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

(21) **PI0707229-5 A2**

BRPI0707229A2

(22) Data de Depósito: 29/01/2007
(43) Data da Publicação: 26/04/2011
(RPI 2103)

(51) Int.Cl.:
C12P 13/04
C12P 13/14
C12N 9/10

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

(30) Prioridade Unionista: 27/01/2006 JP 2006-019562

(73) Titular(es): Ajinomoto CO, INC.

(72) Inventor(es): Akito Chinen, Hisaahi Yasueda, Jun Nakamura

(74) Procurador(es): MOMSEN LEONARDOS & CIA

(86) Pedido Internacional: PCT JP2007051837 de 29/01/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/086608de 02/08/2007

(57) Resumo: MÉTODO PARA PRODUZIR UM L-AMINOÁCIDO. L-aminoácidos como ácido L-glutâmico, L-glutamina, L-prolina, L-arginina, L-leucina, e L-cisteína são produzidos por cultivo em um meio de uma bactéria tendo uma capacidade de produzir L-aminoácido e em que a bactéria foi modificada de modo que a atividade de fosfotransacetilase é aumentada.

PI0707229-5

"MÉTODO PARA PRODUZIR UM L-AMINOÁCIDO"

Campo técnico

A presente invenção refere-se a um método para produzir eficientemente L-aminoácidos como ácido L-glutâmico, L-glutamina, L-prolina, L-arginina, L-leucina, e L-cisteína por fermentação.

Fundamentos da Técnica

L-aminoácidos tem sido produzidos principalmente por vários métodos de fermentação usando bactérias corineformes produzindo L-aminoácido, incluindo as pertencendo aos gêneros *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, ou cepas mutantes das mesmas (Amino Acid Fermentation, Japan Scientific Societies Press, p. 195 - 215, 1986). Exemplos de métodos conhecidos para produzir um L-aminoácido por fermentação usando outras bactérias incluem um método usando um microorganismo pertencendo ao gênero *Bacillus*, *Streptomyces*, ou *Penicillium* (patente US 3.220.929), um método usando uma bactéria pertencendo ao gênero *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Serratia*, ou *Candida* (patente US 3.563.857), um método usando uma bactéria pertencendo ao gênero *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, ou *Aerobacter aerogenes* (atualmente, *Enterobacter aerogenes*) (JP 32-9393 B), e um método usando uma cepa mutante de *Escherichia coli* (patente US 5378616). Além disso, métodos para produzir um L-aminoácido usando bactérias pertencendo ao gênero *Klebsiella*, *Erwinia*, *Pantotea*, ou *Enterobacter* (EP 955368 A, EP 952221 B, e EP 999282 A) também foram descritos.

Vários métodos para aumentar a capacidade de produzir L-aminoácido por melhora das atividades de enzimas biossintéticas de L-aminoácido por técnicas de DNA recombinantes também foram descritos. Por exemplo, foi relatado que introduzindo-se um gene codificando citrato sintase derivado de *Escherichia coli* ou *Corynebacterium glutamicum* em uma bactéria pertencendo ao gênero *Corynebacterium* ou *Brevibacterium* é efetivo

para aumentar a capacidade de produzir L-aminoácido da bactéria (JP 07-121228 B). Além disso, foi relatado que introduzindo um gene de citrato sintase derivado de uma bactéria corineforme em uma enterobactéria pertencendo ao gênero *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Erwinia*, ou *Escherichia* é efetivo para aumentar a capacidade de produzir ácido L-glutâmico (EP 999282 A).

Fosfotransacetilase é uma enzima que está envolvida em metabolismo de ácido acético. Em *Escherichia coli*, esta enzima desempenha um papel na reação que produz fosfato de acetila a partir de acetil-CoA e fosfato, que faz parte da via primária para produzir ácido acético. Além disso, sabe-se que em *Corynebacterium glutamicum*, a atividade de fosfotransacetilase aumenta quando da produção de acetil-CoA por assimilação de ácido acético, e a atividade é negativamente regulada pelo fator de transcrição RamB (Microbiology 1999 503 - 513, Journal of Bacteriology 2004 vol. 186, No. 9 p2798-2809).

Exemplos de métodos conhecidos de produção fermentativa de um material utilizável usando uma bactéria em que a atividade de fosfotransacetilase é melhorada incluem a produção de copolímero poli-β-hidroxialcanoato (patente US 5.891.686 e patente US 5.569.595), e produção de etanol (WO 2003/078643). Além disso, um método enzimático de produzir um L-aminoácido contendo enxofre usando fosfotransacetilase foi descrito (JP 09-009982 A). No entanto, a melhora da atividade de fosfotransacetilase na criação de bactérias produzindo L-aminoácido não foi relatada, e a relação entre a atividade de fosfotransacetilase e a produtividade de L-aminoácido não foi elucidada.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Um objeto da presente invenção consiste em prover um método novo de fermentação para produzir L-aminoácidos, como ácido L-glutâmico, L-glutamina, L-prolina, L-arginina, L-leucina, e L-cisteína.

Os inventores da presente invenção realizaram estudos extensos para alcançar o objeto descrito acima. Como um resultado, os requerentes verificaram que L-aminoácidos, como ácido L-glutâmico, L-glutamina, L-prolina, L-arginina, L-leucina, e L-cisteína, podem ser eficientemente produzidos por cultivo de uma bactéria produzindo L-aminoácido que foi modificada para aumentar a atividade de fosfotransacetilase, e assim completaram a presente invenção.

É um objeto da presente invenção prover um método para produzir um L-aminoácido compreendendo cultivar uma bactéria produzido L-aminoácido que foi modificada para ter uma atividade melhorada de fosfotransacetilase em um meio, e coletar o L-aminoácido a partir do meio ou da bactéria.

É outro objeto da presente invenção prover o método como descrito acima, em que a atividade de fosfotransacetilase é melhorada por aumento do número de cópias do gene codificando fosfotransacetilase ou por modificação da uma seqüência reguladora de expressão do gene codificando fosfotransacetilase.

É outro objeto da presente invenção prover o método como descrito acima, em que o gene codificando fosfotransacetilase é um DNA selecionado dentre o grupo consistindo de:

(a) um DNA compreendendo nucleotídeos 1214 a 2641 de SEQ ID NO: 34 ou a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 40; e

(b) um DNA que hibridiza com uma seqüência de nucleotídeo que é complementar para a seqüência de nucleotídeo de nucleotídeos 1214 a 2641 de SEQ ID NO: 34 ou a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 40, em que o referido DNA hibridiza sob condições estringentes e codifica uma proteína que tem atividade de fosfotransacetilase.

É outro objeto da presente invenção prover o método como descrito acima, em que a atividade de fosfotransacetilase é melhorada por

interrupção de um gene ramB.

É outro objeto da presente invenção prover o método como descrito acima, em que a bactéria é ainda modificada de modo que uma atividade é melhorada de uma proteína selecionada dentre o grupo consistindo de D-xilose 5-fosfato-fosfocetolase, frutose 6-fosfato fosfocetolase, e combinações das mesmas.

É outro objeto da presente invenção prover o método como descrito acima, em que a bactéria é ainda modificada para ter atividade melhorada de piruvato carboxilase.

É outro objeto da presente invenção prover o método como descrito acima, em que a bactéria é ainda modificada para ter atividade melhorada de fosfoenolpiruvato carboxilase.

É outro objeto da presente invenção prover o método como descrito acima, em que a bactéria é selecionada dentre o grupo consistindo de uma bactéria corineforme, bactéria *Pantoea*, bactéria *Enterobacter*, e bactéria *Escherichia*.

É outro objeto da presente invenção prover o método como descrito acima, em que o L-aminoácido é selecionado dentre o grupo consistindo de ácido L-glutâmico, L-glutamina, L-prolina, L-arginina, L-leucina, e L-cisteína.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Fig. 1 mostra um sítio inserido-IS no gene yggB de tipo mutante.

DESCRIÇÃO DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO PREFERIDAS

<1-1> Bactéria da presente invenção

A bactéria usada no método de produção da presente invenção (também referida como uma bactéria da presente invenção) tem uma capacidade de produzir L-aminoácido e foi modificada para ter atividade melhorada de fosfotransacetilase. A bactéria da presente invenção pode ser

obtida por modificação de uma bactéria tendo uma capacidade de produzir L-aminoácido (isto é, cepa parental) de modo que é aumentada a atividade de fosfotransacetilase. A bactéria da presente invenção pode ter uma capacidade de produzir L-aminoácido nativo ou pode ser criada para ter uma capacidade de produzir L-aminoácido.

Aqui, a "capacidade de produzir L-aminoácido" significa uma capacidade para produzir um L-aminoácido em uma quantidade que permite a coleta do L-aminoácido das células bacterianas ou do meio. Preferivelmente, significa uma capacidade para produzir uma quantidade maior do L-aminoácido como comparado a uma cepa de tipo selvagem ou não modificada que é cultivada sob as mesmas condições.

Exemplos dos L-aminoácidos a serem produzidos incluem L-lisina, ácido L-glutâmico, L-treonina, L-valina, L-leucina, L-isoleucina, L-serina, ácido L-aspártico, L-asparagina, L-glutamina, L-arginina, L-cisteína (cistina), L-metionina, L-fenilalanina, L-triptofano, L-tirosina, L-glicina, L-alanina, L-prolina, L-ornitina, L-citrulina, e L-homoserina. L-aminoácidos derivados de acetil-CoA são preferíveis, e ácido L-glutâmico, L-glutamina, L-prolina, L-arginina, L-leucina, e L-cisteína são preferíveis.

Exemplos da bactéria da presente invenção incluem, mas não são limitados a, bactérias pertencendo a família *Enterobacteriaceae*, incluindo as pertencendo ao gênero *Escherichia*, *Pantoea*, *Enterobacter*, ou outros, bactérias corineformes como *Corynebacterium glutamicum* e *Brevibacterium lactofermentum*, e bactérias pertencendo ao gênero *Bacillus,* como *Bacillus subtilis*.

Na presente invenção, a "bactéria corineforme" inclui bactérias previamente classificadas como *Brevibacterium,* mas não são classificadas como *Corynebacterium* (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1991)), assim como bactérias pertencendo ao gênero *Brevibacterium*, que estão altamente relacionados com o gênero *Corynebacterium*. Exemplos de tais

bactérias incluem os seguintes:

Corynebacterium acetoacidophilum

Corynebacterium acetoglutamicum

Corynebacterium alkanolyticum

Corynebacterium callunae

Corynebacterium glutamicum

Corynebacterium lilium

Corynebacterium melassecola

Corynebacterium thermoaminogenes (*Corynebacterium efficiens*)

Corynebacterium herculis

Brevibacterium divaricatum

Brevibacterium flavum

Brevibacterium immariophilum

Brevibacterium lactofermentum (*Corynebacterium glutamicum*)

Brevibacterium roseum

Brevibacterium saccharolyticum

Brevibacterium thiogenitalis

Corynebacterium ammoniagenes

Brevibacterium album

Brevibacterium selinum

Microbacterium ammoniaphilum

Especificamente, as seguintes cepas são exemplificadas:

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806

Corynebacterium alkanolyticum ATCC21511

Corynebacterium callunae ATCC15991

Corynebacterium glutamicum ATCC13020, ATCC13032, ATCC13060

Corynebacterium lilium ATCC15990

Corynebacterium melassecola ATCC17965

Corynebacterium thermoaminogenes AJ12340 (FERM BP-1539)

Corynebacterium herculis ATCC13868

Brevibacterium divaricatum ATCC14020

Brevibacterium flavum ATCC13826, ATCC14067

Brevibacterium immariophilum ATCC14068

Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 (*Corynebacterium glutamicum* ATCC13869)

Brevibacterium roseum ATCC13825

Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066

Brevibacterium thiogenitalis ATCC19240

Corynebacterium ammoniagenes ATCC6871, ATCC6872

Brevibacterium album ATCC15111

Brevibacterium selinum ATCC15112

Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354

Estas cepas são disponíveis junto ao American Type Culture Collection (ATCC: endereço: P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, 1, Estados Unidos da America). Isto é, os números de acesso são dados a cada uma das cepas, e as cepas podem ser encomendadas usando estes números (http://www.atcc.org/). Os números de acesso para as cepas são listados no catálogo do American Type Culture Collection. A cepa AJ12340 foi depositada junto ao National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology (atualmente, International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) (Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305 - 5466, Japão) em 27 de outubro de 1987 e recebeu o número de acesso FERM BP-1539 sob as provisões do Tratado de Budapeste.

Bactérias pertencendo à família *Enterobacteriaceae* não são particularmente limitadas desde que elas tenham uma capacidade de produzir

L-aminoácido, e incluam as pertencendo ao gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Erwinia*, *Salmonella*, *Morganella*, ou outros. Bactérias pertencendo à família *Enterobacteriaceae* com base na classificação descrita no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Taxonomy/wgetorg?mode=Tree&id=1236&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock) podem ser usadas. Dentre estas, as bactérias pertencendo ao gênero *Escherichia*, *Enterobacter*, ou *Pantoea* são preferíveis.

A cepa parental de bactérias *Escherichia* que pode ser usada para obter a bactéria da presente invenção não é particularmente limitada, e especificamente, as bactérias listadas em Neidhardt et al. (*Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium*, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1029 tabela 1) pode ser usada. Dentre esta, *Escherichia coli* é preferível. Os exemplos específicos de *Escherichia coli* incluem a cepa de *Escherichia coli* W3110 (ATCC 27325) e a cepa de *Escherichia coli* MG1655 (ATCC 47076), que são derivadas da cepa K12 protótipo de tipo selvagem.

Exemplos de bactérias *Enterobacter* incluem *Enterobacter agglomerans* e *Enterobacter aerogenes*, e exemplos de bactérias *Pantoea* incluem *Pantoea ananatis*. Recentemente, *Enterobacter agglomerans* foi reclassificado em alguns casos como *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*, ou *Pantoea stewartii* com base na análise da seqüência de nucleotídeo de 16S rRNA. Assim, as bactérias da presente invenção podem pertencer ao gênero *Enterobacter* ou *Pantoea,* desde que elas sejam classificadas na família *Enterobacteriaceae*. Quando *Pantoea ananatis* é criado usando uma técnica de engenharia genética, as cepas de *Pantoea ananatis* AJ13355 (FERM BP-6614), AJ13356 (FERM BP-6615), AJ13601 (FERM BP-7207), e derivados das mesmas podem ser usadas. Estas cepas foram identificadas e depositadas como *Enterobacter agglomerans* no momento do isolamento, mas então reclassificadas como *Pantoea ananatis*

com base na análise da seqüência de nucleotídeos de rRNA 16S.

Abaixo, métodos para conferir uma capacidade de produzir L-aminoácido a esta bactéria como descrito acima serão descritos.

A fim de conferir uma capacidade de produzir L-aminoácido, métodos podem ser usados os quais são tipicamente usados na criação convencional de bactérias produzindo aminoácidos, como uma bactéria corineforme ou uma bactéria *Escherichia*. Tais métodos incluem a aquisição de cepas mutantes auxotróficas em nutrientes, cepas resistentes dos análogos, e cepas mutantes de regulação metabólica, e a criação de cepas recombinantes tendo expressão melhorada de genes codificando enzimas biossintéticas de L-aminoácido (Amino Acid Fermentation, Japan Scientific Societies Press, primeira edição publicação: 30 de maio de 1986, p.77 a 100). Mutações auxotróficas em nutrientes, mutações resistentes dos análogos, e mutações de regulação metabólica podem ser obtidas sozinhas ou em combinação durante a criação de bactérias produzindo L-aminoácido. Além disso, as atividades de uma ou mais das enzimas biossintéticas de L-aminoácido podem ser melhoradas. Ainda mais, mutações auxotróficas em nutrientes, mutações resistentes dos análogos, e mutações de regulação metabólica podem ser concedidas em combinação com melhora das atividades das enzimas biossintéticas de L-aminoácido.

Cepas mutantes auxotróficas em nutrientes, cepas resistentes dos análogos, e cepas mutantes de regulação metabólica que tem uma capacidade de produzir L-aminoácido podem ser obtidas como a seguir. Isto é, uma cepa parental ou uma cepa de tipo selvagem é submetida a um tratamento de mutação geral, isto é, irradiação com raios X ou raios ultravioletas, ou submetido a um agente como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. A cepa que exibe auxotrofia em nutriente, resistência dos análogos, ou uma mutação de regulação metabólica e tem uma capacidade de produzir L-aminoácido é selecionada dentre as cepas mudadas.

Além disso, uma bactéria produzindo L-aminoácido pode ser obtida por melhora da atividade de uma enzima biossintética de L-aminoácido via recombinação genética. No entanto, a capacidade de produzir L-aminoácido pode ser uma propriedade nativa para a bactéria de tipo selvagem. Além disso, como descrito abaixo, a capacidade de produzir L-aminoácido pode ser conferida por melhora da expressão do gene fosfotransacetilase.

Abaixo, métodos de conferir uma capacidade de produzir ácido L-glutâmico e bactérias conferidas com a capacidade de produzir ácido L-glutâmico serão descritos como exemplo.

A fim de conferir e/ou melhorar a capacidade de produzir ácido L-glutâmico, a expressão de um gene codificando uma enzima envolvida em biossíntese de ácido L-glutâmico pode ser melhorada. As enzimas envolvidas em biossíntese de ácido L-glutâmico incluem glutamato desidrogenase, glutamina sintetase, glutamato sintase, isocitrato desidrogenase, aconitato hidratase, citrato sintase, fosfoenolpiruvato carboxilase, piruvato carboxilase, piruvato desidrogenase, piruvato quinase, fosfoenolpiruvato sintase, enolase, fosfogliceromutase, fosfoglicerato quinase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, triosefosfato isomerase, frutosebisfosfato aldolase, fosfofructoquinase, e glucosefosfato isomerase.

A expressão de gene pode ser melhorada por transformação de uma bactéria com um plasmídeo contendo o gene desejado e seqüências requeridas para replicação do plasmídeo, integrando o gene por recombinação homóloga, conjugação, transferência de gene, ou outros no cromossomo da bactéria, ou introdução de uma mutação na região do promotor do gene (WO 95/34672).

Quando se transforma o gene desejado em uma bactéria usando um plasmídeo ou se integra o gene no cromossomo, um promotor para expressar o gene pode ser qualquer promotor desde que ele funcione na bactéria hospedeira escolhida, e possa ser o promotor nativo do gene ou

promotor heterólogo.

O nível de expressão de um gene pode ser aumentado por seleção de um promotor que é conhecido como sendo forte na bactéria hospedeira escolhida, ou por modificação da região –35 ou da região –10 do promotor para ser próxima a uma seqüência de consenso.

As bactérias modificadas para ter expressão melhorada de um gene citrato sintase, uma isocitrato desidrogenase, um gene da piruvato desidrogenase e/ou um gene da glutamato desidrogenase incluem as descritas em WO 00/18935 e EP 1010755 A.

Conferir uma capacidade de produzir ácido L-glutâmico pode ser realizada por diminuição ou eliminação de uma atividade de uma enzima que catalisa uma reação que se ramifica de uma via biossintética de ácido L-glutâmico e leva a um composto diferente de um ácido L-glutâmico. Tais enzimas incluem isocitrato liase, α-cetoglutarato desidrogenase, acetohidróxi ácido sintase, acetolactato sintase, formato acetiltransferase, lactato desidrogenase, glutamato decarboxilase, e 1-pirrolina desidrogenase.

Por exemplo, a atividade da α-cetoglutarato desidrogenase pode ser diminuída por uso do gene sucA (odhA) que codifica a subunidade Elo de α-cetoglutarato desidrogenase. Cepas tendo atividade diminuída da α-cetoglutarato desidrogenase são mostradas abaixo.

Cepa *Brevibacterium lactofermentum* ΔS (WO 95/34672)

Brevibacterium lactofermentum AJ12821 (FERM BP-4172; FR 9401748 A)

Brevibacterium flavum AJ12822 (FERM BP-4173; FR 9401748 A)

Corynebacterium glutamicum AJ12823 (FERM BP-4174; FR 9401748 A)

Pantoea ananatis AJ13601 (FERM BP-7207)

Cepa *Klebsiella planticola* AJ13410 (FERM BP-6617)

Pantoea ananatis AJ13355 (FERM BP-6614)

Para diminuir ou eliminar a atividade de tal enzima, uma mutação pode ser introduzida no gene codificando a enzima no cromossomo usando um tratamento de mutação geral. Por exemplo, o gene pode ser interrompido por recombinação de gene, ou por modificação de uma seqüência reguladora de expressão como um promotor e uma seqüência Shine-Dalgarno (SD) de modo que a expressão de gene ou tradução tinha diminuído. Além disso, a substituição de aminoácido (mutação sentido errado), um códon parado (mutação não sentido), uma mutação de mudança de fase que adiciona/deleta um ou dois nucleotídeos em uma região codificando as enzimas no cromossomo podem ser introduzidas, ou o gene ou uma parte do mesmo pode ser deletada (Journal of Biological Chemistry 272: 8611 - 8617 (1997). Também, a atividade da enzima também pode ser diminuída ou eliminada por substituição do gene de tipo selvagem no cromossomo por um gene mutante em que a região codificada é deletada por recombinação homóloga, ou por introdução de um transposon ou um fator IS no gene.

Por exemplo, o seguinte método pode ser usado para introduzir uma mutação que diminui ou elimina a atividade da enzima descrita acima por recombinação homóloga. Um gene mutante é preparado por modificação de uma seqüência parcial de um gene de marcação de modo que a enzima codificada não é produzida, e uma bactéria hospedeira é transformada com o DNA contendo o gene mutante. Isto causa recombinação entre o gene mutante e o gene no cromossomo, assim substituindo o gene no cromossomo com o gene mutante. Esta mutagenese sítio-específica por substituição de gene usando recombinação homóloga é conhecida, e pode ser alcançada por uso de um DNA linear ou um plasmídeo contendo uma origem de replicação sensível a temperatura (patente US 6303383 ou JP 05-007491 A). Também, a mutagenese sítio-específica por substituição de gene usando recombinação homóloga também pode ser obtida por uso de plasmídeo que é incapaz de

replicar na bactéria hospedeira escolhida.

Exemplos de plasmídeos sensíveis à temperatura em bactérias corineformes incluem p48K, pSFKT2 (patente US 6303383), e pHSC4 (FR 1992-2667875 A e JP 05-7491 A). Estes plasmídeos podem replicar autonomamente a 25 °C mas não podem replicar autonomamente a 37 °C. *Escherichia coli* AJ12571 transformado com pHSC4 foi depositado junto ao National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology (atualmente, International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305 - 5466, Japão) em 11 de outubro de 1990 e recebeu o número de acesso FERM P-11763, e então convertido em um depósito internacional sob as provisões de Tratado de Budapeste em 26 de agosto de 1991 e recebeu um número de acesso de FERM BP-3524.

Além disso, a capacidade de produzir ácido L-glutâmico pode ser conferida a uma bactéria hospedeira por amplificação do gene yggB (NCgl 1221;NP_600492. [gi:19552490]; SEQ ID NO: 32) ou por introdução de um gene yggB mutante contendo uma mutação em sua região de codificação (WO2006/070944). O seguinte gene pode ser usado como o gene yggB mutante.

(1) Mutação na região C-terminal

Esta mutação é introduzida na região codificando a seqüência de aminoácido de aminoácidos 419-533 de SEQ ID NO: 33. Esta mutação pode ser qualquer mutação desde que seja introduzida na seqüência de nucleotídeo codificando a região descrita acima, e uma mutação de inserção incluindo a inserção de uma seqüência de inserção (abaixo, referida como IS), ou um transposon, é preferível. A mutação de inserção pode resultar em uma substituição de aminoácido (mutação sentido errado), uma mudança de fase, ou um códon de parada (mutação não sentido). SEQ ID NOS: 7 e 8 mostram a

seqüência de nucleotídeo do gene yggB mutante contendo um elemento transposável (IS) na região C-terminal e a seqüência de aminoácido codificada pelo gene mutante, respectivamente.

Entrementes, exemplos da mutação na região C-terminal incluem a substituição de uma prolina na seqüência de aminoácidos 419-533 de SEQ ID NO: 33 com outro aminoácido.

(2) Mutação em uma região de transmembrana

A proteína Ygg codificada pelo gene yggB gene é prevista como tendo cinco regiões de transmembrana, e estas regiões de transmembrana correspondem aos aminoácidos 1-23 (primeira região de transmembrana), 25-47 (segunda região de transmembrana), 62-84 (terceira região de transmembrana), 86-108 (quarta região de transmembrana), e 110-132 (quinta região de transmembrana) na proteína YggB de tipo selvagem (SEQ ID NO: 33). Uma mutação nas regiões de transmembrana preferivelmente causa substituição, deleção, adição, inserção, ou inversão de um ou vários aminoácidos sem causar uma mudança de fase ou uma terminação de tradução.

Exemplos de uma mutação na região de transmembrana incluem inserir um ou vários aminoácidos entre a leucina na posição 14 e o triptofano na posição 15 na seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 33, substituindo a alanina na posição 100 com outro aminoácido, e substituindo a alanina na posição 111 com outro aminoácido.

Como outro método para conferir e/ou melhorar uma capacidade de produzir ácido L-glutâmico, conferir resistência a um análogo de ácido orgânico, um inibidor de cadeia respiratória, etc. e conferir sensibilidade a um inibidor de síntese de parede celular pode ser usado. Exemplos de tais métodos incluem conferir resistência a ácido monofluoroacético (JP 50-113209 A), conferir resistência a adenina ou timina (JP 57-065198 A), atenuar urease (JP 52-038088 A), conferir resistência a

ácido malônico (JP 52-038088 A), conferir resistência a benzopironas ou naftoquinonas (JP 56-1889 A), conferir resistência a HOQNO (JP 56-140895 A), conferir resistência a ácido α-cetomalônico (JP 57-2689 A), conferir resistência a guanidina (JP 56-35981 A), e conferir sensibilidade a penicilina (JP 4-88994 A).

Exemplos específicos de tais bactérias resistentes incluem:

Brevibacterium flavum AJ3949 (FERM BP-2632; JP 50-113209 A)

Corynebacterium glutamicum AJ11628 (FERM P-5736; JP 57-065198 A)

Brevibacterium flavum AJ11355 (FERM P-5007; JP 56-1889 A)

Corynebacterium glutamicum AJ11368 (FERM P-5020; JP 56-1889 A)

Brevibacterium flavum AJ11217 (FERM P-4318; JP 57-2689 A)

Corynebacterium glutamicum AJ11218 (FERM P-4319; JP 57-2689 A)

Brevibacterium flavum AJ11564 (FERM P-5472; JP 56-140895 A)

Brevibacterium flavum AJ11439 (FERM P-5136; JP 56-35981 A)

Corynebacterium glutamicum H7684 (FERM BP-3004; JP 04-88994 A)

Brevibacterium lactofermentum AJ11426 (FERM P-5123; JP 56-048890 A)

Corynebacterium glutamicum AJ11440 (FERM P-5137; JP 56-048890 A)

Brevibacterium lactofermentum AJ11796 (FERM P-6402; JP 58-158192 A)

Bactérias conferidas com uma capacidade de produzir L-glutamina incluem uma bactéria tendo atividade melhorada de glutamato desidrogenase, uma bactéria tendo atividade melhorada de glutamina sintase (glnA), e uma bactéria pertencendo a família *Enterobacteriaceae* tendo um

gene glutaminase interrompida (EP 1229121 A e EP 1424398 A). A atividade glutamina sintase pode ser melhorada por interrupção do gene glutamina adenililtransferase (glnE) ou por interrupção do gene codificando a proteína reguladora prPII (glnB). Além disso, uma bactéria produzindo L-glutamina preferível inclui uma bactéria *Escherichia* tendo um mutante da glutamina sintase em que a tirosina na posição 397 foi substituída com outro aminoácido (publicação de patente US 2003-0148474).

Outro método de conferir e/ou melhorar uma capacidade de produzir L-glutamina inclui conferir resistência a 6-diazo-5-oxo-norleucina (JP 03-232497 A), conferir resistência a análogo de purina e sulfóxido de metionina (JP 61-202694 A), e conferir resistência a ácido α-cetomaleico (JP 56-151495 A). Exemplos específicos de uma bactéria corineforme tendo uma capacidade de produzir L-glutamina incluem:

Brevibacterium flavum AJ11573 (FERM P-5492; JP 56-161495 A)

Brevibacterium flavum AJ11576 (FERM BP-10381; JP 56-161495 A)

Brevibacterium flavum AJ12212 (FERM P-8123; JP 61-202694 A)

Bactérias tendo uma capacidade de produzir L-prolina incluem uma bactéria abrigando γ-glutamil quinase que não é submetida a uma inibição por retro-alimentação por L-prolina e uma bactéria em que o sistema de degradação de L-prolina é atenuado. Um método de modificar uma bactéria usando um DNA codificando γ-glutamil quinase não submetida à inibição por retro-alimentação por L-prolina é descrito em Dandekar, A. M., Uratsu, S. L., J. Bacteriol., 170, 12, 5943-5 (1988). Também, uma bactéria com um sistema de degradação de L-prolina atenuado é obtida por introdução de uma mutação no gene da prolina desidrogenase que resulta em atividade enzimática diminuída. Exemplos específicos de uma bactéria tendo uma

capacidade de produzir L-prolina incluem *Escherichia coli* NRRL B-12403, NRRL B-12404 (GB 2075056), e VKPM B-8012 (patente US 2002-0058315). Exemplos de um plasmídeo mutante para introduzir esta mutação incluem o plasmídeo mutante descrito em DE 3127361 B, e o plasmídeo mutante descrito por Bloom et al. (The 15th Miami Winter Symposium, 1983, p. 34).

Bactérias produzindo L-prolina preferíveis incluem *Escherichia coli* 702 (VKPM B-8011), que é resistente para 3,4-dehidroxiprolina e azatidina-2-carboxilato, 702ilvA (VKPM B-8012), que é um derivado de ilvA deficiente da cepa 702, e uma cepa *E. coli* tendo uma atividade melhorada de uma proteína codificada pelo gene b2682, gene b2683, gene b1242, ou gene b3434 (JP 2002-300874 A).

Exemplos de bactérias produzindo L-leucina incluem *Escherichia coli* H-9068 (ATCC 21530), H-9070 (FERM BP-4704), e H-9072 (FERM BP-4706) que exibem resistência para 4-azaleucina ou 5,5,5-trifluoroleucina (patente US 5.744.331), *Escherichia coli* contendo isopropilmalato sintase não submetida à inibição por retro-alimentação por L-leucina (EP 1067191 B), *Escherichia coli* AJ11478 que é resistente para β-2-tienilalanina e β-hidroxileucina (patente US 5.763.231), e *Escherichia coli* 57 (VKPM B-7386, RU 2140450).

Exemplos de bactérias produzindo L-cisteína incluem *Escherichia coli* JM15 transformadas com um alelo do gene cysE codificando serina acetiltransferase não submetida à inibição por retro-alimentação (patente US 6.218.168), *Escherichia coli* W3110 em que o gene codificando a proteína responsável para excreção de substâncias citotóxicas é superexpressado (patente US 5.972.663), *Escherichia coli* tendo diminuída atividade cisteína desulfhidrase (JP 11-155571 A), e *Escherichia coli* W3110 tendo um ativador transcripcional amplificado do regulon de cisteína codificado pelo gene cysB (WO 01/27307).

Exemplos de bactérias produzindo L-isoleucina incluem uma cepa mutante de *Escherichia* que é resistente a 6-dimetilaminopurina (JP 05-304969 A), uma cepa mutante que é resistente a hidroxamato de L-isoleucina, tiaisoleucina, DL-etionina, ou hidroxamato de arginina (JP 05-130882 A), e cepas recombinantes tendo gene da treonina deaminase amplificado e gene da acetohidroxilato sintase (JP 02-458 A, JP 02-42988 A, e JP 08-47397 A).

Uma capacidade de produzir L-valina pode ser conferida por aumento das atividades de enzimas sintéticas da L-valina codificadas pelo operon ilvGMEDA, em particular, acetohidroxilato sintase codificada pelo gene ilvG (JP 02-748418 B). Como uma enzima sintética, L-valina não pode ser submetida à inibição por retro-alimentação por L-valina. Uma capacidade de produzir L-valina pode ser conferida por diminuição de uma expressão do gene acetolactato sintase III (gene ilvIH).

Além disso, capacidade de produzir L-valina pode ser obtida ao conferir resistência ao análogo de aminoácido a uma bactéria. Exemplos destas bactérias incluem cepas mutantes que são auxotróficas para L-isoleucina ou L-metionina e resistentes para D-ribose, nucleosídeo purina, ou ribonucleosídeo pirimidina (FERM P-1841 e P-5556; JP 53-025034 A), e uma cepa mutante que é resistente a policetídeo (FERM P-9325; JP 1934507 B).

Exemplos de bactérias produzindo L-alanina incluem uma bactéria corineforme em que a atividade H^+-ATPase é deficiente (Appl Microbiol Biotechnol. 2001 Nov; 57(4): 534-40) e uma bactéria corineforme em que o gene da aspartato decarboxilase é amplificado (JP 07-163383 A).

Exemplos de bactérias produzindo L-arginina incluem cepas mutantes de *Escherichia coli* que são resistentes para α-metilmetionina, p-fluorofenilalanina, D-arginina, hidroxamato de arginina, S-(2-aminoetil)-cisteína, α-metilserina, β-2-tienilalanina, ou sulfaguanidina (JP 56-106598 A). Uma bactéria produzindo L-arginina preferível é *Escherichia coli* 237, que é uma cepa mutante que é resistente à inibição por retro-alimentação por L-

arginina e tem atividade melhorada da N-acetilglutamato sintase (RU 2000117677). A cepa foi depositada junto ao Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM), GNII Genetika em 10 de abril de 2000 e recebeu o número de acesso de VKPM B-7925, e o depósito foi então convertido para um depósito internacional sob as provisões do Tratado de Budapeste em 18 de maio de 2001. *Escherichia coli* 382, que é um derivado da cepa 237 e tem capacidade melhorada para assimilar ácido acético (JP 2002-017342 A), pode ser usada como uma bactéria produzindo L-arginina. A cepa de *Escherichia coli* 382 foi depositada junto ao Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) em 10 de abril de 2000 e recebeu o número de acesso de VKPM B-7926.

Exemplos de bactérias produzindo L-arginina incluem bactérias modificadas para terem melhorada expressão de um gene codificando uma enzima envolvida em biossíntese de L-arginina. As enzimas biossintéticas de L-arginina incluem N-acetilglutamato sintase (argA), N-acetilglutamil-fosfato reductase (argC), ornitina acetiltransferase (argJ), N-acetilglutamato quinase (argB), acetilornitina transaminase (argD), acetilornitina desacetilase (argE), ornitina carbamoil transferase (argF), argininosucinato sintase (argG), argininosucinato liase (argH), e carbamoilfosfato sintase (carAB). Os termos em parênteses seguindo os nomes da enzima referem-se aos nomes dos genes codificando estas enzimas. Para N-acetilglutamato sintase (argA), é mais preferível usar uma enzima mutante em que a seqüência de aminoácido de tipo selvagem nas posições 15 a 19 é substituída e, como um resultado, a inibição por retro-alimentação por L-arginina foi aliviada (EP 1170361 A).

As vias biossintéticas de L-citrulina e L-ornitina são iguais que a de L-arginina, e a capacidade para produzir L-citrulina e L-ornitina pode ser conferida por aumento das atividades enzimáticas de N-acetilglutamato sintase (argA), N-acetilglutamilfosfato reductase (argC), ornitina

acetiltransferase (argJ), N-acetilglutamato quinase (argB), acetilornitina transaminase (argD), e acetilornitina desacetilase (argE).

Exemplos de bactérias produzindo L-lisina incluem uma cepa resistente ao análogo de L-lisina e cepa mutante de regulação metabólica. Exemplos específicos das mesmas incluem *Escherichia coli* AJ11442 (FERM BP-1543, NRRL B-12185; JP 56-18596 A e patente US 4.346.170) e *Escherichia coli* VL611 (JP 2000-189180 A). Além disso, WC196 (WO 96/17930) pode ser usada como uma cepa produzindo L-lisina de *Escherichia coli*. A cepa WC196 é obtida conferindo resistência a AEC (S-(2-aminoetil)-cisteína) para a cepa W3110, que é derivada de cepa de *Escherichia coli* K-12. A cepa WC196 foi chamada de cepa de *Escherichia coli* AJ13069 e depositada junto ao National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology (atualmente, International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japão) em 6 de dezembro de 1994 e recebeu o número de acesso de FERM P-14690, e o depósito foi então convertido para um depósito internacional sob as provisões do Tratado de Budapeste em 29 de setembro de 1995 e recebeu o número de acesso de FERM BP-5252.

Uma bactéria tendo uma capacidade de produzir L-lisina também pode ser obtida por aumento da atividade de uma enzima envolvida no sistema biossintético de L-lisina. A atividade enzimática pode ser aumentada por aumento do número de cópias do gene codificando a enzima nas células, ou por modificação de uma seqüência reguladora de expressão do gene.

Genes codificando uma enzima biossintética da L-lisina incluem um gene codificando uma enzima envolvida na via de ácido diaminopimélico como gene da dihidrodipicolinato sintase (dapA), gene da aspartoquinase (lysC), gene da dihidrodipicolinato reductase (dapB), gene da

diaminopimelato decarboxilase (lysA), gene da diaminopimelato desidrogenase (ddh) (WO 96/40934), gene a fosfoenolpiruvato carboxilase (ppc) (JP 60-87788 A), gene da aspartato aminotransferase (aspC) (JP 6-102028 B), gene da diaminopimelato epimerase (dapF) (JP 2003-135066 A), e gene da aspartato semialdeído desidrogenase (asd) (WO 00/61723), e um gene codificando uma enzima envolvida em uma via de ácido aminoadípico como o gene homoaconitato hidratase (JP 2000-157276 A).

Entrementes, o gene da aspartoquinase III (lysC) é preferivelmente modificado de modo que a inibição por retro-alimentação da L-lisina é aliviada. Este gene lysC pode ser obtido pelo método descrito na patente US 5.932.453.

Além disso, uma bactéria tendo uma capacidade de produzir L-lisina pode ser obtida por diminuição ou eliminação de uma atividade de uma enzima que catalisa uma reação que resulta na geração de um composto diferente L-lisina ou uma atividade de uma enzima que funciona negativamente na produção de L-lisina. Exemplos de tais enzimas incluem homoserina desidrogenase, lisina decarboxilase (cadA, ldcC), e enzima málica, e cepas em que as atividades de tais enzimas são diminuídas ou deficientes são descritas em WO 95/23864, WO 96/17930, WO 2005/010175.

Bactérias produzindo L-triptofano são preferivelmente as tendo atividades melhoradas de uma ou mais dentre antranilato sintase, fosfoglicerato desidrogenase, e triptofano sintase. Antranilato sintase e fosfoglicerato desidrogenase são reguladas por inibição por retro-alimentação por L-triptofano e L-serina, respectivamente. Assim, estas enzimas podem ser modificadas de modo que a inibição por retro-alimentação é aliviada. Especificamente, gene da antranilato sintase (trpE) e/ou gene da fosfoglicerato desidrogenase (serA) é mudado de modo que a inibição por retro-alimentação é aliviada, e os genes mutantes são introduzidos em uma bactéria, por exemplo, uma bactéria pertencendo à família

Enterobacteriaceae. Exemplos específicos incluem uma cepa recombinante obtida por transformação de *Escherichia coli* SV164 que abriga uma antranilato sintase resistente à retro-alimentação com pGH5 (WO 94/08031), que contém um gene mutante serA codificando uma fosfoglicerato desidrogenase resistente à retro-alimentação.

A capacidade de produzir L-triptofano pode ser conferida por introdução de um DNA recombinante contendo o operon triptofano. Exemplos específicos dos mesmos incluem *Escherichia coli* transformado com um operon triptofano compreendendo o gene codificando uma antranilato sintase resistente à retro-alimentação (JP 57-71397 A, JP 62-244382 A, e patente US 4.371.614). A capacidade de produzir L-triptofano também pode ser conferida e/ou melhorada por melhora da expressão do gene codificando o operon triptofano, em particular, triptofano sintase (trpBA). Triptofano sintase tem subunidades α e β, que são codificadas por trpA e trpB, respectivamente.

A capacidade de produzir L-triptofano também pode ser conferida por interrupção do gene trpR, que reprime o operon triptofano, ou por introdução de uma mutação no gene trpR (patente US 4.371.614 e WO 2005/056776).

Exemplos preferíveis de bactérias produzindo L-triptofano incluem uma bactéria em que os operons de malato sintase, isocitrato liase, isocitrato desidrogenase quinase/fosfatase (operon ace) são constitutivamente expressados ou em que a expressão do operon é melhorada. É preferível modificar o promotor do operon ace para evitar a supressão pelo repressor iclR, ou o gene iclR pode ser interrompido.

A bactéria em que a expressão do operon ace foi melhorada pode ser obtida por ligação de um DNA contendo o operon ace a um promotor forte e introdução da construção obtida em uma bactéria usando um plasmídeo, recombinação homóloga ou transposon para aumentar um número

de cópias do DNA.

Além disso, exemplos de uma bactéria tendo capacidade de produzir L-triptofano incluem *Escherichia coli* AGX17 (pGX44) [NRRL B-122363] que exibe L-fenilalanina- e L-tirosina-auxotrofia e AGX6(pGX50)aroP [NRRL B-12264] que contém pGX50, que contém um operon triptofano (patente US 4.371.614).

L-triptofano, L-fenilalanina, e L-tirosina são aminoácidos aromáticos e são produzidos por uma via de biossíntese comum. Exemplos de genes codificando enzimas biossintéticas de aminoácido aromático incluem deoxiarabino-heptulosonato fosfato sintase (aroG), 3-dehidroxinato sintase (aroB), shikimato desidratase, shikimato quinase (aroL), 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintase (aroA), e corismato sintase (aroC) (EP 763127 A). Assim, uma capacidade de produzir aminoácido aromático pode ser melhorada por aumento do número de cópias destes genes em um plasmídeo ou em um cromossomo. Além disso, sabe-se que estes genes são regulados por um repressor de tirosina (tyrR), e a atividade das enzimas biossintéticas de aminoácido aromático pode ser aumentada por interrupção do gene tyrR (EP 763127 B).

Exemplos de uma bactéria tendo uma capacidade de produzir L-fenilalanina incluem AJ12739 em que o gene tyrA e o gene tyrR são interrompidos (tyrA:Tn10, tyrR) (VKPM B-8197), e uma cepa em que is genes de exportação de fenilalanina, como yddG e yedA, são amplificados (WO 03/044192).

Exemplos de uma bactéria tendo uma capacidade de produzir L-treonina incluem *Enterobacteriaceae* tendo atividade melhorada de uma enzima biossintética L-treonina. Exemplos de um gene codificando a enzima biossintética L-treonina incluem o gene da aspartoquinase III (lysC), gene da aspartato semialdeído desidrogenase (asd), gene da aspartoquinase I (thrA), gene da homoserina quinase (thrB), e o gene da treonina sintase (thrC). Os

termos em parêntese após os nomes de enzimas referem-se aos nomes dos genes codificando estas enzimas. Dois ou mais destes genes podem ser introduzidos na bactéria hospedeira. Este gene biossintético de L-treonina pode ser introduzido em uma bactéria *Escherichia* em que a degradação de L-treonina foi suprimida. Exemplos de uma bactéria *Escherichia* em que degradação de L-treonina foi suprimida incluem a cepa TDH6 em que uma atividade de treonina desidrogenase é deficiente (JP 2001-346578 A).

A atividade da enzima biossintética de L-treonina é suprimida por L-treonina. Assim, para construir uma bactéria produzindo L-treonina, um gene biossintético de L-treonina é preferivelmente modificado de modo que a enzima não é regulada por inibição por retro-alimentação por L-treonina. Entrementes, os genes thrA, thrB, e thrC descritos acima constituem um operon de treonina que forma uma estrutura de atenuador, e a expressão do operon de treonina é reprimida por isoleucina ou treonina no meio de cultura, isto é, reprimida por atenuação. A modificação pode ser obtida por remoção da seqüência líder e/ou do atenuador na região de atenuação (Lynn, S. P., Burton, W. S., Donohue, T. J., Gould, R. M., Gumport, R. I., e Gardner, J. F. J. Mol. Biol. 194: 59 - 69 (1987); WO 02/26993; e WO 2005/049808).

Um promotor específico está localizado a montante do operon de treonina e o promotor pode ser substituído por um promotor heterológo (WO 98/04715), ou o operon de treonina pode ser regulado por um repressor ou promotor de fago lambda (EP 0593792 B). Para modificar uma bactéria *Escherichia* de modo que o operon de treonina não seja regulado por inibição por retro-alimentação com L-treonina, uma cepa bacteriana que é resistente para ácido α-amino-β-hidroxivalérico (AHV) pode ser selecionada.

Preferivelmente, o operon de treonina modificado, que não é regulado por inibição por retro-alimentação com L-treonina, é ligado em um promotor forte, e introduzido em uma bactéria hospedeira. O aumento do número de cópias pode ser obtido por amplificação do operon de treonina

usando um plasmídeo ou por transferência do operon de treonina para um cromossomo usando um transposon, Mu-fago, ou outros.

É preferível para melhorar a expressão de genes envolvidos na via glicolítica, ciclo TCA, e cadeia respiratória, genes que regulam a expressão destes genes, e genes de absorção de açúcar, além dos genes codificando as enzimas biossintéticas de L-treonina. Exemplos de tais genes efetivos para a produção de L-treonina incluem o gene da transhidronase (pntAB) (EP 733712 B), gene da fosfoenolpiruvato carboxilase (pepC) (WO 95/06114), gene da fosfoenolpiruvato sintase (pps) (EP 877090), e gene da piruvato carboxilase derivados de uma bactéria corineforme ou uma bactéria *Bacillus* (WO 99/18228 e EP 1092776).

Isto é preferível para melhorar a expressão de genes que conferem resistência a L-treonina e L-homoserina, ou conferem resistência a L-treonina e/ou L-homoserina a um hospedeiro. Exemplos de tais genes incluem o gene rhtA (Res. Microbiol. 154: 123 - 135 (2003)), gene rhtB (EP 0994190 A), gene rhtC (EP 1013765 A), gene yfiK, e gene yeaS (EP 1016710 A). A resistência a L-treonina também pode ser conferida para um hospedeiro com referência aos métodos descritos em EP 0994190 A e WO 90/04636.

Exemplos de uma bactéria tendo uma capacidade de produzir L-treonina incluem a cepa *Escherichia coli* VKPM B-3996 (patente US 5.175.107). A cepa VKPM B-3996 foi depositada junto ao Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM), GNII Genetika em 7 de abril de 1987 e recebeu o número de acesso de VKPM B-3996. A cepa VKPM B-3996 contém o plasmídeo pVIC40 (WO 90/04636) que é obtido por inserção de um gene biossintético de treonina (operon de treonina: thrABC) em pAYC32, que é um vetor de plasmídeo com a uma faixa ampla de hospedeiro e compreende um marcador resistente a estreptomicina (Chistorerdov, A.Y., e Tsygankov, Y. D. Plasmid, 16, 161 - 167 (1986)). pVIC40 compreende um gene thrA mutante que codifica aspartoquinase L-

homoserina desidrogenase I que não é submetida à inibição por retro-alimentação por L-treonina.

Outro exemplo de uma bactéria tendo uma capacidade de produzir L-treonina é a cepa *Escherichia coli* B-5318 (EP 0593792 B). A cepa B-5318 foi depositada junto ao Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM), GNII Genetika em 3 de maio de 1990 e recebeu o número de acesso de VKPM B-5318. A cepa B-5318 é prototrófica com relação a isoleucina, e abriga um plasmídeo tendo um operon de treonina com uma região de atenuador localizada a jusante do repressor de C1 sensível a temperatura, promotor PR e sítio N-terminal de proteína Cro de fago lambda, de modo que a expressão dos genes biossintéticos de treonina é regulada pelo repressor e promotor de fago lambda.

<1-2> Melhora de atividade de fosfotransacetilase

A bactéria da presente invenção pode ser obtida por modificação da bactéria descrita acima tendo uma capacidade de produzir L-aminoácido de modo que a atividade de fosfotransacetilase é melhorada. No entanto, a capacidade de produzir L-aminoácido pode ser conferida após a bactéria ser modificada de modo que a atividade de fosfotransacetilase é melhorada.

A frase "modificado de modo que a atividade de fosfotransacetilase é melhorada" inclui quando o número de moléculas de fosfotransacetilase por célula aumenta e quando a atividade de fosfotransacetilase por molécula aumenta como comparado a uma cepa de tipo selvagem ou cepa não modificada. No caso de uma bactéria corineforme, exemplos da cepa de tipo selvagem a serem usadas como controle incluem *Corynebacterium glutamicum* (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869 e ATCC13032. Exemplos de um *Escherichia coli* de tipo selvagem incluem *Escherichia coli* W3110 (ATCC 27325) e *Escherichia coli* MG1655 (ATCC 47076), que são derivados da cepa K-12 de tipo selvagem protótipo.

Exemplos de um *Pantoea ananatis* de tipo selvagem incluem *Pantoea ananatis* AJ13355 (FERM BP-6614) e AJ13356 (FERM BP-6615).

Na presente invenção, fosfotransacetilase (fosfoacetiltransferase) catalisa a reação para gerar acetil-CoA e fosfato de fosfato de acetila e CoA ou a reação reversa do mesmo, e também é referida como fosfato acetiltransferase ou fosfoacetilase (EC 2.3.1.8).

Na presente invenção, a atividade de fosfotransacetilase melhorada pode ser determinada pelo método descrito em Reinscheid D. J. et al. (Microbiology. 145: 503 - 513 (1999)).

Atividade melhorada de fosfotransacetilase também pode ser confirmada por comparação do nível de mRNA do gene codificando fosfotransacetilase ao de uma cepa de um tipo selvagem ou não modificada. Métodos de detectar o nível de expressão de um gene incluem Northern hybridization e RT-PCR (Molecular cloning (Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor (USA), 2001). A atividade de fosfotransacetilase ou nível de expressão de gene na bactéria da presente invenção pode ocorrer em qualquer nível desde que seja aumentada como comparado a uma cepa de tipo selvagem ou não modificada, e, por exemplo, a atividade ou expressão de gene preferivelmente aumenta em não menos que 1,5-vezes, mais preferivelmente não menos que 2-vezes, além disso, preferivelmente não menos que 3-vezes como comparado a uma cepa de tipo selvagem ou não modificada.

O gene codificando fosfotransacetilase (gene pta) de uma bactéria corineforme inclui a seqüência de nucleotídeo de NCg12657 (ATCC13032) registrado em Genbank (um filamento complementar de 2936506..2937891 de acesso NC_003450.3). SEQ ID NOS: 40 e 41 mostram a seqüência de nucleotídeo do gene e a seqüência de aminoácido codificada pelo gene, respectivamente. Além disso, números de nucleotídeos 1214-2641 de SEQ ID NO: 34 e SEQ ID NO: 35 mostram a seqüência de nucleotídeo do

gene pta de *C. glutamicum* ATCC13869 e a seqüência de aminoácido codificada pelo gene, respectivamente.

Além disso, o gene da presente invenção pode ser um homólogo do gene pta que é derivado de outra bactéria desde que ele codifique uma proteína tendo a atividade de fosfotransacetilase. Um tal homólogo pode ser pesquisado em BLAST (http://blast.genome.jp/) ou outros com referência para a seqüência de nucleotídeo de nucleotídeos 1214 a 2641 de SEQ ID NO: 34 ou a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 40.

A seqüência de nucleotídeo do gene pta da presente invenção foi identificada. Assim, a região contendo o gene pta, ou o gene pta e suas seqüências reguladoras de expressão podem ser obtidas por PCR (PCR: polymerase chain reaction; White, T.J. et al., Trends Genet. 5, 185 (1989)) usando iniciadores preparados com base na seqüência de nucleotídeo conhecida, por exemplo, usando os iniciadores de SEQ ID NOS: 9 e 10, e usando o DNA cromossômico de uma bactéria corineforme como um gabarito. Um homólogo do gene pta derivado de outra bactéria pode ser obtido no mesmo modo.

Podem ocorrer diferenças entre as seqüências de nucleotídeos de genes pta dependendo da espécie ou cepas das bactérias usadas para isolar o gene pta. Assim, o gene pta a ser usado na presente invenção não é limitado aos nucleotídeos 1214 a 2641 de SEQ ID NO: 34 ou a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 40, mas pode ser um gene mutante ou um gene artificialmente modificado que codifica uma proteína tendo a seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 35 ou 41 e que pode incluir substituições, deleções, inserções, ou adições de um ou vários aminoácidos em uma ou várias posições desde que codifiquem uma proteína tendo a atividade de fosfotransacetilase. Apesar de depender de posições na estrutura ternária da proteína ou tipos de aminoácidos, o termo "um ou vários" usado aqui especificamente significa de 1 a 20, preferivelmente de 1 a 10, mais

preferivelmente de 1 a 5. Entrementes, estas substituições, deleções, inserções, adições, ou inversões incluem mutações naturalmente ocorrendo (mutantes ou variantes) devido às diferenças em indivíduos ou espécies das bactérias abrigando o gene pta.

A substituição mencionada acima é preferivelmente uma substituição conservadora que não provoca uma mudança funcional. As substituições conservadoras incluem uma substituição entre aminoácidos aromáticos como substituição dentre Phe, Trp e Tyr; uma substituição entre aminoácidos hidrofóbicos como substituição dentre Leu, Ile e Val; uma substituição entre aminoácidos polares como substituição entre Gln e Asn; uma substituição entre aminoácidos básicos como substituição dentre Lys, Arg e His; uma substituição entre aminoácidos acídicos como substituição entre asp e Glu; uma substituição entre aminoácidos tendo um grupo hidroxila como substituição entre Ser e Thr. Exemplos específicos da substituição conservadora incluem: substituição de Ser ou Thr por Ala; substituição de Gln, His, ou Lys por Arg; substituição de Glu, Gln, Lys, His ou Asp por Asn; substituição de Asn, Glu, ou Gln por Asp; substituição de Ser ou Ala por Cys; substituição de Asn, Glu, Lys, His, Asp, ou Arg por Gln; substituição de Gly, Asn, Gln, Lys, ou Asp por Glu; substituição de Pro por Gly; substituição de Asn, Lys, Gln, Arg, ou Tyr por His; substituição de Leu, Met, Val, ou Phe por Ile; substituição de Ile, Met, Val, ou Phe por Leu; substituição de Asn, Glu, Gln, His, ou Arg por Lys; substituição de Ile, Leu, Val, ou Phe por Met; substituição de Trp, Tyr, Met, Ile, ou Leu por Phe; substituição de Thr ou Ala por Ser; substituição de Ser ou Ala por Thr; substituição de Phe ou Tyr por Trp; substituição de His, Phe, ou Trp por Tyr; e substituição de Met, Ile, ou Leu por Val.

Além disso, o gene pta pode ser um gene que tem uma seqüência de nucleotídeo tendo pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente 95%, particularmente preferivelmente pelo menos

97% homologia para a seqüência completa de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 ou 41, e codifica uma proteína tendo a atividade de fosfotransacetilase. Também, o gene pta pode ser modificado para ter um códon que é facilmente usado pela bactéria hospedeira escolhida porque os níveis de degeneração de genes são diferentes dependendo da bactéria hospedeira.

O gene pta pode ter uma seqüência alongada ou encurtada no lado N-terminal e/ou lado C-terminal desde que codifique uma proteína tendo atividade de fosfotransacetilase. O comprimento da seqüência de aminoácido que é alongada ou encurtada é de 50 ou menos, preferivelmente 20 ou menos, mais preferivelmente 10 ou menos, particularmente preferivelmente 5 ou menos. Mais especificamente, o gene pta pode ter uma seqüência de aminoácido de SEQ ID NO: 35 ou 41 em que um adicional de 50 a 5 aminoácidos estão presentes no lado N-terminal e/ou no lado C-terminal.

Um homólogo do gene pta pode ser obtido por modificação da seqüência de nucleotídeo de nucleotídeos 1214 a 2641 de SEQ ID NO: 34 ou a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 40 de modo que os resíduos de aminoácido específico na proteína codificada pelo gene são substituídos, deletados, inseridos, ou adicionados, por exemplo, por mutagenese sítio-específica. Além disso, um gene homólogo também pode ser obtido por um tratamento de mutação conhecido como descrito abaixo. Um gene homólogo pode ser obtido por tratamento de uma seqüência descrita acima de nucleotídeo in vitro com hidroxilamina ou outros, tratamento de uma bactéria abrigando o gene, por exemplo, uma bactéria corineforme com raios ultravioletas ou com um mutagene como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) ou etilmetanossulfonato (EMS), ou por introdução artificial de uma mutação no gene pta por recombinação de genes, como PCR propenso a erros, embaralhamento de DNA, e StEP-PCR (Firth AE, Patrick WM; Bioinformatics. 2005 Jun 2; Statistics of protein library construction). A determinação da atividade enzimática pelo método descrito acima pode

confirmar se este homólogo do gene pta codifica uma proteína tendo a atividade de fosfotransacetilase.

Exemplos do gene pta incluem um DNA que hibridiza com uma seqüência complementar para nucleotídeos 1214 a 2641 de SEQ ID NO: 34 ou uma seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 40, ou com uma sonda que pode ser preparada a partir das seqüências sob condições estringentes e codifica uma proteína tendo a atividade de fosfotransacetilase. O termo "condições estringentes" usado aqui inclui condições sob as quais o assim chamado híbrido específico é formado e híbrido não específico não é formado. Exemplos dos mesmos incluem condições sob as quais DNAs tendo homologia elevada de pelo menos 80%, preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95%, ainda mais preferivelmente pelo menos 97% hibridizam com cada outro e DNAs tendo homologia menos que 80% não hibridizam com cada outro; e especificamente incluem condições de lavagem em hibridização Southern geral, isto é, condições incluindo lavagem em uma concentração de sal de 1 x SSC, 0,1% SDS, preferivelmente 0,1 x SSC, 0,1% SDS a 60 °C, preferivelmente 68 °C, uma vez, preferivelmente duas vezes ou três vezes.

Como uma sonda, uma seqüência parcial de nucleotídeos 1214 a 2641 de SEQ ID NO: 34 ou uma seqüência parcial da seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 40 pode ser usada. Esta sonda pode ser preparada por PCR usando oligonucleotídeos preparados com base na seqüência de nucleotídeos como iniciadores e um fragmento de DNA tendo a seqüência de nucleotídeo de nucleotídeos 1214 a 2641 de SEQ ID NO: 34 ou a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 40 como um gabarito. Por exemplo, quando usando um fragmento de DNA tendo um comprimento de cerca de 300 bp, condições de lavagem exemplares incluem a hibridização em 2 x SSC, 0,1% SDS a 50 °C.

A expressão do gene pta pode ser melhorada por aumento do

número de cópia do gene pta. Por exemplo, a expressão pode ser melhorada por preparação de um DNA recombinante por ligação de um fragmento contendo o gene pta em um vetor que funciona na bactéria hospedeira, preferivelmente um vetor de múltiplas cópias; e então transformação da bactéria descrita acima tendo uma capacidade de produzir L-aminoácido com o DNA recombinante. Alternativamente, a expressão pode ser melhorada por introdução do DNA recombinante descrito acima em uma bactéria de tipo selvagem para preparar um transformante, e então conferir uma capacidade de produzir L-aminoácido para o transformante. Entrementes, o número de cópias pode ser aumentado por transferência de uma ou mais cópias do gene pta no cromossomo. A integração do gene pta no cromossomo pode ser confirmada por hibridização Southern usando uma parte do gene pta como uma sonda.

Expressão do gene pta também pode ser melhorada por modificação de uma região reguladora de expressão do gene pta. Por exemplo, isto pode ser obtido por substituição de uma seqüência promotora do gene pta com um promotor mais potente, ou modificação de uma seqüência promotora para ficar próxima de uma seqüência de consenso (WO 00/18935).

Abaixo, métodos de construir uma bactéria corineforme modificada de modo que a atividade de fosfotransacetilase é aumentada serão mostrados. Estes métodos podem ser realizados de acordo com os manuais de Molecular cloning (Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor (USA), 2001) e outros. Bactérias diferentes da bactéria corineforme também podem ser modificadas de modo que a atividade de fosfotransacetilase é aumentada pelo mesmo método.

O nível de expressão do gene pta pode ser melhorado por aumento do número de cópias do gene pta, e o número de cópias pode ser aumentado por amplificação do gene pta usando um plasmídeo como descrito

abaixo. Primeiro, o gene pta é clonado a partir do cromossomo de uma bactéria corineforme. O DNA cromossômico pode ser preparado a partir de uma bactéria que serve como um doador de DNA por, por exemplo, o método de Saito e Miura (Biochem. Biophys. Acta, 72, 619 (1963), Experiment Manual for Biotechnology, editado pela The Society for Biotechnology, Japão, p 97-98, Baifukan Co., Ltd., 1992). Oligonucleotídeos para PCR são sintetizados com base na informação de seqüência conhecida descrita acima, e o gene pta pode ser amplificado por uso dos oligonucleotídeos sintéticos de SEQ ID NOS: 9 e 10, por exemplo.

Um fragmento de gene contendo o gene pta amplificado é ligado a um vetor que é autonomamente replicável em *Escherichia coli* e/ou bactéria corineforme, e o DNA recombinante é introduzido em *Escherichia coli*. Exemplos de um vetor que é autonomamente replicável em *Escherichia coli* incluem pUC19, pUC18, pHSG299, pHSG399, pHSG398, RSF1010, pBR322, pACYC184, e pMW219.

O DNA mencionado acima é introduzido em um vetor capaz de funcionar em bactéria corineforme. Um exemplo deste vetor inclui um plasmídeo capaz de replicar autonomamente em bactéria corineforme. Exemplos específicos dos mesmos incluem pCRY30 descrito em JP 3-210184 A; pCRY21, pCRY2KE, pCRY2KX, pCRY31, pCRY3KE, e pCRY3KX descrito em JP 2-72876 A e patente US 5.185.262; pCRY2 e pCRY3 descrito em JP 1-191686 A; pAM330 descrito em JP 58-67679 A; pHM1519 descrito em JP 58-77895 A; pAJ655, pAJ611, e pAJ1844 descrito em JP 58-192900 A; pCG1 descrito em JP 57-134500 A; pCG2 descrito em JP 58-35197 A; pCG4 e pCG11 descrito em JP 57-183799 A; e pVK7 descrito em JP 10-215883 A.

Além disso, se um fragmento de DNA capaz de replicar autonomamente em uma bactéria corineforme for excisado a partir de um dentre estes plasmídeos e inserido no vetor descrito acima para *Escherichia*

coli, este vetor pode ser usado como um assim chamado vetor bidirecional, e ele será replicável autonomamente em tanto *Escherichia coli* como em bactéria corineforme.

Estes vetores podem ser obtidos a partir das bactérias depositadas mostradas nos documentos de patente descritos acima como a seguir. As células coletadas na fase de crescimento logarítmico são lisadas com lisozima e SDS, e centrifugadas a 30,000 x g, e então polietileno glicol é adicionado ao sobrenadante, seguido por separação e purificação por centrifugação de gradiente de equilíbrio brometo de etídio - cloreto de césio.

Para preparar um DNA recombinante por ligação do gene pta com um vetor que funciona em bactérias corineformes, o vetor é digerido com uma enzima de restrição apropriada por excisão de um fragmento contendo o gene pta. O sítio de restrição pode ser introduzido antes em um oligonucleotídeo sintético para amplificar o gene pta. A ligação é geralmente realizada usando uma ligase como T4DNA ligase.

O plasmídeo recombinante preparado como descrito acima pode ser introduzido em uma bactéria corineforme por qualquer método de transformação registrado até agora. Exemplos dos mesmos incluem aumentar a permeabilidade de um DNA por tratamento das células recipientes com cloreto de cálcio, o que foi relatado para *Escherichia coli* K-12 (Mandel, M. e Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970), e introdução de um DNA em células competentes preparadas a partir das células no estágio de proliferação, que foi relatado para *Bacillus subtilis* (Duncan, C. H., Wilson, G.A e Young, F. E, Gene, 1, 153 (1977)). Alternativamente, a preparação de células de tipo protoplasto ou células de tipo esferoplasto a partir de uma bactéria recipiente de DNA, que pode facilmente incorporar um DNA recombinante, e introduzir um DNA recombinante nestas células, também pode ser usada (Chang, S. e Choen, S. N., Mol. Gen. Genet., 168, 111 (1979); Bibb, M. J., Ward, J. M. e Hopwood, O. A., Nature, 274, 398 (1978); Hinnen, A., Hicks, J. B. e Fink, G.

R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 1929 (1978)). Uma bactéria corineforme também pode ser transformada pelo método de pulso elétrico (JP 02-207791 A) ou o método de transferência por conjugação (Biotechnology (NY). 1991 Jan; 9(1): 84-7).

O número de cópias do gene pta pode ser aumentado por introdução de cópias múltiplas do gene pta no DNA cromossômico de uma bactéria corineforme. A fim de introduzir cópias múltiplas do gene pta no DNA cromossômico de uma bactéria corineforme, a recombinação homóloga é realizada usando uma seqüência que está presente em um DNA cromossômico em cópias múltiplas. DNA repetitivo ou uma repetição invertida existente na extremidade de um elemento transposável pode ser usado como uma seqüência que está presente em um DNA cromossômico em cópias múltiplas. Alternativamente, como descrito em JP 02-109985 A, as cópias múltiplas do gene pta podem ser introduzidas por inserção do gene em um transposon, para assim transferir as cópias múltiplas do gene em um DNA cromossômico (JP 02-109985 A, JP 07-107976 A, and Mol. Gen. Genet., 245, 397 - 405 (1994), Plasmid. 2000 Nov; 44(3): 285 - 91).

Além disso, o gene pta pode ser amplificado no cromossomo por inserção do gene pta em um plasmídeo tendo uma origem de replicação que não pode replicar no hospedeiro ou um plasmídeo tendo uma origem de replicação que não pode replicar no hospedeiro e é capaz de transferir a conjugação. Exemplos de tais plasmídeos incluem pSUP301 (Simo et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob, ou pK19mob (Schaefer et al., Gene 145, 69 - 73 (1994)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269: 32678-84; patente US 5487993), pCR(R)Blunt (Invitrogen, Groningen, Netherlands; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534 - 541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al., 1991, Journal of Bacteriology 173: 4510 - 4516), e pBGS8 (spratt et al., 1986, Gene, 41: 337 - 342). Um vetor de

plasmídeo contendo o gene pta é transferido para uma bactéria corineforme por conjugação ou transformação. Um método de conjugação é descrito, por exemplo, por Schaefer et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 756 - 759 (1994)). Os métodos da transformação são descritos, por exemplo, por Theirbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356 - 362 (1988)), Dunican e Shivinan (Bio/Technology 7, 1067 - 1070 (1989)), e Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343 - 347 (1994)).

Expressão do gene pta também pode ser aumentada por substituição de uma seqüência reguladora de expressão como o promotor do gene pta no DNA cromossômico ou em um plasmídeo com um promotor mais potente, modificação de um fator envolvido na regulação de expressão do gene pta, por exemplo, um operador ou um repressor, ou ligação de um terminador mais potente (Hamilton et al.; Journal of Bacterology 171: 4617 - 4622). Exemplos de promotores potentes conhecidos incluem o promotor lac, promotor trp, promotor trc, e promotor PS2. Os métodos de avaliação da potência do promotor e exemplos de promotores potentes são descritos por Goldstein et al. (Prokaryotic promotors in biotechnology. Biotechnol. Annu. Rev., 1995, 1. 105 - 128). Como descrito em WO 00/18935, um promotor pode ser tornado mais forte por introdução de uma substituição de vários nucleotídeos na região do promotor do gene de marcação de modo que o promotor se torna próximo a uma seqüência de consenso. Por exemplo, a região –35 pode ser mudada em TTGACA ou TTGCCA, enquanto a região –10 pode ser mudada em TATAAT ou TATAAC. Além disso, sabe-se que a eficiência de tradução de mRNA é significantemente afetada por substituição de vários nucleotídeos em uma seqüência de espaçador entre o sítio de ligação do ribossomo (RBS) e o códon de iniciação de tradução, em particular, a seqüência imediatamente a montante do códon de iniciação de tradução e, deste modo, a seqüência do espaçador pode ser modificada.

Um exemplo de uma região a montante do gene pta inclui

nucleotídeos 1 a 1213 de SEQ ID NO: 34. Uma seqüência reguladora de expressão como um promotor do gene pta pode ser determinada usando um promotor de busca de vetor ou software para encontrar genes, como GENETYX. A substituição do promotor descrito acima ou modificação melhora a expressão do gene pta. A seqüência reguladora de expressão também pode ser substituída usando um plasmídeo sensível a temperatura. A modificação de uma seqüência reguladora de expressão pode ser combinada com aumento do número de cópias do gene pta.

Além disso, a expressão também pode ser aumentada prolongando o tempo de retenção do mRNA ou evitando a degradação da proteína PTA na célula.

Também, se tem um sítio de ligação para a proteína RamB que regula negativamente a expressão do gene pta. Este sítio de ligação está localizado a montante do gene pta em bactéria corineforme e, assim, o sítio de ligação de proteína RamB pode ser modificado para aumentar a atividade de pta. Os sítios de ligação de proteína RamB a montante de um gene pta foram registrados em J Bacteriol. 2004 May; 186 (9): 2798 - 2809, e são previstos como incluindo AAAACTTTGCAAA partindo na posição -87 e AAAACTTTGCAAA partindo na posição -203, como contado a partir do códon de iniciação de tradução do gene pta (as seqüências destes sítios de ligação de proteína RamB correspondem aos nucleotídeos 1000 a 1012 e 1115 a 1127 de SEQ ID NO: 34, respectivamente). Uma seqüência de ligação de proteína A RamB é registrada como tendo uma seqüência de consenso de A(A/G)AACTTTGCAAA e está localizada a montante do gene aceA que codifica isocitrato liase, o gene aceB que codifica malato sintase, e o operon pta-ack, e a expressão destes genes é induzida na presença de uma concentração elevada de ácido acético. Assim, a modificação da seqüência conservada pode evitar a diminuição em expressão do gene pta devido à ligação de RamB, e exemplos de uma modificação da seqüência incluem a

substituição de um par de bases AT com um par de bases GC e a substituição de um par de bases GC com um par de bases AT, especificamente inclui substituir AAAACTTTGCAAA com aaaacGAGgcGaG ou aaaacGAGgcaaa.

Se o gene pta for modificado de modo a ser negativamente regulado por RamB pode ser confirmado por exame de se o gene pta é constitutivamente expressado na ausência de ácido acético (por exemplo, somente glicose está presente como uma fonte de carbono) (J Bacteriol. 2004 May; 186 (9): 2798 - 809).

A atividade de fosfotransacetilase também pode ser aumentada por modificação de uma proteína reguladora que regula a expressão do gene pta. Um exemplo de um regulador para o gene pta inclui a proteína RamB descrita acima porque ela negativamente controla a expressão do gene pta. O gene ramB de bactéria corineforme foi registrado em Genbank. Por exemplo, o gene ramB de cepa *glutamicum* ATCC13032 é registrado sob um No. de acesso NC_006958.1:390784..392208. SEQ ID NOS: 42 e 43 mostram a seqüência do gene ramB e a seqüência de aminoácido codificada pelo gene ramB, respectivamente. Entrementes, SEQ ID NO: 36 e 37 mostram o gene ramB de cepa *C. glutamicum* ATCC13869 e a seqüência de aminoácido codificada pelo gene ramB, respectivamente. O gene RamB pode ser um DNA que hibridiza com um filamento complementar da seqüência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 36 ou 42 ou com uma sonda preparada a partir dai sob condições estringentes, e codifica uma proteína que liga para os sítios de ligação RamB de modo a reprimir a expressão do gene pta. Aqui, as condições estringentes são como mencionadas acima.

Expressão do gene ramB pode ser diminuída para melhorar a expressão do gene pta. Por exemplo, uma mutação que diminui ou elimina a expressão do gene ramB pode ser introduzida por uma técnica de recombinação de genes, como a seguir. Uma seqüência parcial do gene ramB é mudada de modo que a proteína RamB não é produzida, e uma bactéria é

transformada com um DNA compreendendo o gene ramB mutante de modo a causar a recombinação entre o gene ramB mutante e um gene ramB de tipo selvagem no cromossomo, resultando em substituição do gene ramB de tipo selvagem no cromossomo com o gene ramB mutante.

O gene ramB de tipo selvagem no cromossomo de uma bactéria hospedeira pode ser substituído pelo gene ramB mutante pelos seguintes procedimentos, por exemplo. Primeiro, um plasmídeo para recombinação é preparado por inserção, em um vetor de plasmídeo, de uma origem de replicação sensível a temperatura, o gene ramB mutante, um gene sacB codificando uma levansucrase, e um gene marcador que exibe resistência a um antibiótico, como cloranfenicol.

Aqui, o gene sac B codifica uma levansucrase, e é usado para selecionar efetivamente uma cepa em que uma porção de vetor foi curada a partir do cromossomo (Schafer, A. et al. Gene 145 (1994) 69 - 73). Quando uma levansucrase é expressada em uma bactéria, a bactéria não pode crescer porque o levano gerado por assimilação de sacarose afeta letalmente a bactéria. Se uma cepa em que o vetor transportando o gene sacB permanece no cromossomo for cultivada em uma placa contendo sacarose, ela não pode crescer. Assim, somente uma cepa em que o vetor foi curado do cromossomo pode ser selecionada em uma placa contendo sacarose.

Exemplos de um gene sacB e homólogos dos mesmos incluem os seguintes:

Bacillus subtilis: sacB número de acesso no Genbank X02730 (WO 2005/113745)

Bacillus amyloliquefaciens: sacB número de acesso no Genbank X52988

Zymomonas mobilis: sacB número de acesso no Genbank L33402

Bacillus stearothermophilus: surB número de acesso no Genbank U34874

Lactobacillus sanfranciscensis: frfA número de acesso no Genbank AJ508391

Acetobacter xylinus: lsxA número de acesso no Genbank AB034152

Gluconacetobacter diazotrophicus: lsdA número de acesso no Genbank L41732

O transformante obtido por introdução de um plasmídeo contendo o gene sacB e o gene ramB mutante é cultivado em uma temperatura apropriada para o funcionamento da origem de replicação sensível a temperatura (25 °C). Esta cepa é cultivada em uma temperatura elevada (por exemplo, 34 °C) de modo que a origem de replicação sensível a temperatura não pode funcionar, resultando na cura do plasmídeo sensível a temperatura, e então esta cepa é cultivada em uma placa contendo um antibiótico. Porque o plasmídeo sensível a temperatura não pode replicar em temperatura elevada, uma cepa que foi curada do plasmídeo não pode crescer em uma placa contendo um antibiótico, mas uma cepa em que a recombinação ocorre entre o gene ramB mutante no plasmídeo e o gene ramB de tipo selvagem no cromossomo pode crescer, e as colônias aparecem.

Em uma cepa contendo o gene ramB mutante integrado no DNA cromossômico, a recombinação é causada entre o gene ramB mutante e o gene ramB de tipo selvagem nativo para o cromossomo, e os genes de fusão do gene ramB de tipo selvagem e o gene ramB mutante são inseridos no cromossomo de modo que as outras porções do DNA recombinante (segmento de vetor, origem de replicação sensível a temperatura e marcador de resistência a antibiótico) estão presentes entre os genes de fusão.

Então, a fim de deixar somente o gene ramB mutante no cromossomo, uma cópia do gene ramB é eliminada junto com o segmento de vetor (incluindo a origem de replicação sensível a temperatura e o marcador de resistência a antibiótico) do DNA cromossômico. Neste caso, o gene ramB

de tipo selvagem é deixado no DNA cromossômico e o gene ramB mutante é excisado a partir do DNA cromossômico, ou ao contrário, o gene ramB mutante é deixado no DNA cromossômico e o gene ramB de tipo selvagem é excisado a partir do DNA cromossomo. Em ambos os casos, o DNA excisado é mantido na bactéria hospedeira quando a bactéria hospedeira é cultivada em uma temperatura que permite o funcionamento da origem de replicação sensível a temperatura. Então, o gene no plasmídeo é curado a partir das células junto com o plasmídeo por cultivo da bactéria em uma temperatura que não permite o funcionamento da origem de replicação sensível a temperatura. No caso do gene sacB, as cepas a partir das quais o plasmídeo é curado podem ser eficientemente obtidas por cultivo da bactéria em um meio contendo sacarose. As cepas em que o gene ramB de tipo selvagem é substituído com o gene ramB mutante podem ser obtidas por seleção das cepas que abrigam o gene ramB mutante das cepas curadas por plasmídeo.

A bactéria da presente invenção pode ser modificada de modo que a atividade/atividades de D-xilose 5-fosfato-fosfocetolase e/ou frutose 6-fosfato fosfocetolase é/são aumentada(s), além de melhorar a atividade de fosfotransacetilase.

Pelo menos uma dentre a atividade de D-xilose 5-fosfato-fosfocetolase e a atividade de frutose 6-fosfato fosfocetolase pode ser aumentada. Na presente descrição, D-xilose 5-fosfato-fosfocetolase e frutose 6-fosfato fosfocetolase são algumas vezes coletivamente referidas como fosfocetolase.

A atividade de D-xilose 5-fosfato-fosfocetolase significa uma atividade que resulta em conversão de xilose-5-fosfato em gliceraldeído-3-fosfato e fosfato de acetila por consumo de ácido fosfórico, com liberação concomitante de uma molécula de H_2O. Esta atividade pode ser determinada pelo método descrito por Goldberg, M. et al. (Methods Enzymol., 9, 515 - 520 (1996) ou pelo método descrito por L. Meile (J. Bacteriol. (2001) 183; 2929 -

2936).

Entrementes, a atividade de frutose 6-fosfato fosfocetolase significa uma atividade que resulta em conversão de frutose 6-fosfato em eritrose-4-fosfato e fosfato de acetila por consumo de ácido fosfórico, com liberação concomitante de uma molécula de H_2O. Esta atividade pode ser determinada pelo método descrito por Racker, E (Methods Enzymol., 5, 276 - 280 (1962)) ou pelo método descrito por L. Meile (J. Bacteriol. (2001) 183; 2929 - 2936).

A atividade de fosfocetolase é melhorada preferivelmente em não menos que 1,5-vezes, mais preferivelmente não menos que 2-vezes, particularmente preferivelmente não menos que 3-vezes como comparado para uma cepa não modificada ou uma cepa de tipo selvagem.

Como é o caso quando melhorando a atividade de fosfotransacetilase como descrito acima, a atividade de fosfocetolase pode ser melhorada por aumento do número de cópia do gene codificando fosfocetolase ou modificação de um promotor do gene codificando fosfocetolase.

O gene fosfocetolase da bactéria hospedeira pode ser amplificado, e a atividade de fosfocetolase pode ser conferida por introdução de um gene heterólogo se a bactéria hospedeira não apresentar atividade de fosfocetolase.

Um gene codificando D-xilose 5-fosfato-fosfocetolase pode ser obtido por PCR usando, como um gabarito, o DNA cromossômico de uma bactéria tendo uma atividade de enzima de D-xilose 5-fosfato-fosfocetolase. Exemplos desta bactéria incluem bactérias como bactérias lácticas, bactérias assimilando metanol, bactérias assimilando metano, bactérias pertencendo ao gênero *Streptococcus*, *Acetobacter*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Thiobacillus*, *Methylococcus*, *Butyrivibrio*, ou *Fibrobactor*; e leveduras pertencem ao gênero *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodosporidium*, *Pichia*,

Yarrowia, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Trichosporon*, *Wingea*, ou outros.

O gene codificando frutose 6-fosfato fosfocetolase pode ser obtido por PCR usando, como um gabarito, o DNA cromossômico de uma bactéria tendo uma atividade enzimática de frutose 6-fosfato fosfocetolase. Exemplos desta bactéria incluem bactérias pertencendo ao gênero *Acetobacter*, *Bifidobacterium*, *Chlorobium*, *Brucella*, *Methylococcus*, ou *Gardnerella*; e leveduras pertencem ao gênero *Candida*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, ou outros.

Um exemplo específico do gene codificando D-xilose 5-fosfato fosfocetolase é o gene xpkA derivado de *Lactobacillus pentosus* MD363. A seqüência de nucleotídeo do mesmo é registrada com um número de acesso de AJ309011 (Posthuma, C. C. et al, Appl. Environ. Microbiol., 68(2), 831-7(2002)) (SEQ ID NO: 52) nos bancos de dados EMBL/GenBank. O gene xpkA pode hibridizar com um filamento complementar da seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 52 ou com uma sonda preparada a partir dai sob condições estringentes, e que codifica uma proteína que tem atividade de D-xilose 5-fosfato fosfocetolase.

O gene xpk1 derivado de *Lactobacillus plantarum* também pode ser usado. A seqüência de nucleotídeo do mesmo é registrada com um número de acesso de Região NC_004567 (complemento de 2362936..2365302) (Kleerebezem, M., et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (4), 1990 - 1995 (2003)) (SEQ ID NO: 54) nos bancos de dados EMBL/GenBank. O gene xpk1 pode hibridizar com um filamento complementar da seqüência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 54 ou com uma sonda preparada a partir dai, sob condições estringentes e codifica uma proteína que tem atividade D-xilose 5-fosfato fosfocetolase.

Além disso, exemplos de homólogos destes genes incluem um gene de *Lactobacillus plantarum* que é registrado como número de acesso no

Genbank NC_004567 (complemento de 3169067-3171478), um gene de *Streptococcus agalactiae* codificando a seqüência de aminoácido de número de acesso no Genbank NP_736274, um gene de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* codificando a seqüência de aminoácido de número de acesso no Genbank NP_267658, um gene de *Lactobacillus johnsonii* que é registrado como número de acesso no Genbank NC_005362 (696462..698867), e um gene de *Lactobacillus acidophilus* codificando a seqüência de aminoácido de número de acesso no Genbank YP_193510.

Outros exemplos de gene frutose 6-fosfato fosfocetolase e/ou o gene D-xilose 5-fosfato fosfocetolase são descritos em WO2006/016705.

Um gene codificando uma proteína tendo as atividades de ambos D-xilose 5-fosfato fosfocetolase e frutose 6-fosfato fosfocetolase também pode ser usado. Exemplos deste gene incluem o gene xfp de *Bifidobacterium animalis*. A seqüência de nucleotídeo do mesmo é registrada como número de acesso de AJ293946 (Meile, L. et al, J. Bacteriol., 183(9), 2929 - 36 (2001)) (SEQ ID NO: 56) nos bancos de dados EMBL/GenBank. O gene xfp pode hibridizar com um filamento complementar da seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 56 ou com uma sonda preparada a partir da mesma sob condições estringentes, e que codifica uma proteína que tem atividade de D-xilose 5-fosfato fosfocetolase e atividade de frutose 6-fosfato fosfocetolase.

Além disso, exemplos de um homólogo do gene xfp incluem um gene isolado de *Bifidobacterium longum* que codifica a seqüência de aminoácido de número de acesso no Genbank NP_696135, um gene isolado de *Chlorobium tepidum* que codifica a seqüência de aminoácido de número de acesso no Genbank NP_662409, um gene isolado de *Brucella suis* que codifica a seqüência de aminoácido de número de acesso no Genbank NP_699578, e um gene isolado de *Brucella abortus* que codifica a seqüência de aminoácido de número de acesso no Genbank YP_223570.

A bactéria da presente invenção pode ser modificada de modo que a atividade da piruvato carboxilase é aumentada, além de melhorar a atividade de fosfotransacetilase, ou também para melhorar as atividades de fosfotransacetilase e D-xilose 5-fosfato-fosfocetolase e/ou frutose 6-fosfato fosfocetolase.

Exemplos do gene da piruvato carboxilase incluem o gene pyc derivado de bactéria corineforme e o gene pyc derivado de bactéria *Bacillus* e exemplos específicos dos mesmos incluem o gene pyc derivado de cepa *C. glutamicum* ATCC13032 (número de acesso no Genbank NCgl0659: SEQ ID NO: 64) e o gene pyc derivado de *B. subtilis* (EP 1092776). O gene da piruvato carboxilase pode hibridizar com um filamento complementar da seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 64 ou com uma sonda preparada a partir do mesmo sob condições estringentes, e que codifica uma proteína que tem atividade de piruvato carboxilase.

A bactéria da presente invenção também pode ser modificada de modo que a atividade de fosfoenolpiruvato carboxilase é aumentada, além de melhorar a atividade de fosfotransacetilase ou além de melhorar as atividades de fosfotransacetilase, D-xilose 5-fosfato-fosfocetolase e/ou frutose 6-fosfato fosfocetolase. Exemplos de um gene da fosfoenolpiruvato carboxilase incluem o gene ppc derivado de bactéria corineforme e o gene ppc derivado de bactéria *Escherichia* e exemplos específicos dos mesmos incluem o gene ppc de cepa *C. glutamicum* ATCC13032 (número de acesso no Genbank NCgl1523: SEQ ID NO: 62) e o gene ppc derivado de cepa *E. coli* MG1655 (número de acesso no Genbank NP_418391). O gene da fosfoenolpiruvato carboxilase pode hibridizar com um filamento complementar da seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 62 ou com uma sonda preparada a partir da mesma, sob condições estringentes, e que codifica uma proteína que tem atividade de fosfoenolpiruvato carboxilase. Além disso, porque algum tipo de fosfoenolpiruvato carboxilase é sensível à inibição por

retro-alimentação por ácido aspártico, ela é preferivelmente modificada de modo a se tornar resistente à inibição por retro-alimentação por ácido aspártico (EP0723011).

<2> Método de produzir L-aminoácido

Um L-aminoácido pode ser produzido por cultivo de uma bactéria obtida como descrito acima em um meio para produzir e acumular um L-aminoácido no meio ou nas células bacterianas e coletar o L-aminoácido a partir do meio ou a partir das células bacterianas.

O meio pode ser um meio geral contendo uma fonte de carbono, fonte de nitrogênio, sais inorgânicos, e se necessário, nutrientes orgânicos de traço, como um aminoácido ou uma vitamina. Ambos um meio sintético ou um meio natural pode ser usado. A fonte de carbono e a fonte de nitrogênio pode ser qualquer substância desde que possa ser utilizada pela cepa escolhida.

Açúcares como glicose, glicerol, frutose, sacarose, maltose, manose, galactose, hidrolisado de amido, e melaços podem ser usados como a fonte de carbono, e um ácido orgânico como ácido acético ácido cítrico e um álcool como etanol também pode ser usado sozinho ou em combinação com outra fonte de carbono. Como uma fonte de nitrogênio, um sal de amônio como amônia, sulfato de amônia, carbonato de amônio, cloreto de amônio, fosfato de amônio, ou acetato de amônio, ou um sal nitrato pode ser usado. Como nutrientes orgânicos de traço, um aminoácido, uma vitamina, um ácido graxo, e um ácido nucleico, assim como peptona, ácido casamino, extratos de levedura, hidrolisado de soja contendo estes nutrientes podem ser usados e, no caso de usar uma cepa mutante auxotrófica nutriente, que requer um aminoácido ou outros para crescimento, os nutrientes requeridos são suplementados. Um sal de fosfato, um sal de magnésio, um sal de cálcio, um sal de ferro, um sal de manganês, ou outros podem ser usados como o sal inorgânico.

A cultura é preferivelmente realizada com aeração enquanto ajustando a temperatura de fermentação a 20 a 45 °C e o pH a 3-9. Se o pH for abaixado durante a cultura, o meio é neutralizado por adição de carbonato de cálcio ou um alcalino como gás de amônia ou outros. A cultura é realizada sob tais condições preferivelmente durante cerca de 10 a 120 horas, assim, uma quantidade grande de L-aminoácido é capaz de se acumular no meio de cultura.

Quando produzir ácido L-glutâmico, a cultura pode ser realizada usando um meio líquido que é ajustado para as condições apropriadas para produzir ácido L-glutâmico, enquanto ao mesmo tempo precipitando o ácido L-glutâmico no meio. Exemplos de tais condições incluem uma faixa de pH de 5,0 a 4,0, preferivelmente de pH 4,5 a 4,0, mais preferivelmente de pH 4,3 a 4,0, particularmente preferivelmente de pH 4,0 (EP 1078989 A).

O L-aminoácido pode ser coletado do meio de cultura por métodos de coleção conhecidos. Por exemplo, o L-aminoácido pode ser coletado por remoção das células bacterianas do meio de cultura, seguido por concentração e cristalização, cromatografia de troca iônica, ou outros. Quando cultivando sob condições para precipitar o ácido L-glutâmico, o ácido L-glutâmico pode ser coletado por centrifugação, filtração, ou outros. Neste caso, o ácido L-glutâmico que é dissolvido no meio pode ser também cristalizado e então coletado.

EXEMPLOS

Abaixo, a presente invenção será especificamente descrita por referência aos seguintes exemplos não limitativos.

Exemplo 1: Construção da cepa amplificada por gene pta de ATCC13869

Uma cepa em que o gene sucA é interrompido, e um mutante yggB é introduzido, foi usada como uma cepa parental para amplificar um gene pta. Esta cepa pode ser construída pelos seguintes métodos.

(1-1) Construção de uma cepa em que o gene sucA foi interrompido

Uma cepa em que o gene sucA foi interrompido (ATCC13869ΔsucA) foi construída como a seguir.

A interrupção do gene sucA codificando a subunidade Elo de α-cetoglutarato desidrogenase foi realizada usando pBS3, que transporta o gene sacB que codifica levansucrase, de acordo com o método descrito em WO 2005/113745 e 2005/113744.

Um fragmento de gene que é derivado da cepa *C. glutamicum* ATCC13869 e em que o ORF do gene sucA foi deletado, foi obtido pelo método PCR de sobreposição, usando DNAs sintético projetados com base na seqüência de nucleotídeos conhecida do gene sucA (SEQ ID NO: 30) de *C. glutamicum* ATCC13032 (banco de dados Genbank, número de acesso NC_003450) como iniciadores. Especificamente, PCR foi realizado por um método convencional usando um DNA cromossômico de cepa *C. glutamicum* ATCC13869 como um gabarito e usando DNAs sintéticos de SEQ ID NOS: 1 e 2 como iniciadores, para assim obter um produto amplificado correspondente para a região N-terminal do gene sucA. Para obter um produto amplificado correspondente para a região C-terminal do gene sucA, PCR foi realizado usando o DNA cromossômico da cepa *C. glutamicum* ATCC13869 como um gabarito, e usando DNAs sintéticos de SEQ ID NOS: 3 e 4 como iniciadores. SEQ ID NOS: 2 e 3 são complementares um para o outro, e são projetados para amplificar o gene sucA que tem ORF completo deletado.

Subseqüentemente, para obter um fragmento de gene sucA em que a seqüência interna é deletada, os produtos amplificados descritos acima, cada correspondendo para a região N-terminal e a região C-terminal do gene sucA, foram misturados em quantidades molares aproximadamente iguais, e PCR foi realizado usando a mistura como gabaritos e usando DNAs sintéticos de SEQ ID NOS: 5 e 6 como iniciadores, para assim obter um produto amplificado em gene sucA em que uma deleção de mutação foi introduzida. O

produto PCR foi purificado por um método convencional, e então digerido com BamHI, seguido por inserção no sítio BamHI do pBS3 descrito acima. O DNA foi usado para transformar as células competentes de *Escherichia coli* JM109 (Takara Bio Inc.), e as células transformadas foram cultivadas durante a noite em uma placa LB contendo 100 μM de IPTG, 40 μg/ml de X-Gal, e 25 μg/ml de canamicina (Km). Colônias únicas de transformantes foram isoladas por seleção das colônias brancas que apareceram. Os plasmídeos foram extraídos destes transformantes, e os contendo o produto PCR desejado foram chamados de pBS3ΔsucA.

O pBS3ΔsucA obtido em (A) acima não contém uma região que permite a replicação autônoma em bactérias corineformes. Assim, quando uma bactéria corineforme é transformada com o plasmídeo, somente transformantes contendo o plasmídeo integrado no cromossomo por recombinação homóloga irão aparecer em uma frequência baixa. A cepa *C. glutamicum* ATCC13869 foi transformada com uma concentração elevada do plasmídeo pBS3ΔsucA pelo método de pulso elétrico, e as células foram aplicadas em uma placa CM-Dex (5 g/L de glicose, 10 g/L de polipeptona, 10 g/L de extrato de levedura, 1 g/L de KH_2PO_4, 0,4 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g/L de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g/L de $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, 3 g/L de uréia, 1,2 g/L de hidrolisado de soja, 10 μg/L de biotina, 15 g/L de ágar, o pH foi ajustado a 7,5 com NaOH) contendo 25 μg/ml de canamicina, e cultivado a 31,5 °C durante cerca de 30 horas. Nas células que cresceram neste meio, o gene resistente a canamicina e o gene sacB do plasmídeo foram integrados no cromossomo por recombinação homóloga entre o gene sucA do plasmídeo e o gene sucA no cromossomo da cepa ATCC13869.

Subseqüentemente, os recombinantes de cruzamento único, que foram obtidos, foram cultivados a 31,5 °C durante a noite em meio líquido CM-Dex não contendo canamicina e, após a diluição apropriada, as células foram aplicadas a uma placa Dex-S10 contendo sacarose a 10% (100

g/L de sacarose, 10 g/L de polipeptona, 10 g/L de extrato de levedura, 1 g/L de KH_2PO_4, 0,4 de g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g/L de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g/L de $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 3 g/L de uréia, 1,2 g/L de hidrolisado de soja, 10 μg/L de biotina, 15 g/L de ágar, o pH foi ajustado para 7,5 com KOH) não contendo canamicina, e cultivado a 31,5 °C durante cerca de 30 horas. Como um resultado, as cepas que foram insensíveis a sacarose devido à cura do gene sacB pela segunda recombinação homóloga foram obtidas.

As cepas assim obtidas incluem uma em que o gene sucA foi substituído pelo gene mutante derivado de pBS3ΔsucA, e uma em que o gene sucA reverteu para o gene de tipo selvagem. Se o gene sucA é o gene mutante ou o gene de tipo selvagem pode ser facilmente confirmado ao se submeter diretamente as células bacterianas obtidas por cultura a uma placa Dex-S10 para PCR, e detectar o gene sucA. A análise foi realizada usando os iniciadores para amplificar o gene sucA por PCR (SEQ ID NOS: 5 e 6), e as cepas que foram determinadas para conter um produto PCR menor do que o produto PCR usando DNA cromossômico da cepa ATCC13869, como um gabarito. Neste modo, as cepas em que sucA é interrompido, foram selecionadas e usadas no seguinte experimento.

A capacidade de produzir ácido L-glutâmico das cepas em que sucA é interrompido foi avaliada pelo seguinte método. As cepas foram cultivadas em meio de placa CM-Dex, e cada uma das cepas em que o gene sucA é interrompido, foi semeada em um frasco Sakaguchi contendo 20 ml de um meio contendo 30 g de glicose, 1 g de KH_2PO_4, 0,4 g de $MgSO_4$, 15 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,01 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g de $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, 13,7 ml de hidrolisado de soja, 200 μg de cloreto de tiamina, 300 μg de biotina, e 50 g de $CaCO_3$ em 1 L de água pura (o pH foi ajustado a 8,0 com KOH), seguido por agitação da cultura a 31,5 °C. Após a cultura, a quantidade de ácido L-glutâmico que tinha se acumulado no meio foi determinada, e a cepa que exibiu a produção de ácido L-glutâmico de maior rendimento foi selecionada

e chamada de ATCC13869ΔsucA.

(1-2) Introdução de um gene yggB mutante

Um gene yggB mutante preparado por inserção de IS (seqüência de inserção) no C-término do gene yggB foi introduzido na cepa ATCC13869ΔsucA (Fig. 1). A seqüência de nucleotídeo do gene yggB mutante e a seqüência de aminoácido codificada assim são mostrados na SEQ ID NOS: 7 e 8, respectivamente. A cepa mutante introduzida no gene yggB foi chamada de ATCC13869ΔsucAyggB::IS.

Alternativamente, a cepa em que o IS é inserido na região C-terminal do gene yggB também pode ser construída por amplificação de três fragmentos com PCR como a seguir.

Primeiro, PCR é realizado usando os oligonucleotídeos de SEQ ID NOS: 44 e 45 como iniciadores e o DNA cromossômico a partir da cepa ATCC13869 como um gabarito, para assim obter um fragmento a montante do gene yggB. Outro PCR é realizado usando os oligonucleotídeos de SEQ ID NOS: 46 e 47 como iniciadores e o DNA cromossômico a partir da cepa ATCC13869 como um gabarito, para assim obter o fragmento IS. Os oligonucleotídeos de SEQ ID NOS: 45 e 46 são parcialmente complementares um cada outro. A seguir, PCR é realizado usando quantidades molares aproximadamente iguais destes produtos PCR como gabaritos e os oligonucleotídeos de SEQ ID NOS: 44 e 47 como iniciadores, para assim preparar um fragmento onde o fragmento yggB é inserido a montante do IS.

PCR é realizado usando os oligonucleotídeos de SEQ ID NOS: 48 e 49 como iniciadores e o DNA cromossômico a partir da cepa ATCC13869 como um gabarito, para assim obter um fragmento a jusante do gene yggB. Os oligonucleotídeos de SEQ ID NOS: 47 e 48 são complementares um para cada outro. O fragmento yggB a jusante e o fragmento descrito acima compreendendo o fragmento yggB inserido a montante do IS são misturados em quantidades molares aproximadamente

iguais, e PCR é realizado usando os oligonucleotídeos de SEQ ID NOS: 50 e 51 como iniciadores, para assim obter um fragmento yggB em que o IS é inserido (yggB::IS). O fragmento é tratado com SacI e inserido no sítio SacI de pBS4S (WO 2005/113745 e 2005/113744), para assim construir um plasmídeo que pode ser usado para substituir o gene yggB em um cromossomo com o yggB::IS. A cepa ATCC13869 tem uma pluralidade de seqüências IS similares. Assim, para obter um gene yggB inserido com IS completamente correspondendo à SEQ ID NO: 7, é necessário confirmar a seqüência de nucleotídeo do plasmídeo para determinar se o plasmídeo tem a mesma seqüência. No entanto, diferenças em alguns nucleotídeos em uma região derivada de IS não tem uma grande influência na função do gene yggB inserido com IS. O plasmídeo resultante é usado para substituir o gene yggB no cromossomo por um método convencional, resultando em uma cepa em que o IS é inserido no gene yggB cromossômico.

(1-3) Construção de uma cepa amplificada em pta

Para construir uma cepa em que a expressão de um gene fosfotransacetilase (pta) é melhorada, um gene da fosfotransacetilase (pta) derivado de cepa *C. glutamicum* ATCC13869 foi amplificado por PCR e clonado no vetor bidirecional pVC7. pVC7 (US 20030134397) é construído por inserção de um fragmento obtido por digestão de pAM330 (um plasmídeo críptico da cepa ATCC13869 (No. de acesso no banco de dados do GenBank D00038)) com HindIII e terminação cega no sítio BsaAI de pHSG399 (Takara Bio). PCR foi realizado usando DNAs sintéticos (SEQ ID NOS: 9 e 10) projetados com base na seqüência de nucleotídeos conhecida do gene da fosfotransacetilase de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 (No. de acesso no banco de dados do GenBank NC_003450, SEQ ID NO: 40), para assim obter um fragmento de gene contendo o ORF completo do gene da fosfotransacetilase e sua região de promotor. Este produto PCR foi purificado por um método convencional e digerido com BamH I e Kpn I, e inserido entre

o sítio BamH I e o sítio Kpn I em pVC7. Este plasmídeo foi usado para transformar as células competentes de *Escherichia coli* DH5α (Takara Bio Inc.), e as células transformadas foram cultivadas durante a noite em uma placa LB contendo 100 μM de IPTG, 40 μg/ml de X-Gal, e 25 μg/ml de cloranfenicol (Cm). A seguir, colônias únicas de transformantes foram isoladas por seleção das colônias brancas que apareceram. Os plasmídeos foram extraídos a partir destes transformantes, e o plasmídeo contendo o produto PCR objetivo foi selecionado e chamado de pVC7-pta.

(1-4) Confirmação de atividade melhorada de PTA na cepa ATCC13869ΔsucAyggB::IS

A cepa ATCC13869ΔsucAyggB::IS foi transformada com pVK9. A transformação foi realizada pelo método de pulso elétrico, e as células foram cultivadas a 31,5 °C durante cerca de 30 horas em uma placa CM-Dex contendo 25 μg/ml de canamicina. Esta cepa contendo o pVK9 foi chamada de ATCC13869ΔsucAyggB::IS(pVK9).

pVK9 (patente US 20050196846) é um vetor bidirecional. Ele é construído por inserção de um fragmento obtido por digestão de pHK4 (JP-A-05-007491) com BamHI e KpnI e terminação cega (um fragmento capaz de replicar automaticamente em bactérias corineformes), no sítio AvaII terminado cego de pHSG299 (TAKARA BIO INC.).

Subseqüentemente, a cepa ATCC13869ΔsucAyggB::IS (pVK9) foi transformada separadamente com pVC7 (um plasmídeo de controle) e pVC7-pta (um plasmídeo para amplificar PTA). A transformação foi realizada pelo método de pulso elétrico, e as células foram cultivadas a 31,5 °C durante cerca de 30 horas em uma placa CM-Dex contendo 25 μg/ml de canamicina e 5 μg/ml de cloranfenicol. As cepas em que os plasmídeos descritos acima foram introduzidos foram chamadas de ATCC13869ΔsucAyggB::IS (pVK9, pVC7) e ATCC13869ΔsucAyggB::IS (pVK9, pVC7-pta), respectivamente.

Para determinar a atividade de PTA destas cepas, uma solução de enzima bruta foi preparada pelo seguinte método. Primeiro, cada cepa foi cultivada em um meio líquido CM-Dex a 31,5 °C. O OD 660 foi determinado usando um colorímetro digital Mini photo 518R Taitec, e a cultura foi continuada até o OD alcançar 0,6 a 0,9, seguido por coleta das células. As seguintes operações foram realizadas a 4 °C. As células foram lavadas com solução Tris/HCl 50 mM (pH 7,0) duas vezes e então colocadas em suspensão em um tampão (50 mM Tris/HCl (pH 7,0), 10 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, e 30% (p/v) glicerol) a 4 g (peso úmido)/ml. As células foram homogeneizadas com um homogeneizador ultrassônico (Bioruptor) e centrifugadas (15.000 g, 60 min). O sobrenadante foi usado como a solução de enzima bruta. Os procedimentos para quantificar o nível de proteína na solução de enzima bruta são como a seguir. Cada solução de enzima bruta e BSA (albumina de soro bovino) com uma concentração conhecida (para criar uma curva de calibre) foi deixada reagir com uma solução de CBB (solução CBB de teste de proteína Nacalai tesque) para revelar uma cor, e então a concentração de proteína foi quantificada por determinar o OD 595 nm usando um aparelho para determinar as atividades enzimáticas (Molecular Devices, max de espectros 190).

Subseqüentemente, a atividade PTA foi determinada com referência para o método conhecido (D. J. Reinscheid, S. Schnicke, D. Rittmann, U. Zahnow, H. Sahm e B. J. Eikmanns (1999) Micobiology. 145: 503 - 513). Os procedimentos específicos são mostrados abaixo. A reação enzimática foi iniciada por adição de uma solução de enzima bruta para a solução de reação de 100 mM de Tris/HCl (pH 7,6), 5 mM de $MgCl_2$, 0,5 mM de cloridrato de L-cisteína, 20 mM de NH_4Cl_2, 1 mM de CoA, e 20 mM de fosfato de acetila. A geração de acetil-CoA foi detectada por determinação do OD 232 nm usando um aparelho para determinar as atividades enzimáticas (Molecular Devices, spectra max 190), para assim determinar a atividade de

PTA. Tabela 1 mostra que ATCC13869ΔsucAyggB::IS(pVK9, pVC7-pta) tem uma atividade de PTA maior como comparado à da cepa de controle.

[Tabela 1]

	ΔABS/s/ mg	Atividade relativa controle definido 1
ATCC13869ΔsucAyggB::IS(pVK9, pVC7)	0,365	1 (controle)
ATCC13869ΔsucAyggB::IS(pVK9, pVC7-pta)	1,550	4,27

Exemplo 2: Produção de ácido L-glutâmico pela cepa ATCC13869ΔsucAyggB::IS melhorada em PTA

O efeito de melhorar a atividade de PTA sobre o rendimento de ácido L-glutâmico durante a fermentação foi avaliado por cultura da cepa ATCC13869ΔsucAyggB::IS(pVK9, pVC7) e cepa ATCC13869ΔsucAyggB::IS(pVK9, pVC7-pta) de *C. glutamicum* pelo mesmo método como mostrado acima (1-1). Os resultados são mostrados na tabela 2. O rendimento de ácido L-glutâmico pela cepa melhorada em PTA foi verificado como sendo maior do que o da cepa de controle.

[Tabela 2]

	Rendimento de fermentação de ácido L-glutâmico (média ± desvio padrão % (n = o número de amostras))
ATCC13869ΔsucAyggB::IS(pVK9, pVC7)	47,0 ± 0,2 (n=4)
ATCC13869ΔsucAyggB::IS(pVK9, pVC7-pta)	50,5 ± 0,9 (n=4)

Exemplo 3: Produção de ácido L-glutâmico pela cepa em que as atividades de PTA e fosfocetolase são melhoradas

A seguir, o efeito combinado da atividade de fosfotransacetilase melhorada e a atividade fosfocetolase melhorada em produção de ácido L-glutâmico foi examinado.

Um plasmídeo de expressão de fosfocetolase foi construído como a seguir.

(A) Construção de pVK9-xfp

Para amplificar o gene da fosfocetolase (a informação de seqüência foi descrita: AY518213:gi:41056820) por PCR e inserir o gene no vetor bidirecional pVK9 usado no exemplo 1, o DNA cromossômico foi

extraído de *Bifidobacterium animalis* usando o kit de purificação Wizard Genomic (Promega Corporation). PCR foi realizado usando um DNA cromossômico de *B. animalis* como um gabarito de DNAs sintéticos de SEQ ID NOS: 11 e 12 como iniciadores, para assim obter um fragmento de gene contendo o ORF completo do gene da fosfocetolase e sua região de promotor. Este produto PCR foi purificado por um método convencional e então digerido com Xba I, seguido por inserção no sítio Xba I de pVK9. As células competentes de *Escherichia coli* DH5α (Takara Bio Inc.) foram transformadas com este DNA, e as células transformas foram cultivadas durante a noite em uma placa LB contendo 100 μM de IPTG, 40 μg/ml de X-Gal, e 25 μg/ml de Km. A seguir, as colônias únicas de transformantes foram isoladas por seleção das colônias brancas que apareceram. Os plasmídeos foram extraídos dos transformantes, e os contendo o produto PCR desejado foram selecionados e chamados de pVK9-xfp.

(B) Construção de pVK9-PS2_xfp

O método PCR de sobreposição (R. M. Horton, H. D. Hunt, S. N. Ho, J. K. Pullen, e L. R. Pease (1989) Gene 77: 61 - 68) foi realizado para obter um fragmento de DNA em que uma região do promotor do gene da fosfocetolase de *B. animalis* foi substituída com o promotor PS2. Especificamente, PCR foi realizado usando pPSTG1 (Y. Kikuchi, M. Date, K. Yokoyama, Y. Umezawa, e H. Matsui (2003) Appl. Environ. Microbiol. 69: 358 - 366) como um gabarito e DNAs sintéticos de SEQ ID NOS: 13 e 14 como iniciadores, para assim obter um produto amplificado do promotor PS2. Outro PCR foi realizado usando pVK9-xfp como um gabarito e DNAs sintéticos de SEQ ID NOS: 15 e 16 como iniciadores, para assim obter um produto amplificado do gene da fosfocetolase de *B. animalis*. Os iniciadores de SEQ ID NOS: 14 e 16 são complementares um a cada outro. A seguir, para obter um fragmento onde o promotor PS2 é inserido a montante do gene da fosfocetolase de *B. animalis*, o promotor PS2 e o produto de gene da

fosfocetolase de *B. animalis* foram misturados em quantidades aproximadamente iguais, e o PCR foi realizado usando a mistura como gabaritos e DNAs sintéticos de SEQ ID NOS: 12 e 17 como iniciadores. Este produto PCR foi purificado por um método convencional e então digerido com Xba I, seguido por inserção no sítio Xba I de pVK9. O DNA foi usado para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH5α (Takara Bio Inc.), e as células transformadas foram cultivadas durante a noite em uma placa LB contendo 100 μM de IPTG, 40 μg/ml de X-Gal, e 25 μg/ml de Km. A seguir, as colônias únicas de transformantes foram isoladas por selecionar as colônias brancas que apareceram. Os plasmídeos foram extraídos destes transformantes, e os contendo o plasmídeo tendo o produto PCR desejado foram selecionados e chamados de pVK9-PS2_xfp.

(C) Produção de ácido L-glutâmico usando uma cepa com atividades melhoradas de PTA e de fosfocetolase

Cepa de *C. glutamicum* ATCC13869ΔsucAyggB::IS foi transformada com pVK9_PS2_xfp de acordo com o método descrito acima, para assim obter uma cepa transformante, que foi chamada de ATCC13869ΔsucAyggB::IS(pVK9_PS2_xfp). A seguir, a cepa ATCC13869ΔsucAyggB::IS(pVK9_PS2_xfp) foi transformada separadamente com pVC7 (um plasmídeo para controle) e pVC7-pta (um plasmídeo para amplificar PTA) e as cepas transformadas foram chamadas de ATCC13869ΔsucAyggB::IS(pVK9_PS2_xfp, pVC7) e ATCC13869ΔsucAyggB::IS(pVK9_PS2_xfp, pVC7-pta), respectivamente.

As cepas de *C. glutamicum* ATCC13869ΔsucAyggB::IS (pVK9, pVC7), ATCC13869ΔsucAyggB::IS(pVK9, pVC7-pta), ATCC13869ΔsucAyggB::IS(pVK9_PS2_xfp, pVC7), e de ATCC13869ΔsucAyggB::IS(pVK9_PS2_xfp, pVC7-pta) foram cultivadas de acordo com o método de (1-1) de exemplo 1. Os resultados são mostrados na tabela 3. O rendimento de ácido L-glutâmico da cepa tendo tanto uma

atividade melhorada de PTA como de fosfocetolase foi verificado como sendo maior como comparado para as cepas em que uma dentre PTA ou fosfocetolase foi melhorada.

[Tabela 3]

	Rendimento de fermentação de ácido L-glutâmico (%) (média ± desvio padrão (n = o número de amostras))
ATCC13869ΔsucAyggB::IS(pVK9, pVC7)	47,0 ± 0,2 (n=4)
ATCC13869ΔsucAyggB::IS(pVK9, pVC7-pta)	50,5 ± 0,9 (n=4)
ATCC13869ΔsucAyggB::IS(pVK9_PS2_xfp, pVC7)	54,5 ± 0,2 (n=3)
ATCC13869ΔsucAyggB::IS(pVK9_PS2_xfp, pVC7-pta)	56,6 ± 0,7 (n=6)

Exemplo 4: Construção de uma cepa em que a atividade de PTA é melhorada por interrupção de um gene ramB que codifica um fator de transcrição, e avaliação de seu efeito

Sabe-se que a expressão do gene PTA é negativamente regulada pelo fator de transcrição RamB, e a atividade PTA é aumentada em uma cepa deficiente em gene ramB (Journal of Bacteriology May 2004 2798 - 2809). Assim, uma cepa deficiente em ramB é construída, e seus efeitos sobre o rendimento de ácido L-glutâmico durante fermentação são examinados.

(4-1) Clonagem de um fragmento para interrupção do gene ramB

Um gene ramB é interrompido usando pBS5T, que é um plasmídeo sensível a temperatura transportando o gene sacB (WO 2005/113745 e WO 2005/113744). Um fragmento de gene que é derivado do gene ramB da cepa ATCC13869 e tem uma deleção no ORF do gene ramB é obtido pelo método PCR de sobreposição usando DNAs sintéticos projetados com base na seqüência de nucleotídeos conhecida do gene de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 (número de acesso no Genbank de banco de dados NC_003450, a seqüência de nucleotídeo de gene ramB e a seqüência de aminoácido codificada assim são mostradas em SEQ ID NOS: 36 e 37, respectivamente) como iniciadores. Especificamente, o PCR é realizado por uso do DNA cromossômico de cepa *C. glutamicum* ATCC13869 como um gabarito e DNAs sintéticos de SEQ ID NOS: 19 e 20

como iniciadores, para assim obter um produto amplificado correspondente para a região N-terminal do ramB. Outro PCR é realizado para amplificar um fragmento correspondente para a região C-terminal do gene ramB, usando o DNA cromossômico de cepa ATCC13869 como um gabarito e DNAs sintéticos de SEQ ID NOS: 18 e 21 como iniciadores. Os DNAs de SEQ ID NOS: 18 e 19 são complementares a cada outro, e eles são projetados de modo que um gene ramB mutante que está faltando no ORF completo é amplificado. Subseqüentemente, para obter o fragmento de gene ramB mutante faltando uma seqüência interna, os produtos amplificados descritos acima correspondendo à região N-terminal e à região C-terminal do gene ramB são misturados em quantidades molares aproximadamente iguais, e o PCR é realizado usando a mistura como gabaritos e usando DNAs sintéticos de SEQ ID NOS: 22 e 23 como iniciadores. Este produto PCR é purificado por um método convencional, e então digerido com Xba I, seguido por inserção no sítio Xba I do pBS5T descrito acima. As células competentes de *Escherichia coli* DH5α (Takara Bio Inc.) são transformadas com este DNA, e as células são cultivadas durante a noite em meio LB contendo 100 μM de IPTG, 40 μg/ml de X-Gal, e 25 μg/ml de Km. A seguir, as colônias únicas de transformantes são isoladas por seleção das colônias brancas que aparecem. Os plasmídeos são extraídos destes transformantes, e os contendo o PCR desejado são selecionados e chamados de pBS5T-ramB.

(4-2) Construção de uma cepa em que o gene ramB é interrompido

Primeiro, cepa ATCC13869ΔsucAyggB::IS é transformada pelo método de pulso elétrico com uma concentração elevada de pBS5T-ramB, e as células transformadas são cultivadas a 25 °C durante cerca de 60 horas em uma placa CM-Dex contendo 25 μg/ml de canamicina. Este transformante é cultivado com agitação a 34 °C durante a noite em um meio líquido CM-Dex e após diluição apropriada, as células são cultivadas a 34 °C durante cerca de 30 horas em meio CM-Dex contendo 25 μg/ml de

canamicina.

Na cepa que cresceu neste meio, o gene resistente a canamicina e o gene sacB derivado do plasmídeo são integrados no cromossomo por recombinação homóloga entre o gene ramB mutante do plasmídeo e o gene ramB no cromossomo da cepa ATCC13869ΔsucAyggB::IS.

A seguir, estes recombinantes de cruzamento único são cultivados a 31,5 °C durante a noite em meio líquido CM-Dex não contendo canamicina e, após diluição apropriada, as células são cultivadas a 34 °C durante cerca de 30 horas em 10% de meio Dex-S10 contendo sacarose (100 g/L de sacarose, 10 g/L de polipeptona, 10 g/L de extrato de levedura, 1 g/L de KH_2PO_4, 0,4 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g/L de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g/L de $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 3 g/L de uréia, 1,2 g/L de hidrolisado de soja, 10 μg/L de biotina, 2 g/l de acetato de sódio, pH 7,5 (KOH)) sem canamicina. Como um resultado, são obtidas as cepas que são insensíveis a sacarose devido à cura do gene sacB pela segunda recombinação homóloga.

As cepas assim obtidas incluem uma em que o gene ramB é substituído pelo gene mutante derivado de pBS5T-ramB, e uma em que o gene ramB reverte para o gene de tipo selvagem. Se o gene ramB for o gene mutante ou o gene de tipo selvagem pode ser confirmado submetendo-se diretamente as células bacterianas obtidas por cultura em um meio ágar Dex-S10 a PCR. Uma cepa tendo somente o gene ramB mutante é selecionada e chamada de ATCC13869ΔsucAyggB::ISΔramB.

(4-3) A produção de ácido L-glutâmico usando a cepa em que o gene ramB é interrompido

ATCC13869ΔsucAyggB::ISΔramB é transformado com pVK9 (um plasmídeo para controle) e pVK9_PS2_xfp (um plasmídeo para amplificar o gene da fosfocetolase (PKT) separadamente. A transformação é realizada pelo método de pulso elétrico, e as células são cultivadas a 31,5 °C

durante cerca de 30 horas em uma placa CM-Dex contendo 25 μg/ml de canamicina. As cepas introduzidas no plasmídeo são chamadas de ATCC13869ΔsucAyggB::ISΔramB(pVK9) e

ATCC13869ΔsucAyggB::ISΔramB(pVK9_PS2_xfp),

respectivamente. Estas cepas são avaliadas por cultura de acordo com o método de (1-1) de exemplo 1 junto com a cepa ATCC13869ΔsucAyggB::IS (pVK9) e a cepa ATCC13869ΔsucAyggB::IS(pVK9_PS2_xfp) construídas no exemplo 1. Este procedimento confirma a melhora do rendimento do ácido L-glutâmico por interrupção do gene ramB e por uma combinação de interrupção do gene ramB e melhora do PKT.

Exemplo 5: Construção de uma cepa melhorada em atividade de PTA por modificação de um promotor do gene pta e avaliação do efeito

A atividade PTA pode ser melhorada por modificação de um promotor do gene pta. Sabe-se que um promotor de gene pta tem duas regiões que estão envolvidas, como se pensa, na regulação negativa mediada por RamB que afeta a atividade de PTA (J Bacteriol. 2004 May; 186(9): 2798 - 2809.). Assim, as cepas que são modificadas em somente um dos sítios de ligação de RamB no promotor pta ou ambos dentre os sítios de ligação RamB no promotor pta, são construídas para examinar o efeito no rendimento de fermentação de ácido L-glutâmico.

(5-1) Construção de plasmídeos para mutação do promotor pta, pBS5T-m1PTA, pBS5T-m2PTA, PBS5T-m1m2PTA

Um fragmento de gene contendo a região de ORF e a região do promotor do gene pta derivado de ATCC13869 é obtido por PCR usando DNAs sintético projetado com base na seqüência de nucleotídeos conhecida do gene de *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 (número de acesso no Genbank de banco de dados NC_003450). Especificamente, para amplificar a região do promotor do gene de pta, PCR é realizado usando o DNA cromossômico de cepa de *C. glutamicum* ATCC13869 como um gabarito e

DNAs sintéticos de SEQ ID NOS: 24 e 25 como iniciadores. Este produto de PCR é purificado por um método convencional e digerido com Xba I, seguido por inserção na região Xba I de pUC19 (Takara Bio Inc.). As células competentes de *Escherichia coli* DH5α (Takara Bio Inc.) são transformadas com o DNA, e cultivadas durante a noite em meio LB contendo 100 μM de IPTG, 40 μg/ml de X-Gal, e 50 μg/ml de Amp. A seguir, as colônias únicas de transformantes são isoladas por seleção das colônias brancas que aparecem. Os plasmídeos são extraídos destes transformantes, e os contendo o produto PCR desejado são selecionados e chamados de pUC19-PTA.

A seguir, uma mutação é introduzida na região do promotor pta usando kits de mutagenese sítio-dirigida (STARATAGENE). O PCR é realizado usando pUC19-PTA como um gabarito e DNAs sintéticos de SEQ ID NOS: 26 e 27 como iniciadores de acordo com o manual fornecido com os kits, que resulta em um plasmídeo tendo uma mutação em um dos primeiros sítios de ligação RamB. Este plasmídeo é chamado de pUC19-m1PTA.

A seguir, PCR é realizado usando pUC19-m1PTA como um gabarito e DNAs sintéticos de SEQ ID NOS: 24 e 25 como iniciadores, para assim obter um produto amplificado contendo a região de promotor do gene pta tendo a mutação. Este produto PCR é purificado por um método convencional e inserido na região de SmaI descrita acima de pBS5T. As células competentes de *Escherichia coli* DH5α (Takara Bio Inc.) são transformadas com este DNA, e as células são cultivadas durante a noite em meio LB contendo 100 μM de IPTG, 40 μg/ml de X-Gal, e 25 μg/ml de Km. A seguir, as colônias únicas de transformantes são isoladas por seleção das colônias brancas que aparecem. Os plasmídeos são extraídos destes transformantes, e a análise de seqüência confirma que o plasmídeo tem a mutação desejada sem erros de seqüência em outros nucleotídeos. Assim, o plasmídeo é chamado de pBS5T-m1PTA.

No mesmo modo, um plasmídeo tendo uma mutação no

segundo sítio de ligação RamB é construído realizando-se PCR usando DNAs sintéticos de SEQ ID NOS: 28 e 29, e então inserindo a seqüência desejada em pBS5T. Este plasmídeo é chamado de pBS5T-m2PTA. Além disso, um plasmídeo tendo mutações em ambos os sítios de ligação de RamB é construído pelos mesmos procedimentos como descritos acima e chamado de pBS5T-m1m2PTA.

(5-2) Construção de cepas abrigando o gene pta modificado no promotor

Cepas tendo promotores de PTA modificados são obtidas de cepa ATCC13869ΔsucAyggB::IS de acordo com o método de exemplo 4. A mutação é confirmada por análise da seqüência da região do promotor. As cepas com sítios de ligação de RamB modificados no promotor pta são chamadas de ATCC13869ΔsucAyggB::ISm1, ATCC13869ΔsucAyggB::ISm2, e ATCC13869ΔsucAyggB::ISm1m2.

(5-3) Produção de ácido L-glutâmico por uso das cepas abrigando o gene pta modificado no promotor

A cepa ATCC13869ΔsucAyggB::ISm1, a cepa ATCC13869ΔsucAyggB::ISm2, e a cepa ATCC13869ΔsucAyggB::ISm1m2 são cada transformadas com pVK9 (um plasmídeo de controle) e pVK9_PS2_xfp (um plasmídeo para amplificar PKT). A transformação é realizada pelo método de pulso elétrico, e as células transformadas são cultivadas a 31,5 °C durante cerca de 30 horas em uma placa CM-Dex contendo 25 μg/ml de canamicina. Estes cepas são chamadas de ATCC13869ΔsucAyggB::ISm1(pVK9),
ATCC13869ΔsucAyggB::ISm1(pVK9_PS2_xfp),
ATCC13869ΔsucAyggB::ISm2(pVK9),
ATCC13869ΔsucAyggB::ISm2(pVK9_PS2_xfp),
ATCC13869ΔsucAyggB::ISm1m2(pVK9), e
ATCC13869ΔsucAm1m2(pVK9_PS2_xfp), e são avaliadas por cultura de acordo com o método de exemplo 1 junto com

ATCC13869ΔsucAyggB::IS(pVK9) e ATCC13869ΔsucA(pVK9_PS2_xfp), construídos no exemplo 1. A melhora do rendimento de ácido L-glutâmico pela modificação do promotor pta e a combinação da modificação do promotor de PTA e a melhora de PKT são confirmadas.

Exemplo 6

Construção de uma cepa em que a melhora de PTA é combinada com a melhora de enzimas de via anaplerótica

A fim de avaliar o efeito de da melhora combinado de PTA e fosfoenolpiruvato carboxilase (PPC) ou piruvato carboxilase (PC), as cepas com atividades melhoradas de PTA e PPC ou atividades melhoradas de PTA e PC são construídas.

(6-1) Construção do plasmídeo expressando ppc pVC-PPC

O plasmídeo expressando ppc é construído como a seguir. O gene ppc é amplificado realizando o PCR usando oligonucleotídeos sintéticos de SEQ ID NOS: 58 e 59 como iniciadores e o DNA cromossômico de cepa de *C. glutamicum* ATCC 14067 como um gabarito. O DNA amplificado é terminado cego e inserido no sítio SmaI de pHSG399 (TAKARA BIO INC.), para assim obter um plasmídeo pPCF. Então, a fim de remover a região a montante da região de codificação do gene ppc, pPCF é digerido com DraI e SalI, e o fragmento obtido é inserido no sítio SmaI de pHSG398 (TAKARA BIO INC.) para obter um plasmídeo tendo o gene ppc inserido na direção reversa com relação ao gene lacZ, e é chamado de pPCFds. Então, um fragmento de DNA contendo um promotor de aspartoquinase e uma região capaz de replicar autonomamente em bactéria corineforme é preparada por digestão de p399AKYB (JP6-62866) com PstI e ApaI e então terminado cego, e o fragmento obtido é inserido no pPCFds que foi digerido com SalI e terminado cego, para ligar o promotor aspartoquinase a montante do gene ppc. Um plasmídeo em que o promotor de aspartoquinase e o gene ppc são ligados na mesma direção foi selecionado e chamado de pAKPFds. A região

em pAKPFds envolvida em replicação autônoma em bactéria corineforme é derivada de pHM1519, porque a região de replicação autônoma de pVK9_PS2_xfp, e assim, pAKPFds não podem co-existir com pVK9_PS2_xfp em bactéria corineforme. Assim, PCR é realizado por uso oligonucleotídeos sintéticos de SEQ ID NOS: 60 e 61 como iniciadores e pAKPFds como um gabarito, e o fragmento amplificado é digerido com KpnI e inserido no sítio KpnI de pVC7 (JP2000-201692), que contém uma região de replicação autônoma de pAM330. O plasmídeo obtido foi chamado de pVC-PPC.

(6-2) Construção de uma cepa em que o gene pta e o gene ppc são amplificados, e uma cepa em que o gene pta e o gene pc são amplificados

pVC7 (controle), pVC-PPC, ou pBPYC6 (plasmídeo expressando o gene pc: JP2000-201692) é usado para transformar ATCC13869ΔsucAyggB::IS(pVK9) (ver exemplo 2), ATCC13869ΔsucA(pVK9_PS2_xfp) (ver exemplo 3), e ATCC13869ΔsucAyggB::IS m1(pVK9), ATCC13869ΔsucAyggB::IS m1(pVK9_PS2_xfp), ATCC13869ΔsucAyggB::IS m2(pVK9), ATCC13869ΔsucAyggB::IS m2(pVK9_PS2_xfp), ATCC13869ΔsucAyggB::IS m1m2(pVK9), e ATCC13869ΔsucAyggB::IS m1m2(pVK9_PS2_xfp) (ver exemplo 5). Estes transformantes são cultivados e a produção de ácido L-glutâmico é avaliada de acordo com o método de (1-1) de exemplo 1. Assim, a melhora da produção de ácido L-glutâmico é confirmada por combinação da modificação do promotor pta com a melhora de PC ou PPC, ou por combinação da modificação do promotor pta com a melhora de PKT e PC ou PPC.

APLICABILIDADE INDUSTRIAL

O método de produção da presente invenção permite a produção eficiente de L-aminoácidos como ácido L-glutâmico, L-glutamina, L-prolina, L-arginina, L-leucina, e L-cisteína.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir um L-aminoácido, caracterizado pelo fato de compreender cultivar uma bactéria produzindo L-aminoácido que foi modificada para ter uma a atividade melhorada de fosfotransacetilase em um meio, e coletar o L-aminoácido a partir do meio ou da bactéria.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a atividade de fosfotransacetilase é melhorada por aumento do número de cópias do gene codificando fosfotransacetilase, ou por modificação de uma seqüência reguladora de expressão do gene codificando fosfotransacetilase.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o gene codificando fosfotransacetilase é um DNA selecionado dentre o grupo consistindo de:

(a) um DNA compreendendo nucleotídeos 1214 a 2641 de SEQ ID NO: 34 ou a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 40; e

(b) um DNA que hibridiza com uma seqüência de nucleotídeo que é complementar para a seqüência de nucleotídeo de nucleotídeos 1214 a 2641 de SEQ ID NO: 34, ou a seqüência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 40, em que referido DNA hibridiza sob condições estringentes e codifica uma proteína que tem atividade de fosfotransacetilase.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a atividade de fosfotransacetilase é melhorada por interrupção de gene ramB.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a bactéria é ainda modificada de modo que uma atividade é melhorada de uma proteína selecionada dentre o grupo consistindo de D-xilose 5-fosfato-fosfocetolase, frutose 6-fosfato fosfocetolase, e combinações das mesmas.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a

5, caracterizado pelo fato de que a bactéria é ainda modificada para melhorar a atividade de piruvato carboxilase.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a bactéria é ainda modificada para ter uma atividade melhorada de fosfoenolpiruvato carboxilase.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que a bactéria é selecionada dentre o grupo consistindo de uma bactéria corineforme, bactéria *Pantoea*, bactéria *Enterobacter*, e bactéria *Escherichia*.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que o L-aminoácido é selecionado dentre o grupo consistindo de ácido L-glutâmico, L-glutamina, L-prolina, L-arginina, L-leucina, e L-cisteína.

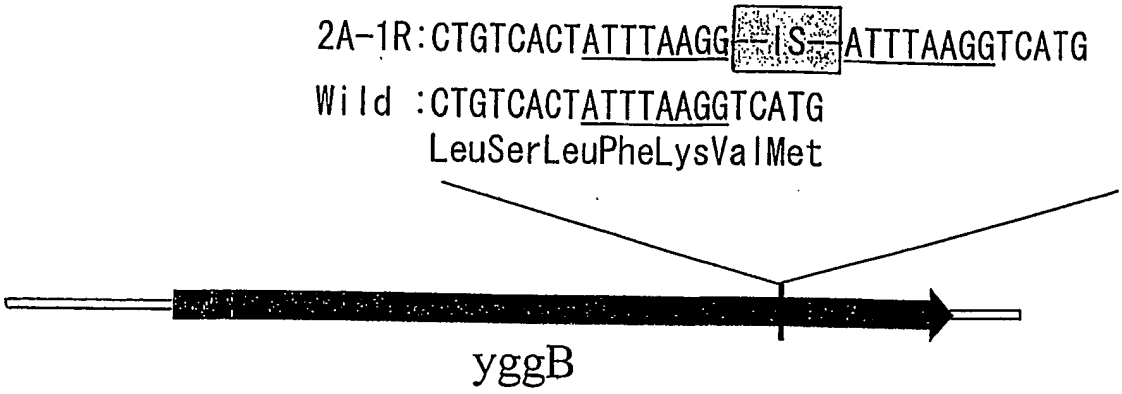

2A-1R:CTGTCACTATTTAAGG IS ATTTAAGGTCATG
Wild :CTGTCACTATTTAAGGTCATG
LeuSerLeuPheLysValMet
yggB

FIG.1

PI0704229

RESUMO

"MÉTODO PARA PRODUZIR UM L-AMINOÁCIDO"

L-aminoácidos como ácido L-glutâmico, L-glutamina, L-prolina, L-arginina, L-leucina, e L-cisteína são produzidos por cultivo em um meio de uma bactéria tendo uma capacidade de produzir L-aminoácido e em que a bactéria foi modificada de modo que a atividade de fosfotransacetilase é aumentada.