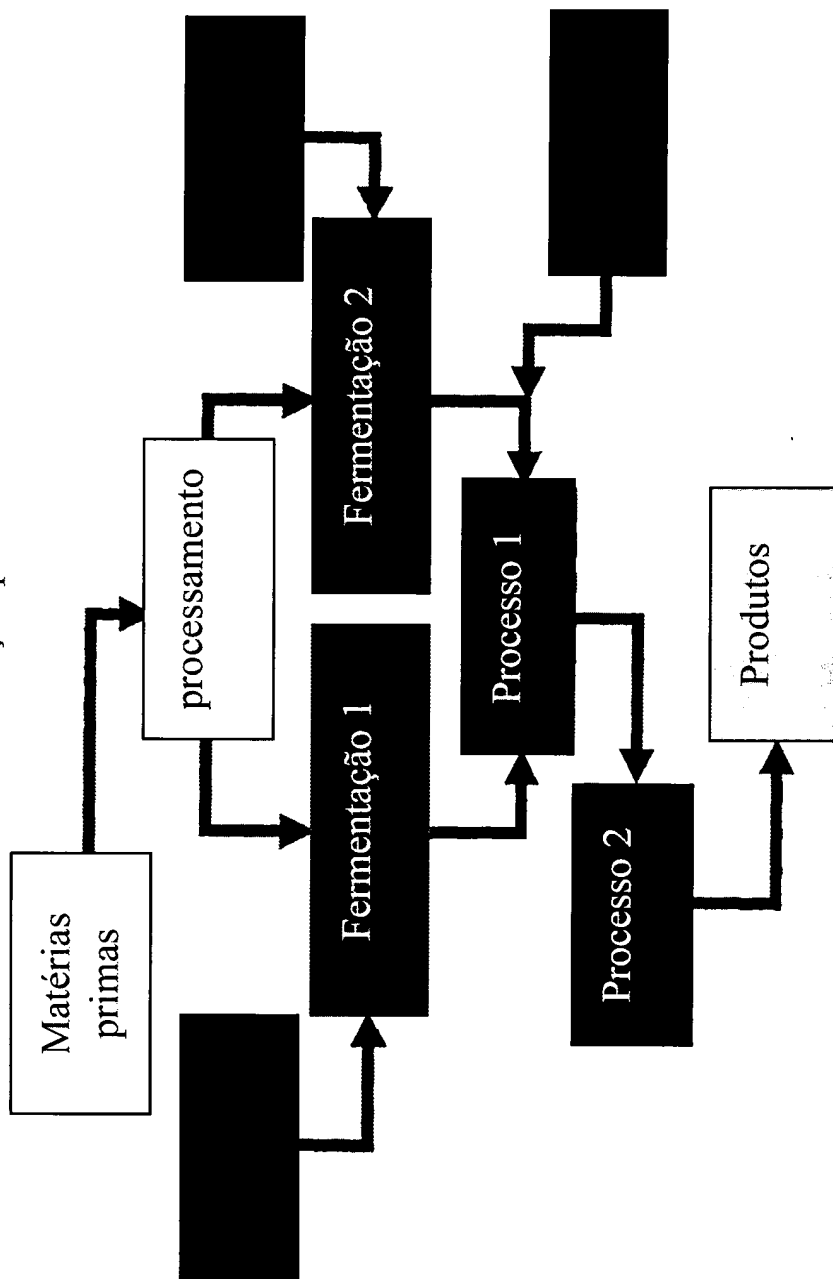
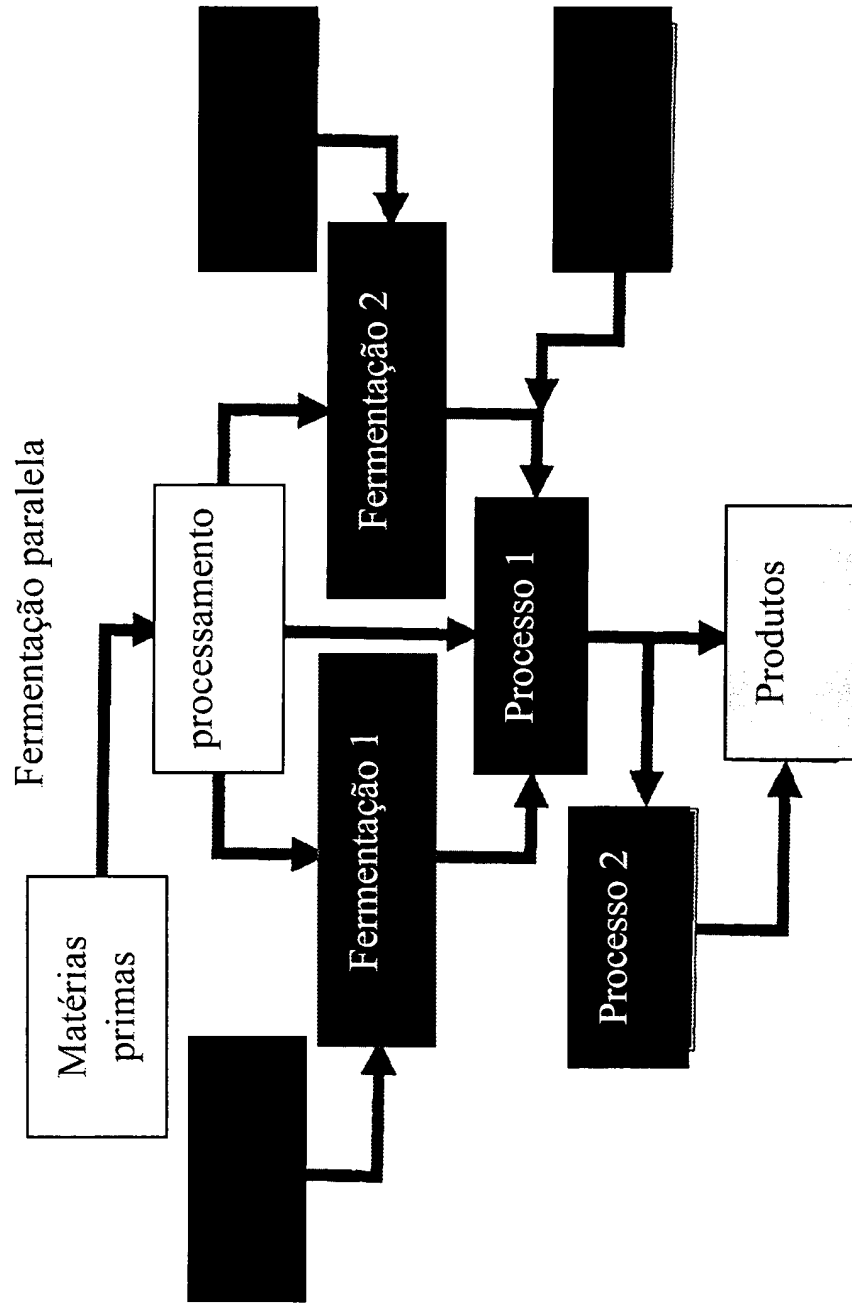
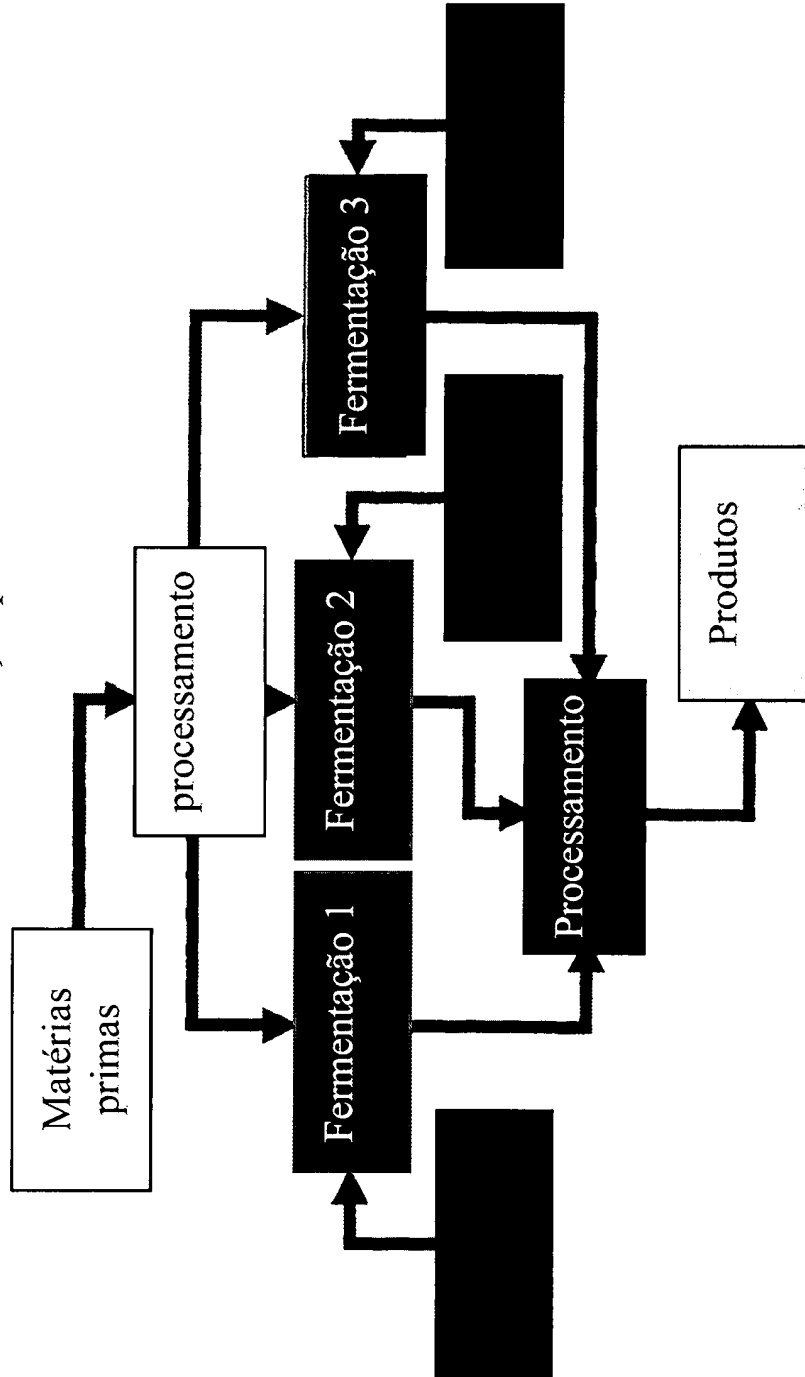


FIG. 12



**FIG. 13**  
Fermentação paralela



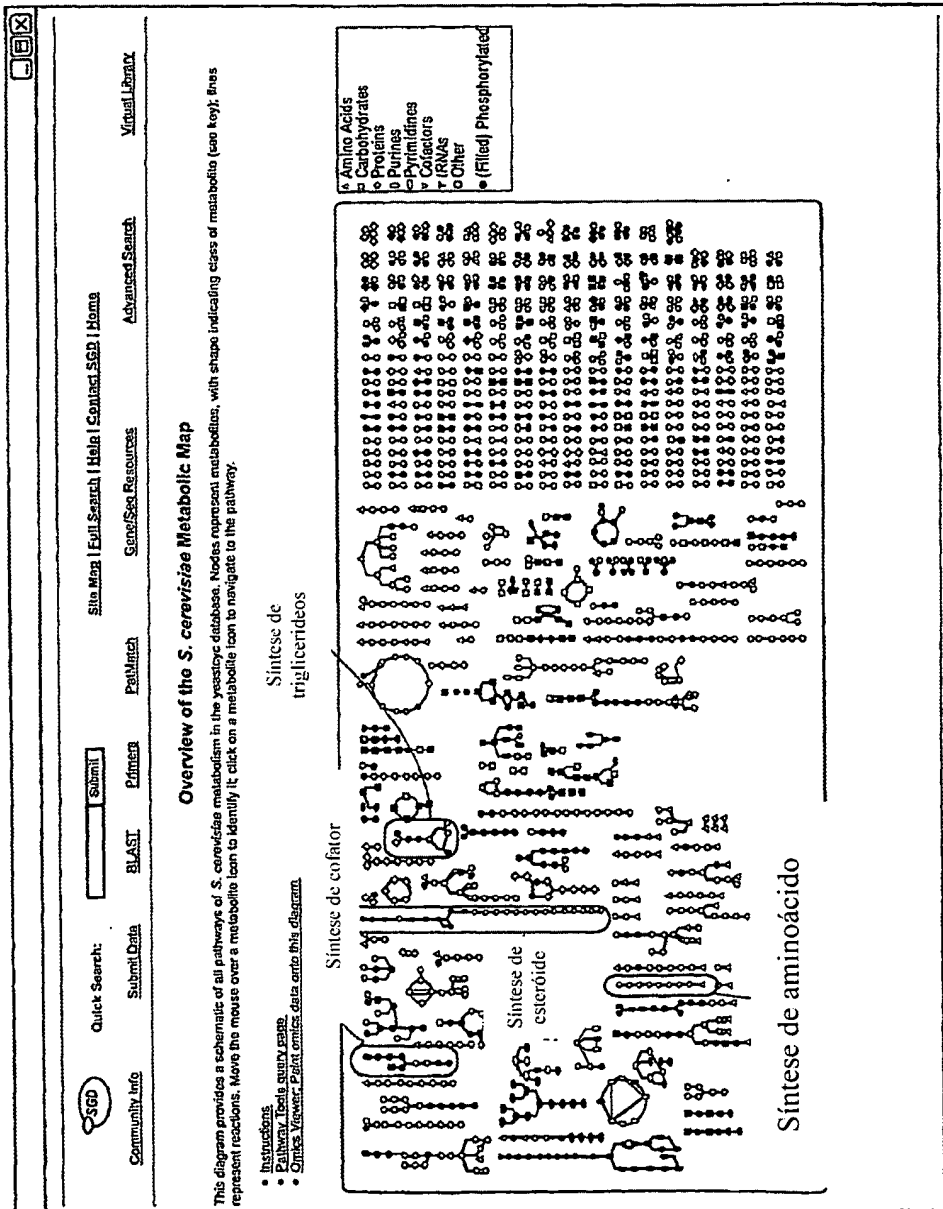


FIG. 14

**RESUMO**

Patente de Invenção: "**COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA PRODUZIR PRODUTOS E RESÍDUOS DE FERMENTAÇÃO**".

A presente invenção refere-se a composições e métodos planejados para aumentar o valor da produção de uma reação de fermentação que produz um primeiro produto, pretendido para comercialização, tal como etanol, e um resíduo de fermentação usado, por exemplo, como ração animal. Os métodos envolvem usar microorganismos no processo de fermentação, os quais foram modificados para produzir um resíduo que tem um valor maior que um resíduo produzido no processo por um microorganismo não-modificado. Em particular, a presente invenção contempla usar microorganismos em um processo de fermentação, os quais foram modificados para aumentar a produção de um nutriente, tal como um aminoácido essencial, reduzindo desse modo a necessidade suplementar o nutriente na dieta do animal. A presente invenção fornece também um resíduo de fermentação modificado de valor comercial mais elevado. Também são fornecidas na presente invenção rações animais completas suplementos nutricionais que compreendem os resíduos de fermentação em questão. Ainda é fornecido pela presente invenção um método de executar a fermentação, um microorganismo fermentativo modificado e um veículo genético para modificar tal microorganismo.