



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

(21) **PI0617265-2 A2**

(22) Data de Depósito: 09/10/2006
(43) Data da Publicação: 19/07/2011
(RPI 2115)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/52 2006.01
C12P 7/18 2006.01
C12P 7/40 2006.01
C12P 13/06 2006.01

(54) Título: **CÉLULA GENETICAMENTE MODIFICADA, PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DA MESMA, PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO 3-HIDROXIPROPIÔNICO, DE ÁCIDO ACÉTICO, DE POLIACRILATOS, DE ÉSTERES DE ÁCIDO ACÉTICO, BEM COMO O USO DA REFERIDA CÉLULA**

(30) Prioridade Unionista: 10/10/2005 DE 10 2005 048 818.8

(73) Titular(es): Evonik Degussa GMBH

(72) Inventor(es): Achim Marx, Doris Rittmann, Stefan Buchholz, Volker F. Wendisch

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

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006067182 de 09/10/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/042494 de 19/04/2007

(57) Resumo: CÉLULA GENETICAMENTE MODIFICADA, PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DA MESMA, PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO 3-HIDROXIPROPIÔNICO, DE ÁCIDO ACÉTICO, DE POLIACRILATOS, DE ÉSTERES DE ÁCIDO ACÉTICO, BEM COMO O USO DA REFERIDA CÉLULA. A presente invenção refere-se a uma célula geneticamente modificada em relação ao seu tipo selvagem, que apresenta pelo menos uma das propriedades a) ou b): a) uma atividade aumentada em comparação com seu tipo selvagem de uma enzima E₁, que catalisa a reação de piruvato para oxalacetato ou de uma enzima E_{1b}, que catalisa a reação de fosfoenolpiruvato para oxalacetato, b) uma atividade aumentada em comparação com seu tipo selvagem de uma enzima E₂, que catalisa a reação de aspartato para beta-alanina, em que a célula, além das propriedades a) ou b) é caracterizada por pelo menos uma das propriedades c) ou d): c) a célula geneticamente modificada é capaz de centrifugar beta-alanina para fora da célula; d) a célula geneticamente modificada é capaz de reagir beta-alanina para ácido 3-hidroxi propiônico. A invenção se refere também a processos para a produção de uma célula geneticamente modificada, às células geneticamente modificadas obtíveis por esses processos, processos para a produção de ácido 3-hidroxi propiônico, um processo para a produção de ácido acrílico, um processo para a produção de ésteres de ácido acrílico, bem como o uso de células para a produção de ácido 3-hidroxi propiônico.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "CÉLULA GENETICAMENTE MODIFICADA, PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DA MESMA, PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO 3-HIDROXIPROPIÔNICO, DE ÁCIDO ACÉTICO, DE POLIACRILATOS, DE ÉSTERES DE ÁCIDO ACÉTICO, BEM COMO O USO DA REFERIDA CÉLULA".

A presente invenção refere-se a uma célula geneticamente modificada em relação ao seu tipo selvagem, processos para a produção de uma célula geneticamente modificada, as células geneticamente modificadas, obteníveis por esses processos, processos para a produção de ácido 3-hidroxipropiônico, um processo para a produção de poliacrilatos, um processo para a produção de ésteres de ácido acrílico, bem como o uso de células para a produção de ácido 3-hidroxipropiônico.

Ácido acrílico é um composto de partida tecnicamente muito significativo. Ele serve, entre outros, para a produção de poliacrilatos, especialmente de poliacrilatos reticulados parcialmente neutralizados, que no estado seco e no estado essencialmente anidro apresentam uma grande capacidade para a absorção de água. Esses poliacrilatos reticulados, designados como "superabsorventes" podem absorver um múltiplo de seu próprio peso de água. Com base em sua alta capacidade de absorção, os polímeros absorventes são apropriados para a incorporação em estruturas e objetos que absorvem água, tais como, por exemplo, fraldas, produtos de incontinência ou absorventes femininos. Nessa relação, é feita referência a *Modern Superabsorbent Polymer Technology*; F. L. Buchholz, A. T. Graham, Wiley-VCH, 1998.

Do mesmo modo, os ésteres de ácido acrílico, tais como, por exemplo, acrilato de metila e acrilato de butila, são compostos de partida industrialmente significativos, que são especialmente utilizados para a produção de copolímeros. Esses copolímeros são utilizados, na maioria, na forma de dispersões de polímeros como adesivos, agentes de pintura ou coadjuvantes têxteis, de couro e papel.

A produção do ácido acrílico é efetuada tecnicamente em primeira linha através de oxidação catalítica, de dois estágios em fase gasosa de

propileno, sendo que o propileno é novamente obtido através de dissociação térmica de benzinhas obtidas no processamento de petróleo em bruto. Em seguida, o ácido acrílico obtido dessa maneira é eventualmente esterificado mediante adição de álcoois.

5 A desvantagem do processo para a produção de ácido acrílico em dois estágios, por um lado, é que as temperaturas usadas nos dois estágios entre 300 e 450°C levam à formação de oligômeros e de outros produtos de craqueio indesejáveis. Isso tem como consequência, a obtenção de uma quantidade indesejavelmente alta de compostos com ponto de ebulição maior do que o do ácido acrílico ou de compostos, que se separam apenas
10 difícilmente do ácido acrílico, tal como, por exemplo, ácido acético. Via de regra, esses compostos devem ser destilativamente separados do ácido acrílico, o que leva novamente a uma outra carga térmica do ácido acrílico e à formação associada de dímeros e oligômeros. No entanto, um alto teor de
15 dímeros de ácido acrílico ou oligômeros de ácido acrílico é desvantajoso, pois esses dímeros ou oligômeros, durante a produção de superabsorventes, são incorporados no polímero através de polimerização radical de ácido acrílico na presença de reticuladores. No tratamento posterior da superfície das partículas de polímeros que é efetuado em seguida à polimerização, por
20 exemplo, no âmbito de uma reticulação superficial posterior, os dímeros incluídos por polimerização, no entanto, são dissociados com formação de ácido β -hidroxipropiônico, que é desidratado com as condições da reticulação posterior formando ácido acrílico. Um alto teor de ácido acrílico dímero no ácido acrílico utilizado para a produção dos superabsorventes leva, portanto, a que
25 o teor de monômeros do ácido acrílico em um tratamento térmico dos polímeros, tal como é efetuado na reticulação posterior, aumente.

 Também outros compostos, muitas vezes tóxicos, ainda podem ser detectados no ácido acrílico obtível através da oxidação catalítica em fase gasosa. Nessas impurezas incluem-se, especialmente, aldeídos, que
30 agem perturbando o decurso da polimerização, com a consequência, de que os polímeros ainda contêm quantidades consideráveis de componentes solúveis.

Para resolver esses problemas, já foram descritas algumas preparações no estado da técnica (vide, por exemplo, a EP-A-0 574 260 ou DE-A-101 38 150).

5 Uma outra desvantagem deste processo convencional para a produção de ácido acrílico, consiste em que o produto de partida (propileno) utilizado é produzido a partir de petróleo em bruto e, dessa maneira, de matérias-primas não recicladas, o que é grave do ponto de vista econômico, principalmente com respeito à obtenção cada vez mais complicada e principalmente mais cara de petróleo em bruto, principalmente a longo prazo.

10 Também aqui no estado da técnica, já são descritas algumas preparações, para evitar esse problema.

Dessa maneira, o WO-A-03/62173 descreve a produção de ácido acrílico, em que se forma inicialmente alfa-alanina fermentativamente a partir de piruvato, que é reagida depois, por meio da enzima 2,3-aminomutase, para beta-alanina. A beta-alanina é novamente reagida através de β -alanil-CoA, acrilil-CoA, 3-hidroxiopropionil-CoA ou então através de semialdeído de ácido malônico, para ácido 3-hidroxiopropiônico, do qual, após uma desidratação, é obtido ácido acrílico.

20 O WO-A-02/42418 descreve um outro processo para a produção de, por exemplo, ácido 3-hidroxiopropiônico a partir de matérias-primas recicladas. Nesse caso, o piruvato é inicialmente reagido para lactato, do qual, em seguida, se forma lactil-CoA. Em seguida, o lactil-CoA é reagido através de acrilil-CoA e 3-hidroxiopropionil-CoA para ácido 3-hidroxiopropiônico. Uma outra rota descrita no WO-A-02/42418 para a produção de ácido 3-hidroxiopropiônico prevê a reação de glicose através de propionato, propionil-CoA, acrilil-CoA e 3-hidroxiopropionil-CoA. Esse relatório descreve também a reação de piruvato para ácido 3-hidroxiopropiônico através de acril-CoA e malonil-CoA. O ácido 3-hidroxiopropiônico obtido pelas respectivas rotas pode ser reagido para ácido acrílico através de desidratação.

30 O WO-A-01/16346 descreve a produção fermentativa de ácido 3-hidroxiopropiônico a partir de glicerol, no qual são utilizados micro-organismos, os quais exprimem o gene dhaB de *Klebsiella pneumoniae* (um ge-

ne, que codifica para desidratase de glicerina) e um gene, o qual codifica para uma desidrogenase de aldeído. Dessa maneira, o 3-hidroxiopropiônico é formado a partir de glicerina através de 3-hidroxiopropionaldeído, que a seguir, pode ser convertido para ácido acrílico por meio de desidratação.

- 5 A desvantagem dos processos fermentativos descritos acima para a produção de ácido 3-hidroxiopropiônico como compostos de partida para a síntese do ácido acrílico, consiste entre outros, que a quantidade de ácido 3-hidroxiopropiônico formado na solução de fermentação é baixa demais, para utilizar essa solução de fermentação como material de partida
- 10 para uma produção de ácido acrílico em grande escala técnica de maneira economicamente vantajosa.

A presente invenção tem como objetivo vencer as desvantagens resultantes do estado da técnica.

- De modo especial, a presente invenção tem como objetivo disponibilizar micro-organismos recombinantes ou sistemas de pelo menos dois
- 15 micro-organismos recombinantes, que estão em condição ainda melhor, especialmente ainda mais eficiente do que os micro-organismos descritos no estado da técnica, de produzir ácido hidroxiopropiônico a partir de matérias-primas recicladas, especialmente de carboidratos e/ou glicerina, o qual, a
- 20 seguir, pode ser convertido em ácido acrílico puro em uma cuidadosa reação de desidratação.

- Uma contribuição para a resolução dos objetivos mencionados acima, é prestada por uma célula geneticamente modificada em relação a seu tipo selvagem, que apresenta pelo menos uma, preferentemente duas
- 25 das propriedades a) e b):

- a) uma atividade aumentada em comparação com seu tipo selvagem, preferentemente aumentada em pelo menos 10%, de modo particularmente preferido, em pelo menos 25%, além disso, preferentemente em pelo menos 50%, além disso, de modo ainda mais preferido, em pelo menos
- 30 75%, além disso, preferentemente em pelo menos 100% e do modo mais preferido possível, em pelo menos 500%, no máximo, preferentemente em até 5.000%, de modo particularmente preferido, em até 2.500%, de uma en-

zima E_{1a} , que catalisa a reação de piruvato para oxalacetato ou de uma enzima E_{1b} , que catalisa a reação de fosfoenolpiruvato para oxalacetato, preferentemente no entanto, de uma enzima E_{1a} , que catalisa a reação de piruvato para oxalacetato,

- 5 b) uma atividade aumentada em comparação com seu tipo selvagem, preferentemente aumentada em pelo menos 10%, de modo particularmente preferido, em pelo menos 25%, além disso, preferentemente em pelo menos 50%, além disso, de modo ainda mais preferido, em pelo menos 75%, além disso, preferentemente em pelo menos 100% e do modo mais preferido, em pelo menos 500%, no máximo, preferentemente em até 5.000%, de modo particularmente preferido, em até 2.500%, de uma enzima E_2 , que catalisa a reação de aspartato para beta-alanina,

10 sendo que a célula, além das propriedades a) ou b), preferentemente a) e b), é caracterizada por pelo menos uma das propriedades c) ou d):

15 c) a célula geneticamente modificada é capaz de centrifugar a beta-alanina para fora da célula;

 d) a célula geneticamente modificada é capaz de reagir beta-alanina para ácido 3-hidroxipropiônico.

20 Uma célula geneticamente modificada dessa maneira, é capaz, mesmo ou em combinação com outras células, que podem reagir beta-alanina para ácido 3-hidroxipropiônico, de formar ácido 3-hidroxipropiônico a partir de carboidratos ou glicerina, pois a beta-alanina formada pode ser reagida para ácido 3-hidroxipropiônico.

25 Por um "tipo selvagem" de uma célula designa-se preferivelmente uma célula, cujo genoma está presente em um estado, tal como se originou naturalmente pela evolução. O termo é usado tanto para toda a célula, como também para genes individuais. Pelo termo "tipo selvagem" não são incluídas, portanto, especialmente aquelas células ou aqueles genes, cujas

30 sequências de genes foram pelo menos parcialmente modificadas pelo homem por meio de processos recombinantes.

 O termo "atividade aumentada de uma enzima" é preferente-

mente entendido como atividade intracelular aumentada. A formulação "uma atividade aumentada de uma enzima em relação ao seu tipo selvagem" compreende especialmente também uma célula, cujo tipo selvagem não apresenta nenhuma ou pelo menos nenhuma atividade comprovável dessa enzima e que somente após o aumento da atividade enzimática, por exemplo, através de superexpressão, mostra uma atividade comprovável dessa enzima. Nessa relação, o termo "superexpressão" ou a formulação "aumento da expressão" usada nas seguintes concretizações, abrange também o caso, de que uma célula de partida, por exemplo, uma célula de tipo selvagem, não apresenta ou pelo menos não apresenta nenhuma expressão comprovável e uma expressão da enzima é induzida apenas por processos recombinantes.

Fundamentalmente, obtém-se um aumento da atividade enzimática pelo fato, de se aumentar o número de cópias da sequência genética ou das sequências genéticas, que codificam para a enzima, usam um promotor forte ou utiliza um gene ou alelo, que codifica para uma enzima correspondente com uma atividade aumentada e eventualmente combina essas medidas. Células geneticamente modificadas de acordo com a invenção, são produzidas, por exemplo, através de transformação, transdução, conjugação ou por uma combinação desses métodos com um vetor, que contém o gene desejado, um alelo desse gene ou partes do mesmo e um vetor que possibilita a expressão do gene. A expressão heteróloga é obtida especialmente pela integração do gene ou dos alelos no cromossoma da célula ou por um vetor que replica extracromossalmente.

A DE-A 100 31 999 mostra uma sinopse sobre as possibilidades para aumentar a atividade enzimática em células no exemplo da piruvato carboxilase, que nesse caso, é introduzida como referência e cujo teor publicado com respeito às possibilidades para aumentar a atividade enzimática em células, forma uma parte da publicação da presente invenção.

A expressão das enzimas ou genes mencionados acima e de todos os mencionados a seguir, pode ser comprovada com auxílio da separação do gel de proteína mono- e bidimensional e identificação óptica sub-

semente da concentração de proteína com software de avaliação correspondente no gel. Caso o aumento de uma atividade enzimática se baseie exclusivamente em um aumento da expressão do gene correspondente, então a quantificação do aumento da atividade enzimática pode ser determinada de maneira simples através da comparação das separações de proteína mono- ou bidimensionais entre tipo selvagem e célula geneticamente modificada. Um método usual para a preparação dos géis de proteína em bactérias corineformes e para a identificação das proteínas, é o procedimento descrito por Hermann et al. (2001) *Electrophoresis* 22: 1712-1723. Do mesmo modo, a concentração de proteína pode ser analisada pela hibridação de Western-Blot com um anticorpo específico para a proteína a ser comprovada (Sambrook et al., *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2ª edição Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., EUA, 1989) e avaliação óptica subsequente com software correspondente para a determinação da concentração (Lohaus e Mayer (1989) *Biospectrum* 5: 32-39; Lottspeich (1999) *Angewandte Chemie* 111: 2630-2647). A atividade de proteínas que ligam DNA pode ser medida por meio de ensaios "DNA-Band-Shift" (também designados como retardo do gel) (Wilson et al. (2001) *Journal of Bacteriology*, 183: 2151-2155). O efeito de proteínas que ligam DNA sobre a expressão de outros genes pode ser comprovado por diversos métodos bem descritos do ensaio do gene repórter (Sambrook et al., *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2ª edição Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. EUA, 1989). As atividades enzimáticas intracelulares podem ser determinadas de acordo com diversos métodos descritos (Donahue et al. (2000) *Journal of Bacteriology* 182 (19) : 5624-5627; Ray et al. (2000) *Journal of Bacteriology* 182 (8) : 2277-2284; Freedberg et al. (1973) *Journal of Bacteriology* 115 (3) : 816-823). Conquanto não sejam mencionados métodos concretos para a determinação da atividade de uma determinada enzima nas concretizações seguintes, a determinação do aumento da atividade enzimática e também a determinação da diminuição de uma atividade enzimática é preferentemente efetuada por meio dos métodos descritos em Hermann et al. (*Electrophoresis* 22: 1712-1723 (2001)), Lohaus

et al. (Biospektrum 5: 32-39 (1998)), Lottspeich (Angewandte Chemie 111: 2630-2647 (1999)) e Wilson et al. (Journal of Bacteriology 183: 2151-2155 (2001)).

5 Caso o aumento da atividade enzimática seja realizado através da mutação do gene endógeno, então tais mutações podem ser produzidas ou não-direcionalmente, tal como, por exemplo, através de radiação UV ou através de produtos químicos que provocam mutação ou visadamente por meio de métodos de engenharia genética, tais como deleção (ões), inserção (ões) e/ou permuta(s) de nucleotídeos. Através dessas mutações obtêm-se
10 células geneticamente modificadas. Mutantes de enzimas particularmente preferidos são especialmente também aquelas enzimas, que não podem mais ser ou pelo menos em comparação com a enzima do tipo selvagem, inibidas em reação de retroalimentação reduzida.

 Caso o aumento da atividade enzimática é realizada pelo aumento da expressão de uma enzima, então aumenta-se, por exemplo, o número de cópias dos genes correspondentes ou muta-se a região do promotor e regulação ou o ponto de ligação do ribossomo, que se encontra a montante do gene da estrutura. Da mesma maneira agem os cassetes de expressão, que são incorporados a montante do gene da estrutura. Através de
20 promotores induzíveis, é adicionalmente possível, aumentar a expressão a cada momento desejado. Mas além disso, também os chamados "aumentadores" podem ser atribuídos ao gene da enzima como sequências reguladoras, que através de um melhor efeito recíproco entre a polimerase de RNA e DNA, causam também uma alta expressão do gene. Do mesmo modo, através de medidas para prolongar a vida dos m-RNA, a expressão melhora.
25 Além disso, igualmente, a atividade enzimática é reforçada devido ao impedimento da degradação da proteína enzimática. Nesse caso, os genes ou construções de genes estão presentes ou em plasmídeos com diferente número de cópias ou estão integrados e amplificados no cromossomo. Alternativamente, além disso, uma superexpressão dos respectivos genes pode ser
30 obtida através da modificação da composição do meio e evolução da cultura. O técnico encontra instruções para esse fim, entre outros, em Martin et al.

(Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), em Guerrero et al., (Gene 138: 35-41 (1994)), Tsuchiya e Morinaga (Bio/Technology 6: 428-430 (1988), em Eikmanns et al. (Gene 102: 93-98 (1991)), na EP-A-0.472.869, na US 4.601.893, em Schwarzer e Pühler (Bio/Technology 9: 84-87 (1991)), em
 5 Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60: 126-132 (1994)), em LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175: 1001-1007 (1993)), no WO-A-96/15246, em Malumbres et al. (Gene 134: 15-24 (1993)), na JP-A-10-229891, em Jensen e Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191-195 (1998)) e em compêndios de genética e biologia molecular conhecidos.
 10 dos. As medidas mencionadas acima levam, bem como as mutações, a células geneticamente modificadas.

Para aumentar a expressão dos respectivos genes, utilizam-se, por exemplo, plasmídeos episossomais. Como plasmídeos prestam-se especialmente aqueles, que são replicados em bactérias corineformes. Inúmeros
 15 vetores de plasmídeos conhecidos, tais como, por exemplo, pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology 64: 549-554 (1989)), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 107: 69-74 (1991)) ou pHS2-1 (Sonnen et al., Gene 107: 69-74 (1991) baseiam-se nos plasmídeos crípticos pHM1519, pBL1 ou pGA1. Outros vetores de plasmídeos, tais como, por exemplo, aqueles que
 20 se baseiam em pCG4 (US 4.483.160) ou pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66: 119-124 (1990) ou pAG1 (US 5.158.891), podem ser utilizados da mesma maneira.

Além disso, também são adequados aqueles vetores de plasmídeos. com cujo auxílio pode ser aplicado o processo da amplificação do gene através da integração no cromossoma, tal como foi descrito, por exemplo,
 25 por Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60: 126-132 (1994)) para a duplicação ou amplificação do hom-thrB-Operon. Neste método, todo o gene é clonado para um vetor de plasmídeo, que pode ser replicado em um hospedeiro (tipicamente *Escherichia coli*), mas não em um
 30 *Corynebacterium glutamicum*. Como vetores, tomam-se em consideração, por exemplo, pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1: 784-791 (1983)), pK18mob ou pK19mob (Schäfer et al., Gene 145: 69-73 (1994)), pGEM-T

(Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EUA), pCR2.1-TOPO (Shuman, Journal of Biological Chemistry 269: 32678-84 (1994)), pCR®Blunt (Invitrogen, Groningen, Países Baixos), pEM1 (Schrumpf et al., Journal of Bacteriology 173: 4510-4516) ou pBGS8 (Spratt et al., Gene 41: 337-342 (1986)). O
5 vetor de plasmídeo, que contém o gene a ser amplificado, é transformado, em seguida, através de conjugação ou transformação, na cepa de *Corynebacterium glutamicum* desejada. O método de conjugação é descrito, por exemplo, por Schäfer et al., Applied and Environmental Microbiology 60: 756-759 (1994). Métodos para a transformação são descritos, por exemplo,
10 por Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29: 356-362 (1988)), Dunican e Shivan (Bio/Technology 7: 1067-1070 (1989)) e Tauch et al. (FEMS Microbiology Letters 123: 343-347 (1994)). Após recombinação homóloga por meio de uma ocorrência "reticulação", a cepa resultante contém pelo menos duas cópias do respectivo gene.

15 No caso das células de acordo com a invenção, trata-se preferentemente de células geneticamente modificadas. Essas podem ser procariontes ou eucariontes. Nesse caso, pode tratar-se de células de mamíferos (tais como, por exemplo, células do homem), de células vegetais ou de micro-organismos, como células de levedura, fungos ou células de bactérias,
20 sendo que os micro-organismos são particularmente preferidos e as células de bactérias e células de levedura, são as mais preferidas.

Células de bactérias, de levedura e de fungos adequadas de acordo com a invenção, são todas aquelas células de bactérias, de levedura e de fungos, que estão depositadas na Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) (Coleção Alemã de Micro-organismos e Culturas de Células). Braunschweig, Alemanha, como cepas de bactérias do tipo selvagem. Células de bactérias adequadas pertencem aos gêneros, que são mencionados em <http://www.dsmz.de/species/bacteria.htm>.
25 Células de levedura adequadas de acordo com a invenção, pertencem aqueles gêneros, que são mencionados sob <http://www.dsmz.de/species/yeasts.htm> e fungos adequados de acordo com a invenção, são aqueles, que são mencionados sob <http://www.dsmz.de/species/fungi/htm>. Células particular-
30

mente preferidas daí, são aquelas dos gêneros *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Candida*, *Pichia*, *Kluveromyces*, *Saccharomyces*, *Bacillus*, *Escherichia* e *Clostridium*, sendo particularmente preferidos os *Bacillus flavum*, *Bacillus lactofermentum*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluveromyces lactis*, *Candida blankii*, *Candida rugosa*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium efficiens* e *Pichia postoris* e o mais preferido é o *Corynebacterium glutamicum*.

No caso da enzima E_{1a} trata-se preferentemente de uma carboxilase, de modo particularmente preferido, de uma piruvato carboxilase (número EC 6.4.1.1), que catalisa a reação de piruvato para oxalacetato. Genes para piruvato carboxilases (genes *pyc*) são clonados, por exemplo, de *Rhizobium etli* (Dunn et al., J. Bacteriol. 178: 5960-5970 (1996), vide também o WO-A-99/53035), *Bacillus subtilis* (banco de genes N° de acesso Z97025), *Mycobacterium tuberculosis* (banco de genes N° de acesso Z83018), *Pseudomonas fluorescens* (WO-A-99/53035) e de *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Mukhopadhyay, J. Biol. Chem. 273: 5155-5166 (1998)) e sequenciados. Além disso, a atividade da piruvato carboxilase foi comprovada em *Brevibacterium lactofermentum* (Tosaka et al., Agric. Biol. Chem. 43: 1513-1519 (1979)) e em *Corynebacterium glutamicum* (Peters-Wendisch et al., Microbiology 143: 1095-1103 (1997)). A sequência de nucleotídeos do gene *pyc* é descrita também na DE-A-100 31 999, DE-A-198 31 609, US 6.171.833, US 6.403.351 e na US 6.455.284. Piruvato carboxilases preferidas de acordo com a invenção, são aquelas piruvato carboxilases, que são cloradas por genes selecionados do grupo abrangendo PC, Pcx, CG1516, CG1516, *pyc-1*, *PYC2*, *AAR162Cp*, *pyrI*, *accC-2*, *pycA*, *pycA2*, *pca*, Cg10689, *pyc*, *pycB*, *accC*, *oadA*, *acc* e *accCl*, sendo o gene *pyc* particularmente preferido. Piruvato carboxilases preferidas de acordo com a invenção, são descritas especialmente também na US 6.455.284, US 6.171.833, US 6.884.606, US 6.403.351, US 6.852.516 e US 6.861.246. Fundamentalmente, no entanto, cada um dos genes *pyc* só podem ser utilizados de origem concebível, indiferente se de bactérias, leveduras, animais, fungos ou plantas. Além disso, podem ser usados todos os alelos do gene *pyc*, especial-

mente também aqueles, que resultam da degeneração do código genético ou por mutações de sentido de função neutra ("sense mutations").

Uma piruvato carboxilase particularmente preferida de acordo com a invenção, é aquele mutante, que é descrito em "A novel methodology
5 employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant" (Onishi et al., Applied Microbiology and Biotechnology 58 (2): 217-223 (2002)). Nessa mutação, o aminoácido prolina foi substituído na posição 458 por serina. O teor revelado dessa publicação com respeito as possibilidades para a produção de mutantes de piruvato carboxi-
10 lase é introduzido, nesse caso, como referência e forma uma parte da publicação da presente invenção. Células particularmente preferidas de acordo com a invenção, são portanto, aquelas, que apresentam o mutante da enzima descrito acima como proteína exógena ou aquelas, que apresentam sequências de DNA exógenas, que codificam para uma tal enzima e que ex-
15 primem essa enzima em quantidade satisfatória.

A produção de células com atividade aumentada de piruvato carboxilase é detalhadamente descrita, entre outros, na DE-A-100 31 999 e também na DE-A-198 31 609. O teor revelado desses impressos com respeito às diferentes possibilidades para aumentar a atividade da piruvato carboxi-
20 lase em células, especialmente em bactérias do gênero *Corynebacterium* é incluído, nesse caso, igualmente como referência e forma uma parte da publicação da presente invenção.

A determinação da atividade intracelular da piruvato carboxilase é preferentemente efetuada de acordo com o processo descrito na disserta-
25 ção de Petra Peters-Wendisch no Forschungszentrum Jülich GmbH "Anaplerotische Reaktionen der PEP-Carboxylase und der Pyruvat-Carboxylase im Zentralstoffwechsel und bei der Aminosäureproduktion" (1996).

No caso da enzima Eib trata-se preferentemente de uma carboxilase, de modo particularmente preferido, de uma fosfoenolpiruvato carboxi-
30 lase (EC 4.1.1.31), que catalisa a reação de fosfoenolpiruvato para oxalacetato. Fosfoenolpiruvato carboxilases preferidas de acordo com a invenção, são aquelas fosfoenolpiruvato carboxilases, que são codificadas pelos genes

selecionados do grupo abrangendo F12M16.21, F14N22.13, K15M2.8, ppc, c1pA, pepC, capP, Cg11585 e pepC, sendo que o gene ppc é particularmente preferido. Genes ppc para fosfoenolpiruvato carboxilases do tipo selvagem ou mutantes dessas enzimas são conhecidos, por exemplo, da US 6.599.732, US 5.573.945, US 4.757.009, bem como da US 4.980.285. A produção de células com atividade aumentada de fosfoenolpiruvato carboxilase é descrita, entre outros, na US 4.757.009. O teor revelado desse impresso com respeito ao procedimento na superexpressão da fosfoenolpiruvato carboxilase em micro-organismos, nesse caso, é igualmente incluído e forma uma parte da publicação da presente invenção. Além da superexpressão da enzima, também podem ser aplicadas as outras medidas para o aumento da atividade enzimática da fosfoenolpiruvato carboxilase, mencionadas em relação com a enzima E_{1a}, entre outras, também a expressão de mutantes de enzimas. Mutantes particularmente preferidos nesta relação são aqueles, que não precisam de nenhuma ativação através da acetil-CoA e/ou que são inibidos em reação de retroalimentação com respeito ao ácido asparagínico (para esse fim, vide especialmente a US 6.919.190). Fundamentalmente, em relação com a fosfoenolpiruvato carboxilase, também podem ser utilizados genes correspondente de qualquer origem apenas concebível, indiferente se de bactérias, leveduras, plantas, animais ou fungos. Além disso, também aqui podem ser utilizados todos os alelos do gene ppc, especialmente também aqueles, que resultam da degeneração do código genético ou através de mutações de sentido ("sense mutations") de função neutra.

A determinação da atividade da fosfoenolpiruvato carboxilase é preferentemente efetuada de acordo com o processo descrito na dissertação de Petra Peters-Wendisch no Forschungszentrum Jülich GmbH "Anaplerotische Reaktionen Corynebacterium glutamicum: Untersuchung zur Bedeutung der PEP-Carboxylase und der Pyruvat-Carboxylase im Zentralstoffwechsel und bei der Aminosäureproduktion" (1996).

Sauer e Eikmanns (FEMS Microbiology Reviews 29: 765-794 (2005)) mostram um resumo sobre as fosfoenolpiruvato carboxilases e piruvato carboxilases.

No caso da enzima E₂ trata-se preferentemente de uma descarboxilase, de modo particularmente preferido, de uma glutamato descarboxilase ou de uma aspartato descarboxilase, sendo a mais preferida a 1-aspartato-1-decarboxilase (número EC 4.1.1.11), que é codificada pelo gene panD. A aspartato descarboxilase catalisa a reação de aspartato para beta-alanina. Genes para a aspartato descarboxilase (gene panD), entre eles, de *Escherichia coli* (FEMS Microbiology Letters 143: 247-252 (1996)), *Photorhabdus luminescens* subsp. *laumondii*, *Mycobacterium bovis* subsp. *bovis*, bem como de inúmeros outros micro-organismos, já foram clonados e sequenciados. Especialmente a sequência de nucleotídeos do gene panD de *Corynebacterium glutamicum* está descrita na DE-A-198 55 313. Fundamentalmente, podem ser utilizados genes panD de qualquer origem apenas concebível, indiferente se de bactérias, leveduras, plantas, animais ou fungos. Além disso, podem ser utilizados todos os alelos do gene panD, especialmente também aqueles, que resultam da degeneração do código genético ou de mutações de sentido (sense mutations) de função neutra.

Uma aspartato descarboxilase particularmente preferida de acordo com a invenção, além da aspartato descarboxilase de *Corynebacterium glutamicum*, é o mutante de *Escherichia coli* DV9 (Vallari e Rock, Journal of Bacteriology 164: 136-142 (1985)). O teor revelado dessa publicação com respeito ao mutante mencionado acima é incluído, nesse caso, como referência e forma uma parte da publicação da presente invenção.

A produção de células com atividade aumentada de aspartato descarboxilase é detalhadamente descrita, entre outros, na DE-A-198 55 314. Do mesmo modo, o teor revelado desses impressos com respeito às diferentes possibilidades para aumentar a atividade da aspartato descarboxilase em células, especialmente em bactérias do gênero *Corynebacterium*, é incluído como referência e forma uma parte da publicação da presente invenção. Células particularmente preferidas de acordo com a invenção, são aquelas, que apresentam o mutante de enzima DV9 de *Escherichia coli* descrito acima ou então, panD de *Corynebacterium glutamicum* ou aquelas, que apresentam sequências de DNA, que codificam para uma dessas enzimas e

que exprimem essa enzima em quantidade satisfatória.

A determinação da atividade da aspartato descarboxilase é efetuada de acordo com o processo de teste descrito por Dusch et al. (Applied and Environmental Microbiology 65 (4): 1530-1539 (1999)) no capítulo com o
5 título "Aspartate decarboxylase activity assay".

Conquanto se trate no caso das células de acordo com a invenção, de uma células de *Corynebacterium glutamicum* geneticamente modificada, pode ser satisfatório que apenas a atividade da enzima E₂ seja aumentada, pois já o tipo selvagem dessas células apresenta uma atividade de
10 piruvato carboxilase comparativamente alta. Contudo, prefere-se também no caso da utilização de *Corynebacterium glutamicum*, que na célula de acordo com a invenção, tanto a atividade da enzima E_{1a}, como também a atividade da enzima E₂ o tanto a atividade da enzima E_{1b}, como também a atividade da enzima E₂ seja aumentada.

15 Além disso, as células de acordo com a invenção, são caracterizadas pelo fato, de que além das propriedades a) ou b), preferentemente a) e b), elas são caracterizadas por pelo menos uma das propriedades c) ou d):

a) a célula geneticamente modificada é capaz de centrifugar a beta-alanina para fora da célula;

20 b) a célula geneticamente modificada é capaz de reagir beta-alanina para ácido 3-hidroxipropiônico.

O termo "ácido 3-hidroxipropiônico", tal como é utilizado aqui, abrange a forma protonizada do ácido 3-hidroxipropiônico do mesmo modo como a forma desprotonizada do ácido 3-hidroxipropiônico (= 3-hidroxipropionato) e misturas da forma protonizada e desprotonizada. O termo
25 "centrifugar para fora" compreende tanto o transporte ativo, como também o passivo de beta-alanina para fora da célula para o meio que circunda a célula.

Células de acordo com a invenção, as quais preenchem a condição c), são preferentemente caracterizadas pelo fato, de apresentarem en-
30 zimas de transporte endógenas e/ou exógenas, preferentemente exógenas na membrana celular, as quais seletiva ou não seletivamente, de preferên-

cia, seletiva, ativa ou passivamente, eventualmente na permuta por ou junto com íons, tais como sódio, potássio ou cloro, podem centrifugar beta-alanina através da membrana celular para fora, isto é, para a região externa da célula (= efluxo da beta-alanina da célula). Nesse caso, é particularmente preferível de acordo com a invenção, que a célula geneticamente modificada apresente um efluxo preferentemente aumentado em pelo menos 10%, de modo particularmente preferido em pelo menos 25%, além disso, preferentemente em pelo menos 50%, além disso, de modo ainda mais preferido, em pelo menos 75%, além disso, preferentemente em pelo menos 100% e do modo mais preferido possível, em pelo menos 500%, de modo máximo possível até 5.000%, de modo particularmente preferido até 2.500% de beta-alanina da célula, em comparação com seu tipo selvagem. Nesse caso, um efluxo aumentado em 10% significa, que a célula geneticamente modificada com as mesmas condições, especialmente com a mesma concentração de beta-alanina intracelular e extracelular em um intervalo de tempo definido, é capaz de centrifugar em torno de 10% mais beta-alanina para fora da célula em comparação com seu tipo selvagem. Preferentemente, o efluxo aumentado é realizado por um aumento da atividade das enzimas de transporte mencionadas acima, em que o aumento pode ser novamente efetuado através de técnicas já mencionadas em relação com as enzimas E_{1a}, E_{1b} e E₂ (mutação da enzima de transporte ou aumento da expressão do gene da enzima de transporte).

Enzimas de transporte preferidas nessa relação são, por exemplo, as chamadas proteínas de resistência a múltiplos fármacos ("*multi-drug-resistance*") (proteínas MDR), por exemplo, com os genes *ebrA* e *ebrB*, bem como os chamados transportadores de efluxo de múltiplos fármacos ("*multi-drug-efflux transporter*"), em que os transportadores de efluxo de múltiplos fármacos, por exemplo, com os genes *blt* e *bmr*, são particularmente preferidos. Sistemas de transporte adequados para beta-alanina também são descritos no "Handbook of *Corynebacterium glutamicum*", editor L. Eggeling e M. Bott, CRC Press, Boca Raton, EUA, 2005, capítulo IV, "Genomic Analyses of Transporter Proteins in *Corynebacterium glutamicum* and *Corynebac-*

terium efficiens", B. Winnen, J. Felce e M. H. Saier, Jr., páginas 149-186. Outros sistemas de transporte adequados para beta-alanina, especialmente aqueles, que são codificados pelo gene *cycA*, são descritos em Schneider et al. (Appl. Microbiol. Biotechnol. 65 (5): 576-582 (2004)). Além disso, sistemas de transporte adequados para beta-alanina são descritos em Anderson e Thwaites (J. Cell. Physiol. 204(2): 604-613 (2005)), Brechel e King (Biochem. J. 333: 565-571 (1998)), Guimbal et al. (Eur. J. Biochem. 234 (3): 794-800 (1995)), Munck e Munck (Biochim. Biophys. Acta 1235 (1): 93-99 (1995)) e Shuttleworth e Goldstein (J. Exp. Zool. 231 (1): 39-44 (1984)).

10 Células de acordo com a invenção, que satisfazem a condição d), são capazes de reagir a beta-alanina para ácido 3-hidroxipropiônico. Nesse caso, são concebíveis pelo menos duas variantes.

De acordo com a variante A, as células podem reagir a beta-alanina através de beta-alanil-CoA, acrilil-CoA e hidroxipropionil-CoA para ácido 3-hidroxipropiônico. Nesta relação é particularmente preferível, que a célula apresente uma atividade aumentada em comparação com seu tipo selvagem, preferentemente aumentada em pelo menos 10%, de modo particularmente preferido, em pelo menos 25%, além disso, preferentemente em pelo menos 50%, além disso, de modo ainda mais preferido, em pelo menos 75%, além disso, preferentemente em pelo menos 100% e do modo mais preferido possível, em pelo menos 500%, no máximo preferentemente até 5.000%, de modo particularmente preferido até 2.500% de pelo menos uma, preferentemente de todas as seguintes enzimas E₃ até E₆:

- de uma enzima E₃, que catalisa a reação de beta-alanina para beta-alanil-coenzima A,

- de uma enzima E₄, que catalisa a reação de beta-alanil-coenzima A para acrilil-coenzima A,

- de uma enzima E₅, que catalisa a reação de acrilil-coenzima A para 3-hidroxipropionil-coenzima A,

30 - de uma enzima E₆, que catalisa a reação de 3-hidroxipropionil-coenzima A para ácido 3-hidroxipropiônico.

Células geneticamente modificadas particularmente preferidas

de acordo com a invenção, são nesse caso, aquelas, nas quais, eventualmente adicionalmente ao aumento de pelo menos uma das atividades enzimáticas E_1 ou E_{1b} , bem como E_2 , a atividade das seguintes enzimas ou combinações de enzimas é aumentada: E_3 , E_4 , E_5 , E_6 , E_3E_4 , E_3E_5 , E_3E_6 , E_4E_5 ,
 5 E_4E_6 , E_5E_6 , $E_3E_4E_5$, $E_3E_4E_6$, $E_3E_5E_6$ ou $E_3E_4E_5E_6$.

O aumento da atividade enzimática das enzimas E_3 até E_6 pode ser efetuada também aqui, através das técnicas mencionadas em relação com as enzimas E_{1a} , E_{1a} e E_2 , tal como mutação ou aumento da expressão da enzima.

10 Além disso, nessa relação é preferível, que a enzima
 E_3 seja uma coenzima A transferase (EC 2.8.3.1) ou coenzima A sintetase, preferentemente uma coenzima A transferase,
 E_4 uma beta-alanil-coenzima A-amônio lisase (EC 4.3.1.6)
 E_5 uma 3-hidroxipropionil-coenzima A desidratase (EC 4.2.1.-,
 15 especialmente EC 4.2.1.17) e

E_6 uma coenzima A transferase (EC 2.8.3.1), 3-hidroxipropionil-coenzima A hidrolase (EC 3.1. 2. -) ou 3-hidroxibutiril-coenzima A hidrolase (EC 3.1.2.4), preferentemente uma coenzima A transferase.

Enzimas preferidas com uma atividade de coenzima-A transferase são aquelas de *Megasphaera elsidenii*, *Clostridium propionicum* *Clostridium kluyeveri* e também de *Escherichia coli*. Como exemplos de uma sequência de DNA que codifica para uma CoA transferase, sejam mencionados neste ponto a sequência de *Megasphaera elsidenii* designada no WO-A-03/062173 com a SEQ ID n°: 24. Enzimas ademais preferidas são aquelas
 20 variantes da CoA transferase, que são descritas no WO-A-03/062173.

Enzimas adequadas com uma atividade de beta-alanil-Coenzima A-amônio liase são, por exemplo, aquelas de *Clostridium propionicum*. Sequências de DNA, as quais podem codificar para uma tal enzima, podem ser obtidas, por exemplo, a partir de *Clostridium propionicum*, tal como descrito
 30 no exemplo 10 do WO-A-03/062173. A sequência de DNA, que codifica para a beta-alanil-Coenzima A-amônio liase de *Clostridium propionicum*, é mencionada no WO-A-03/062173 como SEQ ID n°: 22.

Enzimas adequadas com uma atividade de 3-hidroxipropil-coenzima A desidratase são especialmente aquelas enzimas, que são codificadas por genes selecionados do grupo abrangendo ECHS1, EHHADH, HADHA, CG4389, CD6543, CG6984, CD8778, ech-1, ech-2, ech-3, ech-5, ech-6, ech-7, FCAALL. 314, FCAALL.21, FOX2, ECII2, ECII, paaF, paaG, yfcX, fadB, faoA, fadB1x, phaB, echA9, echA17, fad-1, fad-2, fad-3, paaB, echA7, dcaE, hcaA, RSp0671, RSp0035, RSp0648, RSp0647, RS03234, RS03271, RS04421, RS04419, RS02820, RS02946, paaG2, paaG1, ech, badK, crt, ydbS, ecch2, pimF, paaG3, fabJ-1, caiD-2, fabJ-2, ysiB, yngF, yusL, phaA, phaB, fucA, caiD, ysiB, echA3, echA5, echA6, echA7, echA8, echA14, echA15, echA16, echA17, echA18.1, echA19, echA20, echA21, echA2, echA4, echA9, echA11, echA10, echA12, echA13, echA18, echA1, fadB-1, echA8-1, echA12-2, fadB-2, echA16-2, Cg10919, fadB1, SCF41.23, SCD10.16, SCK13.22, SCP8.07c, StBAC16H6.14, SC5F2A15, SC6A5.38, faoA, hbdI, crt, hbd-1, hbd-2, hbd-5, fad-4, hbd-10, fad-5, hbd1, paaF-1, paaF-2, paaF-3, paaF-4, paaF-5, paaF-6 e paaF-7. Como exemplos de 3-hidroxipropionil-coenzima A desidratase adequadas de acordo com a invenção, sejam mencionadas especialmente aquelas de *Chloroflexus aurantiacus*, *Candida rugosa*, *Rhodospirillum rubrum* e *Rhodobacter capsulatus*. Um exemplo particular de uma sequência de DNA que codifica para uma 3-hidroxipropionil-Coenzima A desidratase é descrita, por exemplo, no WO-A-02/42418 como SEQ ID nº 40.

A produção de células geneticamente modificadas, nas quais pelo menos uma, preferentemente todas as atividades enzimáticas E₃ até E₆ foi ou foram aumentadas, é descrita, por exemplo, nos exemplos do WO-A-02/42418 e do WO-A-03/062173. O teor relatado desses dois impressos com respeito ao aumento das atividades dessas enzimas nas células é introduzido, nesse caso, como referência e forma uma parte da publicação da presente invenção.

De acordo com a variante B, as células podem reagir a beta-alanina através de semialdeído de ácido malônico para ácido 3-hidroxipropiônico. Nesta relação, é particularmente preferível, que a célula apresente

uma atividade aumentada em comparação com seu tipo selvagem, preferentemente aumentada em pelo menos 10%, de modo particularmente preferido e pelo menos 25%, além disso, preferentemente em pelo menos 50%, além disso, de modo ainda mais preferido, em pelo menos 75%, além disso, preferentemente em pelo menos 100% e do modo mais preferido possível em pelo menos 500%, no máximo preferentemente até 5.000%, de modo particularmente preferido até 2.500%, de pelo menos uma das, preferentemente das duas enzimas E_7 e E_8 :

- de uma enzima E_7 , que catalisa a reação de beta-alanina para semialdeído de ácido malônico,
- de uma enzima E_8 , que catalisa a reação de semialdeído de ácido malônico para ácido 3-hidroxipropiônico.

Nesse caso, células geneticamente modificadas particularmente preferidas de acordo com a invenção, são aquelas, nas quais, eventualmente te adicionalmente ao aumento de pelo menos uma das atividades enzimáticas E_{1a} ou E_{1b} , bem como E_2 , a atividade das seguintes enzimas ou combinações de enzimas é aumentada: E_7 , E_8 e E_7E_8 .

O aumento da atividade enzimática das enzimas E_7 e E_8 pode ser efetuado também aqui, através de técnicas mencionadas em relação com a enzima E_{1a} , E_{1b} e E_2 , tal como mutação ou aumento da expressão enzimática.

Nesta relação, prefere-se, além disso, que a enzima E_7 seja uma beta-alanin-2-oxoglutarato aminotransferase (EC 2.6.1.19) ou uma taurin-2-oxoglutarato transaminase (2.6.1.55), preferentemente uma beta-alanin-2-oxoglutarato aminotransferase e

E_8 seja uma 3-hidroxipropionato desidrogenase (EC 1.1.1.59) ou 3-hidroxi-butirato desidrogenase (EC 1.1.1.30), preferentemente, no entanto, uma 3-hidroxipropionato desidrogenase (EC 1.1.1.59).

Os genes da beta-alanin-2-oxoglutarato aminotransferase são, por exemplo, conhecidos de *Neurospora crassa* ("Über die beta-Alanin-alpha-Ketoglutarat-Transaminase", Aurich und Hoppe-Seyler's, Z. Physiol. Chem. 326: 25-33 (1961)). Outras informações em relação aos genes dessa

enzima de outros micro-organismos, podem ser especialmente deduzidas da base de dados KEGG GENE (KEGG = Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Os genes da 3-hidroxiopropionato desidrogenase o da 3-hidroxiobutirato desidrogenase dos mais diversos micro-organismos também
5 podem ser deduzidos da Base de dados KEGG GENE.

Quando as células de acordo com a invenção satisfazem a exigência d), então é preferível, além disso, que a célula apresente um efluxo diminuído em comparação com seu tipo selvagem, preferentemente diminuído em pelo menos 10%, de modo particularmente preferido em pelo menos
10 25%, além disso, preferentemente em pelo menos 50%, além disso, de modo ainda mais preferido, em pelo menos 75%, além disso, preferentemente em pelo menos 100% e do mais preferido possível em pelo menos 500%, no máximo preferentemente até 5.000%, de modo particularmente preferido até 2.500%, de beta-alanina. Nesse caso, um efluxo diminuído em 10% significa,
15 que a célula geneticamente modificada em comparação com seu tipo selvagem com as mesmas condições, especialmente com a mesma concentração de beta-alanina intracelular e extracelular, em um intervalo de tempo definido, é capaz de centrifugar menos beta-alanina para fora da célula. Preferentemente, o efluxo diminuído é realizado por uma diminuição da atividade das
20 enzimas de transporte mencionadas acima, sendo que a diminuição pode ser efetuada através da mutação da enzima de transporte ou diminuição da expressão do gene da enzima de transporte. Também pode ser vantajoso, que sejam utilizadas como células, que satisfazem a condição d), aquelas células, cujo tipo selvagem não é capaz de centrifugar beta-alanina para fora
25 da célula.

As células de acordo com a invenção, são capazes, sozinhas (quando a condição d) está satisfeita) ou então em combinação com outros micro-organismos que podem produzir ácido 3-hidroxiopropiônico a partir de beta-alanina (quando a condição c) está satisfeita), de formar ácido 3-
30 hidroxiopropiônico a partir de piruvato.

Partindo do piruvato como ponto de partida para a produção da beta-alanina, são concebíveis, então, novamente, duas diferentes formas de

concretização das células de acordo com a invenção.

De acordo com a primeira forma de concretização das células de acordo com a invenção, essas são capazes de produzir o piruvato necessário para a produção da beta-alanina também a partir de glicerina como fonte de carbono.

Nessa relação é particularmente preferível, que a célula de acordo com a invenção, apresente uma atividade aumentada em comparação com seu tipo selvagem, preferentemente aumentada em pelo menos 10%, de modo particularmente preferido em pelo menos 25%, além disso, preferentemente em pelo menos 50%, além disso, de modo ainda mais preferido, em pelo menos 75%, além disso, preferentemente em pelo menos 100% e do modo mais preferido possível, em pelo menos 500%, no máximo, preferentemente em até 5.000%, de modo particularmente preferido, em até 2.500%, de pelo menos uma, preferentemente de todas as seguintes enzimas E₉ até E₂₂:

- de uma enzima E₉, que facilita a difusão de glicerina para o interior da célula,
- de uma enzima E₁₀, que catalisa a reação de glicerina para glicerol-3-fosfato,
- de uma enzima E₁₁, que catalisa a reação de glicerol-3-fosfato para fosfato de di-hidroacetona,
- de uma enzima E₁₂, que catalisa a transferência de enxofre para o receptor de enxofre tioredoxina 1,
- de uma enzima E₁₃, que catalisa a hidrólise de fosfolípidos com formação de álcoois e glicerina,
- de uma enzima E₁₄, que catalisa o transporte de glicerol-3-fosfato para o interior da célula na permuta por fosfato;
- de uma enzima E₁₅, que catalisa a reação de fosfato de di-hidroxiacetona para 3-fosfato de glicerol aldeído,
- de uma enzima E₁₆, que catalisa a reação de 3-fosfato de glicerol aldeído para 1,3-bifosfoglicerato,
- de uma enzima E₁₇, que catalisa a reação de 1,3-bifosfoglice-

rato para 3-fosfoglicerato,

- de uma enzima E₁₈, que catalisa a reação de 3-fosfoglicerato para 2-fosfoglicerato,

5 - de uma enzima E₁₉, que catalisa a reação de 2-fosfoglicerato para fosfoenolpiruvato,

- de uma enzima E₂₀, que catalisa a reação de fosfoenolpiruvato para piruvato,

- de uma enzima E₂₁, que catalisa a reação de glicerina para di-hidroxiacetona,

10 - de uma enzima E₂₂, que catalisa a reação de di-hidroxiacetona para fosfato de di-hidroxiacetona.

Nesse caso, células geneticamente modificadas particularmente preferidas de acordo com a invenção, são aquelas, nas quais, eventualmente adicionalmente ao aumento de uma ou várias das atividades enzimáticas E_{1a} ou E_{1b}, bem como E₂ e eventualmente de uma ou várias das atividades enzimáticas E₃ até E₆ ou E₇ e E₈, a atividade das seguintes enzimas ou combinações de enzimas é aumentada: E₉, E₁₀, E₁₁, E₁₂, E₁₃, E₁₄, E₁₅, E₁₆, E₁₇, E₁₈, E₁₉, E₂₀, E₂₁, E₂₂, E₁₀E₁₁, sendo que um aumento de uma ou várias das atividades enzimáticas selecionadas do grupo consistindo em E₉, E₁₀, E₁₁, E₁₃, E₁₄, E₂₁ e E₂₂ é particularmente preferido e um aumento das atividades enzimáticas E₁₀ e E₁₁ é o mais preferido possível.

Nessa relação, é especialmente preferido, que a enzima

E₉ é uma aquagliceroporina (facilitador de glicerol), que é preferentemente codificada pelo gene glpF,

25 E₁₀ é uma glicerol quinase (EC 2.7.1.30), que é preferentemente codificada pelo gene glpK,

E₁₁ é uma glicerol-3-fosfato desidrogenase (EC 1.1.99.5), preferentemente uma glicerol-3-fosfato desidrogenase dependente de FAD, em que a glicerol-3-fosfato desidrogenase é preferentemente codificada pelo gene glpA, pelo gene glpB, pelo gene glpC ou pelo gene glpD, de modo particularmente preferido, pelo gene glpD,

30 E₁₂ é uma transferase de enxofre, que é codificada pelo gene

glpE,

E₁₂ é glicerolfosfato diesterase (EC 3.1.4.46), que é preferentemente codificada pelo gene glpQ,

5 E₁₄ é uma glicerol-3-fosfato permease, que é preferentemente codificada pelo gene glpT,

E₁₅ é uma triose-fosfato isomerase (EC 5.3.1.1),

E₁₆ é uma gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (EC 1.2.1.12),

E₁₇ é uma fosfoglicerato quinase (EC 2.7.2.3),

E₁₈ é uma fosfoglicerato mutase (EC 5.4.2.1),

10 E₁₉ é uma enolase (EC 4.2.1.11),

E₂₀ é uma piruvato quinase (EC 2.7.1.40)

E₂₁ é uma glicerol desidrogenase (EC 1.1.1.6), que é preferentemente codificada pelo gene gldA e

15 E₂₂ é uma di-hidroxiacetona quinase (EC 2.7.1.29), que é preferentemente codificada pelo gene dhaK.

As sequências de genes das enzimas mencionadas acima, são conhecidas na literatura e podem ser deduzidas, por exemplo, da Base de dados KEGG GENE, dos bancos de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) da National Library of Medicine (Bethesda, MD, EU-
20 A) ou do banco de dados da sequência de nucleotídeos da European Molecular Biologies Laboratories (EMBL, Heidelberg, Alemanha ou Cambridge, Reino Unido). Além disso, o gene gap que codifica a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174: 6076-6086), o gene tpi que codifica para a triose-fosfato isomerase (Eikmanns (1992),
25 Journal of Bacteriology 174: 6076-6086) e o gene pgk que codifica para a 3-fosfoglicerato quinase (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174: 6076-6086), são conhecidos de outras fontes.

Células geneticamente modificadas, nas quais pelo menos uma, de modo particularmente preferido, pelo menos duas, além disso, preferen-
30 temente pelo menos três e do modo mais preferido, todas as atividades das enzimas E₉ até E₂₂ foi aumentada pelas técnicas acima em relação com as enzimas E_{1a}, E_{1b} e E₂ (mutação da enzima ou aumento da expressão da en-

zima) podem ser produzidas com os genes conhecidos das enzimas E₉ até E₂₂. Essas células estão em condição, de serem cultivadas na presença de glicerina como única fonte de carbono (ou então junto com carboidratos como outra fonte de carbono).

5 Além do aumento de uma ou várias das atividades das enzimas E₉ até E₂₂, nessa relação também pode ser vantajoso, que as células de acordo com a invenção, expressem os seguintes genes, preferencialmente de maneira heteróloga:

- o gene glpG ou o gene b3424,
- 10 - o gene glpX ou o gene 3925,
- o gene dhaR, o gene ycgU ou o gene b1201,
- o gene fsa, o gene mipB, o gene ybiZ ou o gene B0825,
- o gene talC, o gene fsaB, o gene yijG ou o gene b3946.

As sequências de nucleotídeos desses genes podem ser novamente deduzidas de Base de dados KEGG GENE, dos bancos de dados do
15 National Center for Biotechnology Information (NCBI) do National Library of Medicine (Bethesda, MD, EUA) ou do banco de dados da sequência de nucleotídeos do European Molecular Biology Laboratories (EMBL, Heidelberg, Alemanha ou Cambridge, Reino Unido).

20 De acordo com uma segunda forma de concretização das células de acordo com a invenção, essas estão em condição de não obter o piruvato necessário para a produção da beta-alanina ou pelo menos apenas em pequena extensão a partir de glicerina. Neste caso, a produção do piruvato nas células é efetuada principalmente através da glicólise. Tais células
25 podem ser cultivadas em um meio nutritivo, o qual contém carboidratos, tal como, por exemplo, glicose, como fonte de carbono.

Nesse caso, é preferível, que as células de acordo com a invenção, eventualmente além de uma atividade aumentada de uma, preferentemente de todas as enzimas E₉ até E₂₂ mencionadas acima, apresentem uma
30 atividade aumentada em comparação com seu tipo selvagem, aumentada em pelo menos 10%, de modo particularmente preferido em pelo menos 25%, além disso, preferentemente em pelo menos 50%, além disso, de mo-

do ainda mais preferido, em pelo menos 75%, além disso, preferentemente em pelo menos 100% e do modo mais preferido possível, em pelo menos 500%, do modo máximo, preferentemente até 5.000%, de modo particularmente preferido até 2.500%, de pelo menos uma, preferentemente de todas as seguintes enzimas E₁₆ até E₂₀ e E₂₃ até E₂₇:

- de uma enzima E₂₃, que facilita a difusão de glicerina para o interior da célula,
- de uma enzima E₂₄, que catalisa a reação de glicose para α -D-glicose-6-fosfato,
- de uma enzima E₂₅, que catalisa a reação de α -D-glicose-6-fosfato para β -D-frutose-6-fosfato,
- de uma enzima E₂₆, que catalisa a reação de β -D-frutose-6-fosfato para β -D-frutose-1,6-bifosfato,
- de uma enzima E₂₇, que catalisa a reação de β -D-frutose-1,6-bifosfato para glicerol aldeído-3-fosfato e fosfato de di-hidroxiacetona,
- de uma enzima E₁₆, que catalisa a reação de glicerol aldeído-3-fosfato para 1,3-bifosfoglicerato,
- de uma enzima E₁₇, que catalisa a reação de 1,3-bifosfoglicerato para 3-fosfoglicerato,
- de uma enzima E₁₈, que catalisa a reação de 3-fosfoglicerato para 2-fosfoglicerato,
- de uma enzima E₁₉, que catalisa a reação de 2-fosfoglicerato para fosfoenolpiruvato e
- de uma enzima E₂₀, que catalisa a reação de fosfoenolpiruvato para piruvato.

Células geneticamente modificadas particularmente preferidas de acordo com a invenção, neste caso, são aquelas, nas quais eventualmente adicionalmente ao aumento de um ou várias das atividades das enzimas E_{1a} ou E_{1b} e eventualmente de uma ou várias das atividades das enzimas E₃ até E₆ ou E₇ e E₈, a atividade das seguintes enzimas ou combinações de enzimas é aumentada: E₁₆, E₁₇, E₁₈, E₁₉, E₂₀, E₂₃, E₂₄, E₂₅, E₂₆, E₂₇ e E₁₆E₁₇E₁₈E₁₉E₂₀E₂₃E₂₄E₂₅E₂₆E₂₇.

Nesta relação, é especialmente preferível, que a enzima

E₂₃ seja um transportador de glicose, preferentemente um transportador de glicose codificado por um gene selecionado do grupo abrangendo glulI, gluP o fucP ou uma glicose permease (2.7.1.69),

5 E₂₄ seja uma glicoquinase (2.7.1.2),

E₂₅ seja uma glicose-6-fosfato isomerase (EC 5.3.1.9),

E₂₆ seja uma 6-fosfofrutose quinase (EC 2.7.1.11),

E₂₇ seja uma frutose-bisfosfato aldolase (EC 4.1.2.13),

10 E₁₆ seja uma gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (EC 1.2.1.12),

E₁₇ seja uma fosfoglicerato quinase (EC 2.7.2.3),

E₁₈ seja uma enolase (EC 4.2.1.11) e

E₂₀ seja uma piruvato quinase (EC 2.7.1.40).

15 As sequências de nucleotídeos desses genes podem ser novamente deduzidas da Base de dados KEGG GENE, dos bancos de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) da National Library of Medicine (Bethesda, MD, EUA) ou do banco de dados da sequência de nucleotídeos da European Molecular Biologies Laboratories (EMBL, Heidelberg, Alemanha ou Cambridge, Reino Unido).

20 Além disso, em relação com essa segunda forma de concretização da célula de acordo com a invenção, é preferível, que além das enzimas E_{1a} ou E_{1b} e/ou E₂ mencionadas acima, bem como eventualmente pelo menos uma das enzimas E₃ até E₆, E₇ ou E₈, bem como E₁₂ até E₂₇, também a atividade de enzimas do sistema fosfotransferase tenha sido aumentada.

25 Nessa relação, prefere-se especialmente, que os genes ptsI e ptsM sejam reforçados, preferentemente superexpressados nas células de acordo com a invenção. Nesta relação, faz-se referência especialmente a US 6.680.187 e 6.818.432, cujo teor revelado com respeito às possibilidades para a superexpressão dos genes ptsI ou ptsM foi introduzido, nesse caso, como referência e forma uma parte da publicação da presente invenção.

30

Além disso, nas células de acordo com a invenção, independente do fato se elas utilizam glicerina ou glicose como fonte de matéria nutritiva

primária e também independente do fato, se elas formam ácido 3-hidroxipropiônico sozinhas ou em combinação com outras células através de semialdeído de ácido malônico ou através de beta-alanil-coenzima A, acrilil-coenzima A e 3-hidroxipropionil-coenzima A, a atividade da aspartato aminotransferase (EC 2.6.1.1.A) pode estar aumentada. A sequência do gene correspondente (aspB) pode ser deduzida, entre outros, da Base de dados KEGG GENE.

Além disso, nas células de acordo com a invenção, é preferível reduzir a atividade de enzimas,

10 E₂₈ que catalisam a reação de oxaloacetato para fosfoenolpiruvato, tal como, por exemplo, a fosfoenolpiruvato-carbóxi quinase (EC 4.1.1.49) (vide também a DE-A-199 50 409),

E₂₉ que catalisam a reação de piruvato para acetato, tal como, por exemplo, a piruvato quinase (EC 1.2.2.2) (vide também a DE-A-199 51 975),

15 E₃₀ que catalisam a reação de α -D-glicose-6-fosfato para β -D-frutose-6-fosfato (vide também a US 09/396.478),

E₃₁ que catalisam a reação de beta-alanina para carnosina, como, por exemplo, a carnosina sintase (EC 6.3.2.11),

E₃₂ que catalisam a reação de beta-alanina para alfa-alanina, 20 como, por exemplo, a alanina-aminomutase,

E₃₃ que catalisam a reação de beta-alanina para (R)-pantotenato, como, por exemplo, a pantotenato-beta-alanina ligase (EC 6.3.2.1),

E₃₄ que catalisam a reação de beta-alanina para N-carbonil-beta-alanina, como, por exemplo, a beta-ureidopropionase (EC 3.5.1.6),

25 E₃₅ que catalisam a reação de piruvato para lactato, como, por exemplo, a l-lactato desidrogenase (EC 1.1.1.27) ou a lactato-malato-transhidrogenase EC 1.1.99.7),

E₃₆ que catalisam a reação de piruvato para acetil-coenzima A, como, por exemplo, a piruvato desidrogenase (EC 1.2.1.51),

30 E₃₇ que catalisam a reação de piruvato para acetilfosfato, como, por exemplo, a piruvato oxidase (EC 1.2.3.3),

E₃₈ que catalisam a reação de piruvato para acetato, como, por

exemplo, a piruvato desidrogenase (EC 1.2.2.2),

E₃₉ que catalisam a reação de piruvato para fosfoenolpiruvato, como, por exemplo, a fosfoenolpiruvato sintase (EC 2.7.9.2) ou a piruvato-fosfato diquinase (EC 2.7.9.1) e/ou

- 5 E₄₀ que catalisam a reação de piruvato para alanina, como, por exemplo, a alanina transaminase (2.6.1.2) ou a alanina-oxoácido transaminase (EC 2.6.1.12),

preferentemente em pelo menos 10%, de modo particularmente preferido em pelo menos 25%, além disso, preferentemente em pelo menos 50%, além disso, de modo ainda mais preferido, em pelo menos 75%, além disso, preferentemente em pelo menos 100% e do modo mais preferido possível, em pelo menos 500%, no máximo preferentemente até o máximo de 5.000%, particularmente até o máximo de 2.500%, sendo particularmente preferida a redução das enzimas E₂₈, E₃₀, E₃₃, E₃₅, E₃₆ e E₄₀.

- 15 O termo "reduzir" nessa relação, descreve a redução ou desligamento da atividade intracelular de uma ou mais enzimas em uma célula, que são codificadas pelo DNA correspondente, em que se utiliza, por exemplo, um promotor fraco ou se utiliza um gene ou alelo, que codifica para uma enzima correspondente com uma baixa atividade ou se inativa o gene correspondente e se combinam eventualmente essas medidas.

De acordo com uma forma de concretização particular das células de acordo com a invenção, pode ser especialmente conveniente, promover visadamente a via de pentose-fosfato, por exemplo, aumentando a atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49) e da 6-fosfogluconato desidrogenase (EC 1.1.1.44) e inibindo simultaneamente a glicólise, por exemplo, reduzindo a atividade da glicose-6-fosfato isomerase, tal como esta é descrita no WO-A-01/07626.

De acordo com uma forma de concretização particular da célula de acordo com a invenção, nesta a atividade da glutamato desidrogenase (EC 1.4.1.4) é aumentada por uma das técnicas mencionadas em relação com a enzima E_{1a}, E_{1b} e E₂. Os genes dessa enzima de inúmeros microorganismos também podem ser deduzidos na Base de dados KEGG GENE.

Além disso, na US 6.355.454 e no WO-A-00/53726 são descritos genes da glutamato desidrogenase e possibilidades para a superexpressão dessa enzima. O teor revelado desses impressos com respeito à execução da superexpressão da glutamato desidrogenase em células, é incluída nesse caso, como referência e forma uma parte da publicação da presente invenção.

Além disso, no caso das células geneticamente modificadas, de acordo com a invenção, é preferível, que essa beta-alanina e alfa-alanina se formem na proporção de peso de pelo menos 2 : 1, de modo particularmente preferido 3 : 1 e além disso, preferentemente pelo menos 4 : 1. Nesse caso, uma formação de beta-alanina e alfa-alanina na proporção de peso de pelo menos 2 : 1 significa, que as células formam, formam preferentemente pelo menos duas vezes mais beta-alanina como alfa-alanina dentro de um espaço de tempo de 29 horas a 37°C e liberam para o meio nutritivo que envolve as células.

Nessa relação é particularmente preferível, que nessas células de acordo com a invenção,

- a atividade da glutamato desidrogenase (EC 1.4.1.4) é aumentada e
- a atividade da piruvato carboxilase (EC 6.4.1.1) é aumentada e
- a atividade da aspartato descarboxilase (EC 4.1.1.11) é aumentada e
- a atividade da glicose-6-fosfato isomerase (EC 5.3.1.9) é reduzida.

A presente invenção refere-se especialmente a uma célula geneticamente modificada, que apresenta uma atividade de piruvato carboxilase aumentada (EC 6.4.1.1), preferentemente pela expressão do mutante descrito em "A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-Lysine-producing mutant" (Ohnishi et al., Applied Microbiology and Biotechnology 58: 217-223 (2002)) e

uma atividade de aspartato descarboxilase aumentada (EC 4.1.1.11), preferentemente por uma aspartato descarboxilase de *Corynebacterium glutamicum*

e pelo menos uma das, preferentemente todas as seguintes propriedades:

- atividade da coenzima A transferase aumentada (EC 2.8.3.1),
- atividade de beta-alanil-coenzima A-amônio lisase aumentada (EC 4.3.1.6) e
- atividade de 3-hidroxi- β -ketotransferase aumentada (EC 4.2.1. - especialmente EC 4.2.1.17).

Além disso, a presente invenção refere-se especialmente à célula geneticamente modificada, que apresenta

- uma atividade de fosfoenolpiruvato carboxilase aumentada (EC 4.1.1.31) e
- uma atividade de aspartato descarboxilase aumentada (EC 4.1.1.11), preferentemente por uma asparato descarboxilase de *Corynebacterium glutamicum*

e pelo menos uma das, preferentemente todas as seguintes propriedades:

- uma atividade da coenzima A transferase aumentada (EC 2.8.3.1),
- uma atividade da beta-alanil-coenzima A-amônio lisase aumentada (EC 4.3.1.6) e
- uma atividade da 3-hidroxi- β -ketotransferase aumentada (EC 4.2.1. - especialmente EC 4.2.1.17).

A presente invenção refere-se também a uma célula geneticamente modificada, que apresenta

- uma atividade de piruvato carboxilase aumentada (EC 6.4.1.1), preferentemente pela expressão do mutante descrito em "*A novel methodology employing Corynebacterium glutamicum genome information to generate a new L-Lysine-producing mutant*" (Ohnishi et al., Applied Microbiology and Biotechnology 58: 217-223 (2002)) e
- atividade de aspartato descarboxilase aumentada (EC 4.1.1.11), preferentemente por uma asparato descarboxilase de *Corynebacterium glutamicum*

e pelo menos uma das, preferentemente todas as seguintes propriedades:

- atividade da beta-alanin-2-oxoglutarato-amino transferase aumentada (EC 2.6.1.19) e

5 - atividade da 3-hidroxi propionato desidrogenase aumentada (EC 1.1.1.59).

Além disso, a presente invenção refere-se especialmente a uma célula geneticamente modificada, que apresenta

- atividade de fosfoenolpiruvato carboxilase aumentada (EC 4.1.1.31) e

- atividade de aspartato descarboxilase aumentadas (EC 4.1.1.11), preferentemente por uma asparato descarboxilase de *Corynebacterium glutamicum*

15 e pelo menos uma das, preferentemente todas as seguintes propriedades:

- atividade da beta-alanin-2-oxoglutarato-amino transferase aumentada (EC 2.6.1.19) e

- atividade da 3-hidroxi propionato desidrogenase aumentada (EC 1.1.1.59).

20 A presente invenção refere-se também a uma célula geneticamente modificada, que contém

- atividade de piruvato carboxilase aumentada (EC 6.4.1.1), preferentemente pela expressão do mutante descrito em "A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-Lysine-producing mutant" (Ohnishi et al., Applied Microbiology and Biotechnology 58: 217-223 (2002)) e

25 atividade de aspartato descarboxilase aumentada (EC 4.1.1.11), preferentemente por uma asparato descarboxilase de *Corynebacterium glutamicum*

30 e pelo menos uma das, preferentemente todas as seguintes propriedades:

- atividade da glicerol-3-fosfato desidrogenase aumentada (EC

1.1.99.5), preferentemente por uma glicerol-3-fosfato desidrogenase, que é codificada pelo gene glpD e

- atividade de glicerol quinase aumentada (EC 2.7.1.30), preferentemente por uma glicerol quinase, que é codificada pelo gene glpK,

5 sendo que no caso das células trata-se, nesse caso, preferentemente de micro-organismos da cepa *Corynebacterium glutamicum*.

Uma outra contribuição para a resolução dos objetivos mencionados acima é prestada pelos processos para a produção de uma célula geneticamente modificada, que é caracterizada por pelo menos uma das
10 propriedades C) ou D):

A) a célula geneticamente modificada é capaz de centrifugar beta-alanina para fora da célula,

B) a célula geneticamente modificada é capaz de reagir beta-alanina para ácido 3-hidroxipropiônico,

15 abrangendo pelo menos um, preferentemente dois dos estágios dos processos A) e B):

C) aumento da atividade de uma enzima E_{1a} em uma célula, que catalisa a reação de piruvato para oxalacetato, ou de uma enzima E_{1b} , que catalisa a reação de fosfoenolpiruvato para oxalacetato,
20

D) aumento da atividade de uma enzima E_2 em uma célula, que catalisa a reação de aspartato para beta-alanina.

No caso das enzimas E_{1a} , E_{1b} e E_2 trata-se preferentemente daquelas enzimas, que já foram descritas em relação com as células de acordo com a invenção. O aumento das atividades das enzimas mencionadas acima é preferentemente efetuado de acordo com os processos genéticos descritos em relação com as células de acordo com a invenção e também meio descrito em relação com as células de acordo com a invenção. Como células, nas quais a atividade das enzimas E_{1a} ou E_{1b} e/ou E_2 é aumentada, utilizam-se preferentemente aqueles gêneros e cepas, que já foram mencionados
25
30 acima em relação com as células geneticamente modificadas de acordo com a invenção.

Células utilizadas de modo particularmente preferido no processo de acordo com a invenção, são aquelas dos gêneros *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Bacillus*, *Escherichia* e *Clostridium*, em que *Bacillus* 5 *flavum*, *Bacillus lactofermentum*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida blankii*, *Candida rugosa*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium efficiens* e *Pichia pastoris*, além disso, são preferidos e *Corynebacterium glutamicum* é ou são os mais preferidos. Especialmente no processo de acordo com a invenção, podem ser utilizadas

10 células selecionadas do grupo que consiste nas cepas do tipo selvagem *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC15806, *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870, *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539, *Corynebacterium melassecola* ATCC17965, *Brevibacterium flavum* ATCC14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 e *Brevibacterium divaricatum* ATCC14020. Além disso, preferem-se bactérias já geneticamente modificadas, nas quais a atividade de pelo uma das enzimas E_3 até E_{25} ou então uma das atividades das enzimas E_{1a} , E_{1b} ou E_2 são aumentadas e eventualmente uma ou várias das atividades das enzimas E_{26} até E_{38} são reduzidas. Entre essas células gene-

20 ticamente modificadas prefere-se especialmente a cepa *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 DM1727 (Georgi et al., *Metabolic Engineering* 7: 291-301 (2005)), que apresenta uma piruvato carboxilato exógena com uma mutação de aminoácido na posição 458 (substitui prolina por serina, vide "A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant" (Ohnishi et al., *Applied Microbiology and Biotechnology* 58: 217-223 (2002)).

25

Células, que estão em condição de centrifugar beta-alanina para fora da célula (e que dessa maneira satisfazem a condição C)), são preferentemente aquelas células, que em comparação com seu tipo selvagem,

30 apresentam um efluxo aumentado, preferentemente aumentado em pelo menos 10%, de modo particularmente preferido em pelo menos 25%, além disso, preferentemente em pelo menos 50%, além disso, de modo ainda

mais preferido, em pelo menos 75%, além disso, preferentemente em pelo menos 100% e do modo mais preferido possível, em pelo menos 500%, no máximo preferentemente em 5.000%, de modo particularmente preferido em 2.500%, de beta-alanina da célula, sendo que esse efluxo aumentado é preferentemente possibilitado por uma atividade aumentada de uma enzima, que catalisa o efluxo de beta-alanina para fora da célula. Células, que estão em condição, de reagir beta-alanina para ácido 3-hidroxipropiônico (e dessa maneira satisfazer a condição D)), são especialmente aquelas células, nas quais a atividade de pelo menos uma, preferentemente de todas as enzimas E₃ até E₆ descritas em relação com as células de acordo com a invenção, ou células, nas quais a atividade de pelo menos uma, preferentemente das duas enzimas E₇ e E₈ descritas em relação com as células de acordo com a invenção, é aumentada.

Além disso, de acordo com a invenção é preferível, que o processo para a produção de células geneticamente modificadas também compreenda outros estágios de processos, tais como, por exemplo, o aumento da atividade de uma ou várias das enzimas E₉ até E₂₇ descritas em relação com as células de acordo com a invenção, ou a redução da atividade das enzimas E₂₈ até E₄₀ descritas em relação com as células de acordo com a invenção.

As células geneticamente modificadas obteníveis pelo processo descrito acima, também contribuem para a resolução dos objetivos mencionados acima. Essas estão em condição, sozinhas ou então em combinação com outras células de carboidratos ou de glicerina, de formar ácido 3-hidroxipropiônico.

Uma outra contribuição para a resolução dos objetivos mencionados acima é prestada por um processo para a produção de ácido 3-hidroxipropiônico, abrangendo os estágios do processo

i) de pôr as células geneticamente modificadas, de acordo com a invenção, que apresentam a propriedade c) ou C), em contato com um meio nutritivo contendo carboidratos ou glicerina com condições, nas quais, a partir dos carboidratos ou da glicerina forma-se a beta-alanina, que

pelo menos parcialmente chega da célula ao meio nutritivo, de maneira que se obtém um meio nutritivo contendo uma beta-alanina,

- ii) pôr o meio nutritivo contendo a beta-alanina em contato com uma outra célula, que é capaz de absorver a beta-alanina e reagir para
5 ácido 3-hidroxipropiônico.

Como células capazes de absorver beta-alanina e reagir para ácido 3-hidroxipropiônico, são especialmente preferidas aquelas células, nas quais a atividade de pelo menos uma, preferentemente de todas as enzimas E_3 até E_6 ou então de células, nas quais a atividade de pelo menos uma,
10 preferentemente das duas enzimas E_7 e E_8 em relação ao tipo selvagem foi preferentemente aumentada. Essas células são descritas, por exemplo, no WO-A-02/42418 e no WO-A-03/62173. Além disso, particularmente são preferidas aquelas células, nas quais adicionalmente a essas atividades enzimáticas, também foi aumentada a atividade das enzimas, as quais aumen-
15 tam o transporte ou efluxo de beta-alanina para o interior das células. Nessa relação prefere-se especialmente o transportador GABA GAT-2, bem como o sistema de transporte codificado pelo gene *cycA*, que é descrito em Schneider et al., (Appl. Microbiol. Biotechnol. 65: 576-582 (2004)).

As células geneticamente modificadas, de acordo com a inven-
20 ção, podem ser postas em contato com o meio nutritivo no estágio do processo i) continua ou descontinuamente no processo em batelada (cultivo em conjunto) ou no processo em batelada alimentada (processo de alimentação) ou processo em batelada alimentada repetido (processo de alimentação repetitivo) com a finalidade de produzir beta-alanina e dessa maneira cultiva-
25 das. É concebível, também, um processo semicontínuo, tal como é descrito na GB-A-1009370. Um resumo sobre conhecidos métodos de cultivo são descritos no compêndio de Chmiel ("Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik" (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) ou no compêndio de Storhas ("Bioreaktoren und periphere Einrichtungen", Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994).
30

O meio de cultura a ser utilizado precisa satisfazer de maneira adequada às reivindicações das respectivas cepas. Descrições de meios de

cultura de diversos micro-organismos estão contidas no compêndio "*Manual of Methods for General Bacteriology*" da American Society of Bacteriology (Washington D.C., EUA, 1981).

5 Como fonte de carbono podem ser utilizados açúcares e carboi-
dratos, tais como, por exemplo, glicose, sacarose, lactose, frutose, maltose,
melaço, amido e celulose, óleos e gorduras, tais como, por exemplo, óleo de
soja, óleo de girassol, óleo de amendoim e óleo de linhaça, álcoois, tais co-
mo, por exemplo, glicerina e etanol e ácidos orgânicos, tal como, por exem-
plo, ácido acético. Essas substâncias podem ser utilizadas individualmente
10 ou como mistura. A utilização de carboidratos, especialmente monossacári-
deos, oligossacarídeos ou polissacarídeos, tais como descritos na US
6.01.494 e US 6.136.576, de C₅-açúcares ou de glicerina é particularmente
preferida.

15 Como fonte de nitrogênio podem ser utilizados compostos orgâ-
nicos contendo nitrogênio, tais como peptonas, extrato de levedura, extrato
de carne, extrato de malte, água de fonte de milho, feijão de soja e ureia ou
compostos inorgânicos, tais como sulfato de amônio, cloreto de amônio, fos-
fato de amônio, carbonato de amônio e nitrato de amônio. As fontes de ni-
trogênio podem ser utilizadas individualmente ou como mistura.

20 Com fonte de fósforo podem ser utilizados ácido fosfórico, di-
hidrogenofosfato de potássio ou hidrogenofosfato dipotássico ou os sais con-
tendo sódio correspondentes. Além disso, o meio de cultura precisa conter
sais de metais, tal como, por exemplo, sulfato de magnésio ou sulfato de
ferro, que são necessários para o crescimento. Finalmente, substâncias de
25 crescimento essenciais, tais como aminoácidos e vitaminas podem ser utili-
zadas adicionalmente às substâncias mencionadas acima. Ao meio de cultu-
ra podem ser acrescentados, além disso, pré-estágios adequados. As subs-
tâncias de aplicação mencionadas podem se acrescentadas à cultura na
forma de uma preparação única ou acrescentadas de maneira adequada
30 durante o cultivo.

Para o controle do pH da cultura utilizam-se compostos básicos,
tais como (hidrogeno)carbonato de sódio, hidróxido de sódio, hidróxido de

potássio, amoníaco ou água amoniacal ou compostos ácidos, tais como ácido fosfórico ou ácido sulfúrico de maneira adequada. Para o controle do desenvolvimento de espuma podem ser utilizados antiespumantes, tais como, por exemplo, ésteres poliglicólicos de ácido graxo. Para a manutenção da estabilidade de plasmídeos o meio pode ser acrescido de substâncias de efeito seletivo, tais como, por exemplo, antibióticos. Para manter as condições aeróbicas, introduzem-se oxigênio ou misturas gasosas contendo oxigênio, tal como, por exemplo, ar, na cultura. A temperatura da cultura encontra-se normalmente em 20°C até 45°C e preferentemente em 25°C até 40°C.

10 Especialmente quando são utilizadas células, as quais podem transformar glicerina como substrato, pode ser preferível, utilizar como células aquelas células, que são descritas na US 6.803.218 e aumentar nessas células a atividade das enzimas E_{1a} ou E_{1b} (bem como eventualmente das outras enzimas E_3 até E_{20}). Neste caso, as células podem ser cultivadas a temperaturas na faixa de 40 até 100°C.

Simultaneamente com a formação de beta-alanina ou separadamente deste estágio de processo, o meio nutritivo contendo beta-alanina é posto em contato com as outras células, as quais estão em condição, de absorver a beta-alanina e reagir para ácido 3-hidroxipropiônico. Neste caso,

20 as células de acordo com a invenção e as outras células podem ser cultivadas juntas em um meio nutritivo, de maneira que a beta-alanina distribuída pelas células de acordo com a invenção, é absorvida quase *in statu nascendi* pelas outras células e reagida para ácido 3-hidroxipropiônico.

Mas também é concebível, formar inicialmente um meio nutritivo contendo beta-alanina, separar deste as células de acordo com a invenção e somente depois pôr este meio nutritivo contendo beta-alanina em contato com as outras células. No entanto, prefere-se particularmente o cultivo simultâneo das células de acordo com a invenção e das outras.

25

O processo para a produção de ácido 3-hidroxipropiônico de acordo com a invenção, pode abranger como outro estágio do processo iii), também a purificação do ácido 3-hidroxipropiônico finalmente obtido do meio nutritivo. Essa purificação pode ser efetuada por qualquer processo de puri-

30

5 ficação conhecido pelo técnico. Dessa maneira, por exemplo, podem ser utilizados processos de sedimentação, filtração ou centrifugação, para separar as células. O ácido 3-hidroxipropiônico do meio nutritivo contendo ácido 3-hidroxipropiônico, libertado de células pode ser isolado através de extração, destilação, permuta de íons, eletrodíálise ou cristalização.

10 A purificação do ácido 3-hidroxipropiônico da solução nutritiva é efetuada continuamente de acordo com uma concretização particular do processo de acordo com a invenção, sendo que nessa relação prefere-se, além disso, efetuar também a fermentação continuamente, de maneira que
15 todo o processo da reação enzimática dos produtos de partida com formação de ácido 3-hidroxipropiônico até a purificação do ácido 3-hidroxipropiônico possa ser efetuado continuamente a partir do meio nutritivo. Para a purificação contínua do ácido 3-hidroxipropiônico do meio nutritivo, este é continuamente conduzido através de um dispositivo para a separação das
20 células utilizadas na fermentação, preferentemente através de um filtro com um tamanho de espaço em uma faixa de 20 até 200 kDa, no qual se realiza uma separação de sólido/líquido. É concebível, também, a utilização de uma centrífuga, de um dispositivo de sedimentação adequado ou de uma combinação desses dispositivos, sendo particularmente preferível, separar pelo
25 menos uma parte das células inicialmente através de sedimentação e em seguida, aduzir o meio nutritivo parcialmente libertado pelas células, a um dispositivo de ultracentrifugação ou centrifugação.

30 O produto de fermentação enriquecido com respeito a sua proporção de ácido 3-hidroxipropiônico é admitido em uma instalação de separação preferentemente de multiestágios após a separação das células. Nessa instalação de separação são previstos vários estágios de separação conectados em série, dos quais desembocam em cada caso canalizações de realimentação, que são reconduzidos para o segundo tanque de fermentação. Além disso, dos respectivos estágios de separação saem derivações.
35 Os estágios de separação individuais podem trabalhar pelo princípio da eletrodíálise, da osmose invertida, da ultrafiltração ou da nanofiltração. Via de regra, no caso dos estágios de separação individuais trata-se de dispositivos

de separação de membrana. A seleção dos estágios de separação individuais resulta do tipo e volume dos subprodutos de fermentação e resíduos de substratos.

Além da separação do ácido 3-hidroxipropiônico por meio de eletrodialise, osmose invertida, ultrafiltração ou nanofiltração, em cujo decurso é obtida uma solução de ácido 3-hidroxipropiônico aquosa como produto final, o ácido 3-hidroxipropiônico também pode ser separado do meio nutritivo libertado das células por processos de extração, sendo que neste caso, finalmente, obtém-se o ácido 3-hidroxipropiônico puro. Para separar o ácido 3-hidroxipropiônico através de extração, o meio nutritivo, no qual o ácido 3-hidroxipropiônico está presente como sal de amônio, pode ser acrescido, por exemplo, de aminas orgânicas com ponto de ebulição elevado. Em seguida, a mistura obtida dessa maneira é aquecida, desprendendo-se amoníaco e água e o ácido 3-hidroxipropiônico é extraído para a fase orgânica. Este processo designado como "salt-splitting" é mostrado no WO-A-02/090312, cujo teor revelado com respeito à separação de ácido 3-hidroxipropiônico de meios nutritivos, neste caso, é introduzido como referência e forma uma parte da publicação do presente pedido.

Uma contribuição para a resolução do objetivo inicialmente mencionado, também é prestada por um processo para a produção de ácido 3-hidroxipropiônico, abrangendo o estágio do processo do contato de uma célula de acordo com a invenção, que apresenta a propriedade d) ou D), com um meio nutritivo contendo carboidratos e glicerina com condições, nas quais, a partir dos carboidratos ou da glicina, forma-se o ácido 3-hidroxipropiônico. O cultivo é essencialmente efetuado do mesmo modo como no processo para a produção de ácido 3-hidroxipropiônico descrito acima, sendo que, no entanto, neste caso, são utilizadas células geneticamente modificadas, de acordo com a invenção, que podem reagir beta-alanina para ácido 3-hidroxipropiônico. Células de acordo com a invenção, que estão em condição para este fim, já foram detalhadamente descritas acima.

Como outro estágio do processo, também este processo para a produção de ácido 3-hidroxipropiônico pode abranger a purificação do ácido

3-hidroxipropiônico do meio nutritivo.

Além disso, um processo para a produção de ácido acrílico contribui para a resolução dos objetivos mencionados acima, abrangendo os estágios do processo

- 5 I) produção de ácido 3-hidroxipropiônico pelos processos descritos acima, eventualmente seguida de um ou vários estágios de purificação,
- II) desidratação do ácido 3-hidroxipropiônico formando-se ácido acrílico.

- 10 A desidratação do ácido 3-hidroxipropiônico pode ser fundamentalmente efetuada em fase líquida ou na fase gasosa, preferindo-se uma desidratação da fase líquida. Além disso, prefere-se de acordo com a invenção, que a desidratação seja efetuada na presença de um catalisador, sendo que o tipo do catalisador utilizado depende do fato, se é efetuada uma reação da
- 15 fase gasosa ou uma da fase líquida. Como catalisadores de desidratação tomam-se em consideração tanto catalisadores ácidos, como também alcalinos. Catalisadores ácidos são preferidos especialmente devido a baixa tendência à formação de oligômeros. O catalisador de desidratação pode ser utilizado tanto como catalisador homogêneo, como também heterogêneo.
- 20 Em seguida à desidratação, obtém-se uma fase contendo ácido acrílico, que pode ser eventualmente purificada por outros estágios de purificação, especialmente por processos de destilação, processos de extração o processos de cristalização ou então por uma combinação desses processos.

- 25 Uma outra contribuição para a resolução dos objetivos mencionados acima é prestada também por um processo para a produção de poliacrilatos, abrangendo os estágios do processo

- I) produção de ácido 3-hidroxipropiônico por um dos processos descritos acima, eventualmente seguida de um ou mais estágios de purificação,
- 30 II) desidratação do ácido 3-hidroxipropiônico com formação de ácido acrílico de acordo com os processos descritos acima, eventualmente seguida de um ou mais estágios de

purificação,

III) polimerização radical do ácido acrílico.

A polimerização radical do ácido acrílico é efetuada por processos de polimerização conhecidos pelo técnico e pode ser efetuada tanto em
5 uma emulsão ou suspensão, como também em solução aquosa. Além disso, na polimerização podem estar presentes outros comonômeros, especialmente reticuladores. De modo particular, prefere-se a polimerização radical do ácido acrílico obtido no estágio do processo II) em forma pelo menos parcialmente neutralizada na presença de reticuladores. Nessa polimerização são
10 obtidos hidrogéis, que depois podem ser triturados, moídos e eventualmente superficialmente modificados, especialmente superficialmente reticulados. Os polímeros obtidos dessa maneira prestam-se especialmente para a aplicação como superabsorventes em artigos higiênicos, tais como, por exemplo, fraldas ou absorventes femininos.

15 Uma contribuição para a resolução dos objetivos mencionados acima é prestada também por um processo para a produção de ésteres de ácido acrílico, abrangendo os estágios do processo

I) produção de ácido 3-hidroxipropiônico por um dos processos descritos acima, eventualmente seguida de um mais
20 estágios de purificação,

II) desidratação do ácido 3-hidroxipropiônico com formação de ácido acrílico de acordo com um dos processos descritos acima, eventualmente seguida de um ou mais estágios de purificação,

25 III) esterificação do ácido acrílico.

A esterificação do ácido acrílico é efetuada por processos de esterificação conhecidos pelo técnico, de modo particularmente preferido pelo fato, de que o ácido acrílico obtido no estágio do processo II) é posto em contato com álcoois, preferentemente com metanol, etanol, 1-propanol,
30 2-propanol, n-butanol, terc-butanol ou iso-butanol e aquecido a uma temperatura de pelo menos 50°C, de modo particularmente preferido, pelo menos 100°C. A água formada na esterificação pode ser eventualmente removida

da mistura de reação através da adição de agentes auxiliares de separação adequados por meio de destilação azeotrópica.

Uma outra contribuição para a resolução dos objetivos mencionados acima é prestada pela utilização de uma célula geneticamente modificada em relação ao seu tipo selvagem, que apresenta pelo menos uma, preferentemente duas das propriedades a) e b):

a) uma atividade aumentada em comparação com seu tipo selvagem, preferentemente aumentada em pelo menos 10%, de modo particularmente preferido, em pelo menos 25%, além disso, preferentemente em pelo menos 50%, além disso, de modo ainda mais preferido, em pelo menos 75%, além disso, preferentemente em pelo menos 100% e do modo mais preferido possível, em pelo menos 500%, no máximo, preferentemente em até 5.000%, de modo particularmente preferido, em até 2.500%, de uma enzima E_{1a}, que catalisa a reação de piruvato para oxalacetato ou de uma enzima E_{1b}, que catalisa a reação de fosfoenolpiruvato para oxalacetato, preferentemente no entanto, de uma enzima E_{1a}, que catalisa a reação de piruvato para oxalacetato,

b) uma atividade aumentada em comparação com seu tipo selvagem, preferentemente aumentada em pelo menos 10%, de modo particularmente preferido, em pelo menos 25%, além disso, preferentemente em pelo menos 50%, além disso, de modo ainda mais preferido, em pelo menos 75%, além disso, preferentemente em pelo menos 100% e do modo mais preferido, em pelo menos 500%, no máximo, preferentemente em até 5.000%, de modo particularmente preferido, em até 2.500%, de uma enzima E₂, que catalisa a reação de aspartato para beta-alanina, para a produção de ácido 3-hidroxipropiônico.

A presente invenção é detalhadamente elucidada com base nas figuras e exemplos não-restritivos.

A figura 1 mostra o esquema de reação para a formação de beta-alanina a partir da glicose ou glicerina através de piruvato, oxalacetato e aspartato.

A figura 2 mostra o esquema de reação para a formação de áci-

do 3-hidroxiopropiônico a partir de beta-alanina através de beta-alanil-coenzima A, acrilil-coenzima A e 3-hidroxiopropionil-coenzima A ou através de semialdeído de ácido malônico.

A figura 3 mostra o vetor de plasmídeo pVWex1-panD.

5 A figura 4 mostra o vetor de plasmídeo pVWex1-glpKD_{E.C.}

A figura 5 mostra o vetor de plasmídeo pVWex1-panD-glpKD_{E.C.}

Exemplo

Foi produzida uma célula geneticamente modificada da cepa *Corynebacterium glutamicum*, em que foram expressidos os genes heterólogos glpK, glpD e os genes homólogos pyc e panD. Nesse caso, procedeu-se tal como segue:

Como cepas de partida utilizaram-se a cepa do tipo selvagem ATCC13032 (depositado na Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig com o número DSM 20300) e a cepa 15 DM1727. A cepa DM1727 foi descrita por Georgi et al. (Metabolic Engineering 7: 291-301 (2005)) e representa uma cepa de *Corynebacterium glutamicum* geneticamente modificada, que apresenta uma atividade aumentada da piruvato carboxilase em relação à cepa do tipo selvagem. Essa atividade aumentada da enzima é atribuída a uma mutação do aminoácido na posição 20 458 (permuta de prolina por serina). Para isso, vide também "A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant" (Ohnishi et al., Applied Microbiology and Biotechnology 58: 217-223 (2002)).

1. Produção dos vetores de plasmídeos

25 Inicialmente foram sintetizados os dois seguintes iniciador PCR (o nucleotídeo sublinhado corresponde ao par de bases no genoma *E. coli* MG1655 (GenBank Reference Sequence NC 000913 U00096), pontos de inserção são impressos em negrito):

glpK_{rev}: 5'TCTAGATTTATTCGTCGTGTTCTTCCCACGCC (SEQ ID nº 2) (o 30 nucleotídeo sublinhado corresponde ao par de bases 4113737 no genoma MG1655, o ponto de inserção corresponde a um ponto de inserção XbaI)
glpK_{for}: 5'GGGACGTCGACAAGGAGATATAGATGACTGAAAAAAAAATATATC

(SEQ ID nº 3) (o nucleotídeo sublinhado corresponde ao par de bases 4115245 no genoma MG1655, o ponto de inserção corresponde a um ponto de inserção Sa1I)

Os iniciadores corresponderam às bases 4113737 até 4113762 e 4115225 até 4115245 do gene *glpK* de *E. coli*. Com esses iniciadores, foi possível amplificar um fragmento de 1533 pares de bases de DNA cromossomal de *E. coli* por meio de PCR segundo o método padronizado de Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) para iniciadores homólogos, não-degenerados, o qual foi isolado, tal como descrito por Eikmanns et al. (Microbiology, 140: 1817-1828 (1994)).

Esse fragmento de PCR foi clonado no vetor de plasmídeo pGEM-T (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EUA) obtendo-se um vetor de plasmídeo pGEM-T-*glpK*_{E.C.}

Subsequentemente, foram sintetizados os dois iniciadores PCR seguintes (o nucleotídeo sublinhado corresponde ao par de bases no genoma MG1655 da *E. coli*, pontos de inserção são impressos em negrito e a região cursiva marca um ponto de ligação de ribossomo):

*glpD*_{for}: 5'**TCTAGAAAGGAGATATAGATGGAAACCAAAGATCTG** (SEQ ID nº 4) (o nucleotídeo sublinhado corresponde ao par de bases 3560036 no genoma MG1655, o ponto de inserção corresponde a um ponto de corte XbaI)

*glpD*_{rev}: 5'**GTTAATTCTAGATTACGACGCCAGCGATAA** (SEQ. ID nº 5) (o nucleotídeo sublinhado corresponde ao par de bases 3561541 no genoma MG1655, o ponto de corte corresponde a um ponto de corte XbaI)

Os iniciadores corresponderam às bases 3560036 até 3560053 e 3561524 até 3561541 do gene *plpD* de *E. coli*. Com esses iniciadores foi possível amplificar um fragmento de 1524 pares de bases de DNA cromossomal de *E. coli* por meio de PCR segundo o método padronizado de Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) para iniciadores homólogos, não-degenerados, o qual foi isolado, tal como descrito por Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817-1828 (1994)).

Esse fragmento de PCR foi clonado no vetor de plasmídeo

pGEM-T (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EUA) obtendo-se o vetor de plasmídeo pGEM-T-glpD_{E.C.}

Em seguida, o fragmento do par de bases 1524 foi recortado com Xba1I do vetor de plasmídeo pGEM-T glpD_{E.C.} e clonado no vetor de plasmídeo pGEM-T-glpK_{E.C.} cortado com SpeI-SAP (SAP = fosfatase alcalina de camarão) mantendo o vetor de plasmídeo pGEM-T-glpKD_{E.C.} Em seguida, o fragmento glpKD_{E.C.} foi recortado por meio de Sa1I e clonado no vetor de plasmídeo pVWEx1 cortado com Sa1I (esse plasmídeo de expressão foi descrito por Peters-Wendisch et al., Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 3: 295-300 (2001) obtendo-se o vetor de plasmídeo pVWEx1-glpKD_{E.C.}

Subsequentemente, os dois iniciadores PCR seguintes foram sintetizados (o nucleotídeo sublinhado corresponde ao par de bases no genoma de *Corynebacterium glutamicum* (NC003450), pontos de inserção são impressos em negrito e regiões cursivas marcam um ponto de ligação do ribossomo):

NCg10133_{for}: 5'GGACACTAGTAAGGAGATATAGATGCTGCGCA
CCATCCTC (SEQ. ID nº 6) (o nucleotídeo sublinhado corresponde ao par de bases 145570 no genoma de *Corybacterium glutamicum*, o ponto de inserção corresponde a um ponto de inserção SpeI).

NCg10133_{rev}: 5'CTAAAACGGGTACCCTAAATGCTTCTCGACGTC
(SEQ. ID nº 7) (o nucleotídeo sublinhado corresponde ao par de bases 147980 no genoma de *Corybacterium glutamicum*, o ponto de inserção corresponde a um ponto de inserção KpnI).

Os iniciadores corresponderam às bases 247570 até 147588 e 147964 até 147980 do gene panD de *C. glutamicum*. Com esses iniciadores foi possível amplificar um fragmento de aproximadamente 430 pares de bases de DNA cromossomal de *C. glutamicum* por meio de PCR segundo o método padronizado por Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press), o qual foi isolado, tal como descrito por Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817-1828 (1994)).

Esse fragmento de PCR foi clonado no vetor de plasmídeo

pGEM-T (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EUA) obtendo-se um vetor de plasmídeo pGEM-T-panD.

Em seguida, o fragmento panD foi recortado por meio de SpeI e KpnI de pGEM-T-panD e clonado no vetor de plasmídeo pVWEx1 cortado com XbaI e KpnI, obtendo-se o vetor de plasmídeo pVWEx1-panD. Além disso, o fragmento panD cortado do pGEM-T-panD por meio de SpeI e KpnI foi clonado no vetor de plasmídeo pVWEx1-glpKD_{E.C.} cortado com XbaI e KpnI, obtendo-se o vetor de plasmídeo pVWEx1-panD-glpKD_{E.C.} (SEQ. ID nº 1).

Os vetores de plasmídeos pVWEx1-panD, pVWEx1-glpKD_{E.C.} e pVWEx1-panD-glpKD_{E.C.} (SEQ. ID nº 1) são mostrados nas figuras 3 a 5.

2. Transformação das células

Nas cepas de partida inicialmente mencionadas, os plasmídeos de expressão pVWEx1, pVWEx1-panD_{C.G.}, pVWEx1-glpKD_{E.C.} e pVWEx1-glpKD_{E.C.}-panD_{C.G.} foram introduzidos por meio de eletroporação (segundo van der Rest et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 52: 541-545 (1999)).

3. Cultivo das células

Com glicose como fonte de carbono.

As cepas transformadas com esses plasmídeos foram cultivadas em meio CGXII, o qual foi descrito por Georgi et al. (Metabolic Engineering 7: 291-301 (2005)) e por Marx et al. (US 6.355.454). O meio continha 40 g/kg de glicose.

A concentração de alfa- ou beta-alanina foi comprovada por meio de HPLC. O método foi descrito por Georgi et al. (Metabolic Engineering 7: 291-301 (2005)) e por Marx et al. (US 6.355.454). Para a identificação do sinal da alfa-alanina ou beta-alanina foi utilizado um padrão correspondente.

Depois de um cultivo das células por 29 horas foram medidas as seguintes concentrações de alfa-alanina e beta-alanina no meio nutritivo:

Cepa de <i>C. glutamicum</i>	alfa-alanina	beta-alanina
ATCC13032 (pVWEx1)	20,4 mM	< 1 mM
ATCC13032 (pVWEx1-panD _{C.G.})	15,5 mM	23,9 mM
DM1727 (pVWEx1-panD _{C.G.})	5,0 mM	18,6 mM

3.2. Com glicerina como fonte de carbono

As cepas transformadas com esses plasmídeos foram cultivadas em meio CGXII, o qual foi descrito por Georgi et al. (Metabolic Engineering 7: 291-301 (2005)) e por Marx et al. (US 6.355.454). O meio continha 9 g/kg de glicerina.

5 A concentração de alfa- ou beta-alanina foi comprovada por meio de HPLC. O método foi descrito por Georgi et al. (Metabolic Engineering 7: 291-301 (2005)) e por Marx et al. (US 6.355.454). Para a identificação do sinal da alfa-alanina ou beta-alanina foi utilizado um padrão correspondente.

10 Depois de um cultivo das células por 24 horas foram medidas as seguintes concentrações de alfa-alanina e beta-alanina no meio nutritivo:

Cepa de <i>C. glutamicum</i>	alfa-alanina	beta-alanina
ATCC13032 (pVWEx1-glpKD _{E.C.})	2,8 mM	< 1 mM
ATCC13032 (pVWEx1-glpKD _{E.C.} panD _{C.G.})	3 mM	0,5 mM
DM1727 (pVWEx1-glpD _{E.C.} panD _{C.G.})	0,4 mM	0,5 mM

REIVINDICAÇÕES

1. Célula geneticamente modificada em relação ao seu tipo selvagem, caracterizada pelo fato de que apresenta pelo menos uma das propriedades a) ou b):

- 5 a) uma atividade aumentada em comparação com seu tipo selvagem de uma enzima E_{1a} , que catalisa a reação de piruvato para oxalacetato ou de uma enzima E_{1b} , que catalisa a reação de fosfoenolpiruvato para oxalacetato,
- 10 b) uma atividade aumentada em comparação com seu tipo selvagem de uma enzima E_2 , que catalisa a reação de aspartato para beta-alanina,

sendo que as células, além das propriedades a) ou b), é caracterizada por pelo menos uma das propriedades c) ou d):

- 15 c) a célula geneticamente modificada é capaz de centrifugar beta-alanina para fora da célula,
- d) a célula geneticamente modificada é capaz de reagir beta-alanina para ácido 3-hidroxipropiônico.

2. Célula de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a enzima E_1 é uma piruvato carboxilase.

20 3. Célula de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a atividade aumentada da enzima E_1 é através de uma mutação do gene piruvato carboxilase do tipo selvagem da célula.

4. Célula de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que a enzima E_2 é uma aspartato descarboxilase.

25 5. Célula de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que apresenta a propriedade d), em que a célula apresenta uma atividade aumentada em comparação com seu tipo selvagem, de pelo menos uma das seguintes enzimas E_3 até E_6 :

- 30 - de uma enzima E_3 , que catalisa a reação de beta-alanina para beta-alanil-coenzima A,
- de uma enzima E_4 , que catalisa a reação de beta-alanil-coenzima A para acrilil-coenzima A,

- de uma enzima E₅, que catalisa a reação de acrilil-coenzima A para 3-hidroxiopropionil-coenzima A,

- de uma enzima E₆, que catalisa a reação de 3-hidroxiopropionil-coenzima A para ácido 3-hidroxiopropiônico.

5 6. Célula de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que a enzima

E₃ é uma coenzima A transferase ou coenzima A sintetase,

E₄ é uma beta-alanil-coenzima A-amônio lisase,

E₅ é uma 3-hidroxiopropionil-coenzima A desidratase e

10 E₆ é uma coenzima A transferase, 3-hidroxiopropionil-coenzima A hidrolase ou 3-hidroxiobutiril-coenzima A hidrolase.

7. Célula de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que apresenta a propriedade d), em que a célula apresenta uma atividade aumentada em comparação com seu tipo selvagem de pelo menos uma das seguintes enzimas E₇ e E₈:

- de uma enzima E₇, que catalisa a reação de beta-alanina para semialdeído de ácido malônico,

- de uma enzima E₈, que catalisa a reação de semialdeído de ácido malônico para ácido 3-hidroxiopropiônico.

20 8. Célula de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que a enzima

E₇ é uma beta-alanin-2-oxoglutarato aminotransferase e

E₈ é uma 3-hidroxiopropionil desidrogenase ou 3-hidroxiobutirato desidrogenase.

25 9. Célula de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que a célula apresenta uma atividade de fosfoglucoisomerase reduzida em comparação com seu tipo selvagem.

10. Processo para a produção de uma célula geneticamente modificada, que apresenta por pelo menos uma das propriedades C) ou D):

30 A) a célula geneticamente modificada é capaz de centrifugar beta-alanina para fora da célula,

B) a célula geneticamente modificada é capaz de reagir beta-

alanina para ácido 3-hidroxipropiônico,

caracterizado pelo fato de que abrange pelo menos um, preferentemente dois dos estágios dos processos A) e B):

5 A) aumento da atividade de uma enzima E_{1a} em uma célula, que catalisa a reação de piruvato para oxalacetato ou de uma enzima E_{1b} , que catalisa a reação de fenolenol piruvato para oxalacetato ou

B) aumento da atividade de uma enzima E_2 em uma célula, que catalisa a reação de aspartato para beta-alanina.

10 11. Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a enzima E_{1a} é uma piruvato carboxilase e a enzima E_{1b} é uma fosfoenolpiruvato carboxilase.

12. Processo de acordo com a reivindicação 10 ou 11, caracterizado pelo fato de que a enzima E_2 é uma aspartato descarboxilase.

15 13. Célula, caracterizada pelo fato de que pode ser obtida por um processo como definido em qualquer uma das reivindicações 10 a 12.

14. Processo para a produção de ácido 3-hidroxipropiônico, caracterizado pelo fato de que os estágios

20 i) de pôr uma célula como definido em uma das reivindicações 1 a 9 ou 13, que apresenta a propriedade c), em contato com um meio nutritivo contendo carboidratos ou glicerina com condições, nas quais a partir dos carboidratos ou da glicerina, se forma beta-alanina, que pelo menos em parte chega da célula ao meio nutritivo, de maneira que se obtém um meio nutritivo contendo beta-alanina;

25 ii) pôr o meio nutritivo contendo a beta-alanina em contato com uma outra célula, que é capaz de absorver a beta-alanina e reagir para ácido 3-hidroxipropiônico.

30 15. Processo para a produção de ácido 3-hidroxipropiônico, caracterizado pelo fato de que compreende o estágio do processo de pôr uma célula como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 9 e 13, a qual apresenta a propriedade d), em contato com carboidratos ou glicerina contendo meio nutritivo com condições, nas quais se forma ácido 3-hidroxipro-

piônico a partir dos carboidratos ou da glicerina.

16. Processo para a produção de ácido acrílico, caracterizado pelo fato de que compreende os estágios de

- I) produção de ácido 3-hidroxiopropiônico por um processo como definido na reivindicação 14 ou 15;
- II) desidratação do ácido 3-hidroxiopropiônico com formação de ácido acrílico.

17. Processo para a produção de poliacrilatos, caracterizado pelo fato de que compreende os estágios

- I) produção de ácido 3-hidroxiopropiônico por um processo como definido na reivindicação 14 ou 15,
- II) desidratação do ácido 3-hidroxiopropiônico com formação de ácido acrílico,
- III) polimerização radical do ácido acrílico.

18. Processo para a produção de ésteres de ácido acrílico, caracterizado pelo fato de que compreende os estágios

- I) produção de ácido 3-hidroxiopropiônico por um processo como definido na reivindicação 15 ou 16,
- II) desidratação do ácido 3-hidroxiopropiônico com formação de ácido acrílico,
- III) esterificação do ácido acrílico.

19. Uso de uma célula geneticamente modificada em relação ao seu tipo selvagem, que apresenta pelo menos uma das propriedades a) ou b):

- a) uma atividade de uma enzima E_{1a} , que catalisa a reação de piruvato para oxalacetato ou de uma enzima E_{1b} , que catalisa a reação de fosfoenolpiruvato para oxalacetato aumentada em comparação com seu tipo selvagem,
- b) uma atividade de uma enzima E_2 , que catalisa a reação de aspartato para beta-alanina aumentada em comparação com seu tipo selvagem,

caracterizado pelo fato de que é para a produção de ácido 3-hidroxiopropiônico.

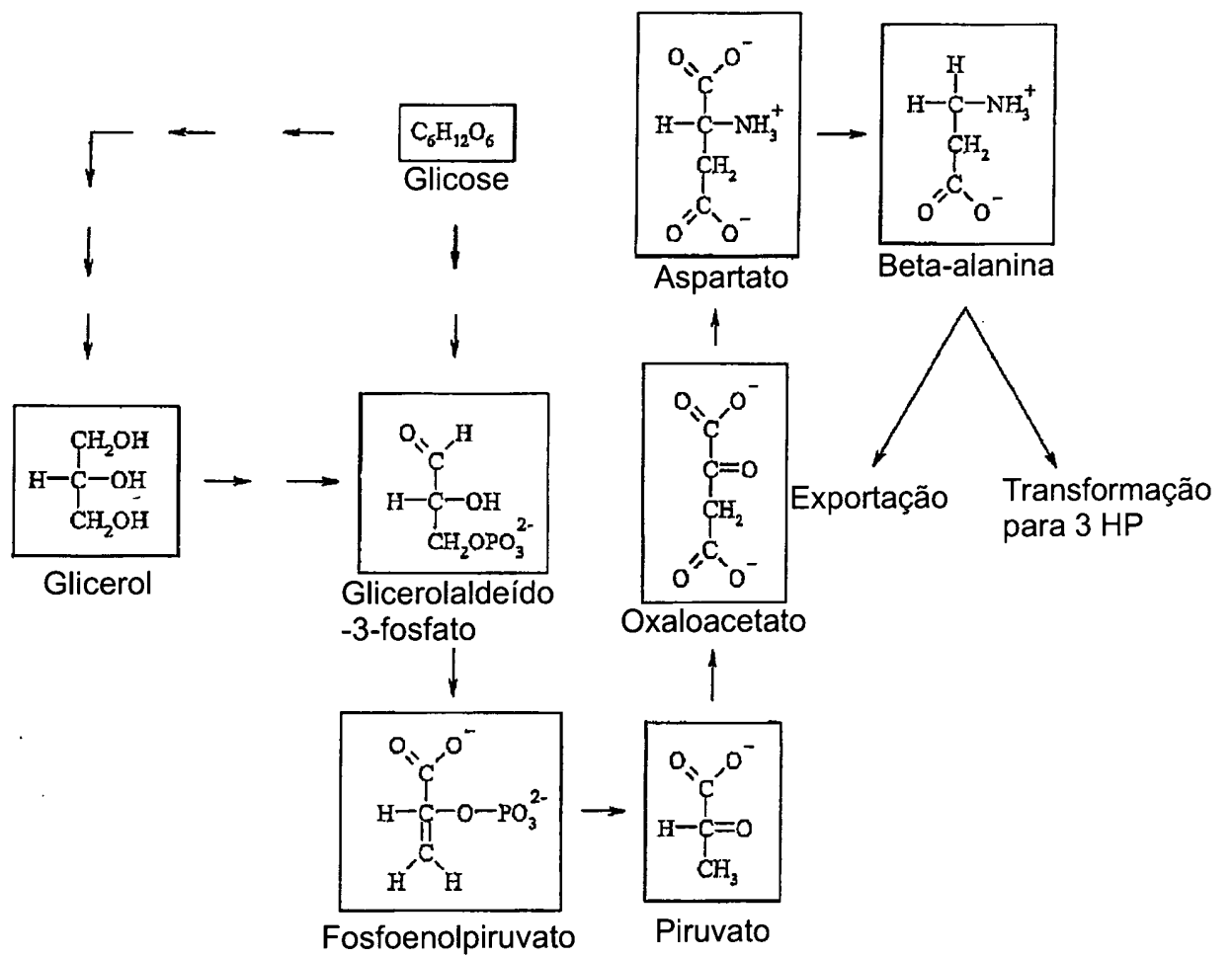


FIG 1

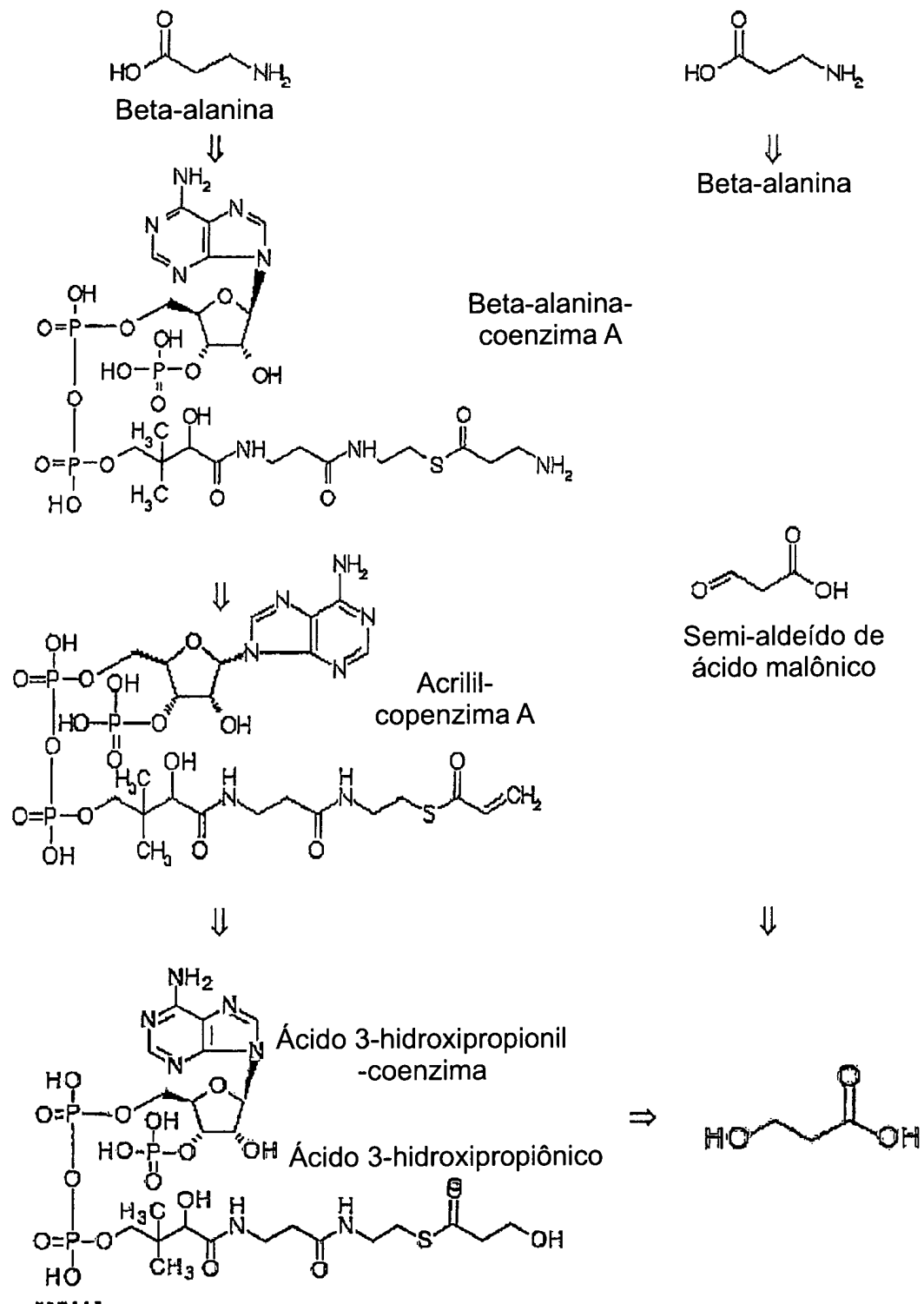


FIG 2

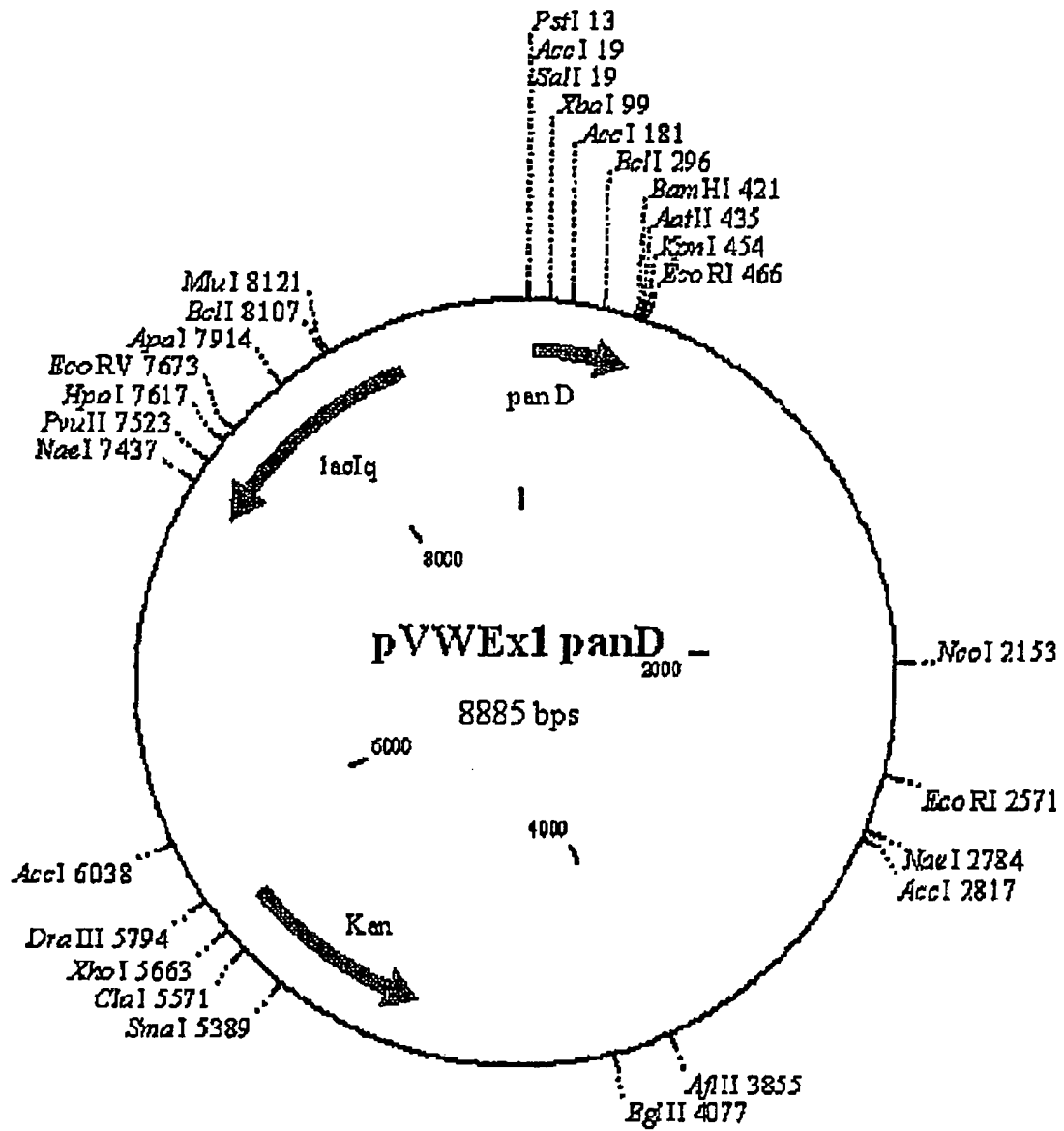


FIG 3



FIG 4

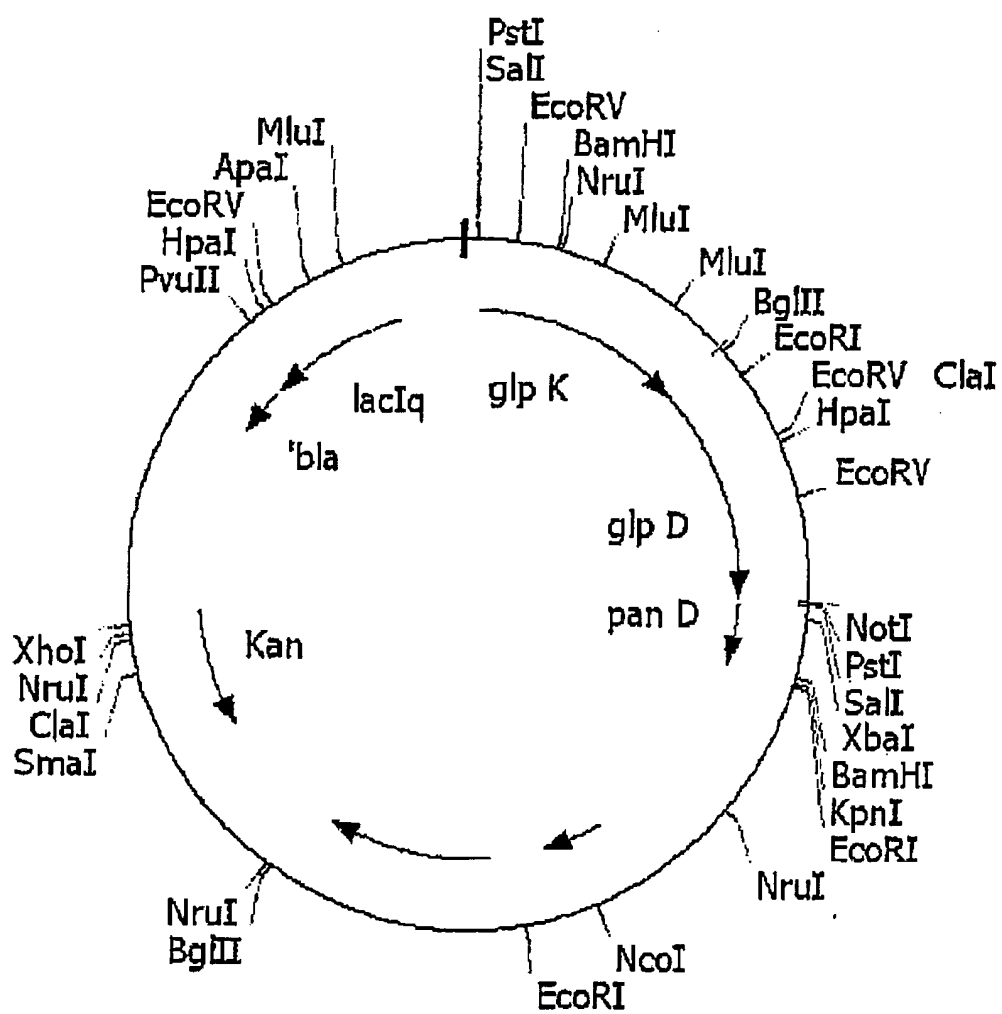


FIG 5

RESUMO

Patente de Invenção: "CÉLULA GENETICAMENTE MODIFICADA, PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DA MESMA, PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO 3-HIDROXIPROPIÔNICO, DE ÁCIDO ACÉTICO, DE
5 POLIACRILATOS, DE ÉSTERES DE ÁCIDO ACÉTICO, BEM COMO O USO DA REFERIDA CÉLULA".

A presente invenção refere-se a uma célula geneticamente modificada em relação ao seu tipo selvagem, que apresenta pelo menos uma das propriedades a) ou b): a) uma atividade aumentada em comparação
10 com seu tipo selvagem de uma enzima E_1 , que catalisa a reação de piruvato para oxalacetato ou de uma enzima E_{1b} , que catalisa a reação de fosfoenolpiruvato para oxalacetato, b) uma atividade aumentada em comparação com seu tipo selvagem de uma enzima E_2 , que catalisa a reação de aspartato para beta-alanina, em que a célula, além das propriedades a) ou b) é caracterizada por pelo menos uma das propriedades c) ou d): c) a célula geneti-
15 camente modificada é capaz de centrifugar beta-alanina para fora da célula; d) a célula geneticamente modificada é capaz de reagir beta-alanina para ácido 3-hidroxi-
20 produção de uma célula geneticamente modificada, às células geneticamente modificadas obtíveis por esses processos, processos para a produção de ácido 3-hidroxi-
propionico, um processo para a produção de ácido acrílico, um processo para a produção de poliacrilatos, um processo para a produção de ésteres de ácido acrílico, bem como o uso de células para a produção de ácido 3-hidroxi-
propionico.