



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

(21) **PI 1103669-9 A2**

(22) Data de Depósito: 18/07/2011
(43) Data da Publicação: 04/12/2012
(RPI 2187)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 1/21
C12N 15/31
C12R 1/19

(54) **Título:** BACTÉRIA PRODUTORA DE L-AMINOÁCIDO, E, MÉTODO PARA PRODUZIR UM L-AMINOÁCIDO

(30) **Prioridade Unionista:** 21/07/2010 RU 201030307

(73) **Titular(es):** Ajinomoto Co., INC

(72) **Inventor(es):** Mikhail Markovich Gusyatiner, Mikhail Yurievich kiryukhin

(57) **Resumo:** BACTÉRIA PRODUTORA DE L-AMINOÁCIDO, E, MÉTODO PARA PRODUZIR UM L-AMINOÁCIDO. A presente invenção proporciona um método para produzir L-aminoácido usando uma bactéria da família Enterobacteriaceae, particularmente uma bactéria pertencente ao gênero Escherichia ou Pantoea, que foi modificada para acentuar a expressão do gene bssR que codifica regulador de biopelícula por meio de secreção de sinal.

“BACTÉRIA PRODUTORA DE L-AMINOÁCIDO, E, MÉTODO PARA PRODUZIR UM L-AMINOÁCIDO”

Campo técnico

A presente invenção refere-se à indústria microbiológica, e, particularmente, a um método para produzir um L-aminoácido usando uma bactéria da família *Enterobacteriaceae* que foi modificada para acentuar a expressão do gene *bssR*. Este gene codifica um regulador de biopelícula por meio de secreção de sinal.

Arte anterior

Convencionalmente, L-aminoácidos são produzidos industrialmente por meio de métodos de fermentação usando cepas de microorganismos obtidas de fontes naturais, ou mutantes dos mesmos. Tipicamente, os microorganismos são modificados para incrementar os rendimentos de produção de L-aminoácidos.

Foram reportadas muitas técnicas para incrementar a produção de rendimentos de L-aminoácidos, incluindo a transformação de microorganismos com DNA recombinante (Patam 4.278.765). Outras técnicas para aumentar os rendimentos de produção incluem incrementar as atividades de enzimas envolvidas na biossíntese de aminoácidos e/ou dessensibilização das enzimas-alvo à inibição de feedback causada pelos L-aminoácidos resultantes (Patentes dos Estados Unidos nums. 4.346.170, 5.661.012 e 6.040.160).

Os genes *yliH* e *yceP* são induzidos na formação de biopelículas de *Escherichia coli* (Ren, D., *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol. (2004) 64: 515-524). Mostrou-se que a deleção de *yceP* (*b1060*) e *yliH* (*b0836*) aumenta a formação de biopelícula em câmaras de fluxo contínuo com meio mínimo de glicose via incremento da massa de biopelícula, cobertura superficial, e espessura média. Para determinar a base genética deste aumento na formação de biopelícula, examinou-se perfis de expressão

de genes diferenciais em biopelículas quanto a ambos os mutantes, relativamente à cepa de tipo selvagem, em meio rico de glicose, e verificou-se que de 372 a 882 genes foram induzidos consistentemente, e que de 76 a 337 foram reprimidos consistentemente. O aumento da formação de biopelícula foi relacionado com a expressão diferencial de genes relacionados com a resposta ao estresse (de 8 a 64 genes) para ambos os mutantes. Mais importante, de 42 a 130 genes foram relacionados com a sinalização celular de autoindutor-2, e também foram expressos diferencialmente. Estes genes também foram relacionados com a sinalização do indol, porque de 17 a 26 genes relacionados com indol foram expressos diferencialmente. A formação incrementada de biopelícula nos mutantes *yliH* e *yceP* em LB suplementado com glicose a 0,2 % (LB glu) ocorre por meio de uma redução das concentrações de indol extracelulares e intracelulares em ambos os mutantes (de 50 a 140 vezes), e a adição de indol à cultura restaurou o fenótipo de formação de biopelícula de tipo selvagem; consequentemente, o indol reprime biopelículas. Ambos os mutantes regulam a formação de biopelícula por meio de sensor de quorum [*quorum sensing*], porque a deleção de *yliH* ou *yceP* aumentou as concentrações extracelulares de autoindutor-2 em 50 vezes quando desenvolvidos em meio complexo (o mais notavelmente na fase estacionária). Ambas as proteínas estão envolvidas na regulação de motilidade, por que as proteínas YliH (127 aminoácidos) e YceP (84 aminoácidos) reprimem a motilidade de duas a sete vezes em LB. Foram propostos novos nomes para estes dois *loci*: *bssR* para *yliH* e *bssS* para *yceP*, com base na expressão "regulador de biopelícula por meio de secreção de sinal". (Domka J., et.al., Appl. Environ. Microbiol.;72(4):2449-59(2006)).

No entanto, correntemente, não tem havido relatos de incremento da expressão do gene *bssR* com o objetivo de produzir L-aminoácidos.

REVELAÇÃO DA INVENÇÃO

Aspectos da presente invenção incluem o incremento da produtividade de cepas que são capazes a produzir L-aminoácidos e proporcionar um método para produzir um L-aminoácido usando-se estes cepas.

5 Os aspectos acima foram alcançados ao se verificar que o incremento da expressão do gene *bssR* pode incrementar a produção de L-aminoácidos, como L-treonina, L-lisina, L-cisteína, L-metionina, L-leucina, L-isoleucina, L-valina, L-histidina, glicina, L-serina, L-alanina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-glutamina, L-ácido glutâmico, L-prolina, L-arginina, L-
10 citrulina, L-ornitina, L-fenilalanina, L-tirosina, e L-triptofano.

A presente invenção proporciona uma bactéria da família *Enterobacteriaceae* apresentando uma capacidade incrementada de produzir aminoácidos, como L-treonina, L-lisina, L-cisteína, L-metionina, L-leucina, L-isoleucina, L-valina, L-histidina, glicina, L-serina, L-alanina, L-asparagina,
15 L-ácido aspártico, L-glutamina, L-ácido glutâmico, L-prolina, L-arginina, , L-citrulina, L-ornitina, L-fenilalanina, L-tirosina, e L-triptofano.

É um aspecto da presente invenção proporcionar uma bactéria produtora de L-aminoácido da família *Enterobacteriaceae*, sendo que referida bactéria foi modificada para acentuar a expressão do gene *bssR*.

20 Constitui um aspecto adicional da presente invenção proporcionar a bactéria como descrita acima, sendo que referida expressão é incrementada mediante modificação de uma sequência de controle de expressão do gene *bssR*.

Constitui um aspecto adicional da presente invenção
25 proporcionar a bactéria como descrita acima, sendo que referida bactéria pertence ao gênero *Escherichia*.

Constitui um aspecto adicional da presente invenção proporcionar a bactéria como descrita acima, sendo que referida bactéria é *Escherichia coli*.

Constitui um aspecto adicional da presente invenção proporcionar a bactéria como descrita acima, sendo que referida bactéria pertence ao gênero *Pantoea*.

5 Constitui um aspecto adicional da presente invenção proporcionar a bactéria como descrita acima, sendo que referido L-aminoácido é selecionado do grupo que consiste de um L-aminoácido aromático e um L-aminoácido não-aromático.

10 Constitui um aspecto adicional da presente invenção proporcionar a bactéria como descrita acima, sendo que referido L-aminoácido aromático é selecionado do grupo que consiste de L-fenilalanina, L-tirosina, e L-triptofano.

15 Constitui um aspecto adicional da presente invenção proporcionar a bactéria como descrita acima, sendo que referido L-aminoácido não-aromático é selecionado do grupo que consiste de L-treonina, L-lisina, L-cisteína, L-metionina, L-leucina, L-isoleucina, L-valina, L-histidina, glicina, L-serina, L-alanina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-glutamina, L-ácido glutâmico, L-prolina, L-arginina, L-citrulina, e L-ornitina.

20 Constitui um aspecto adicional da presente invenção proporcionar a bactéria como descrita acima, sendo que referido L-aminoácido é L-arginina.

Constitui um aspecto adicional da presente invenção proporcionar um método para produzir um L-aminoácido compreendendo cultivar a bactéria como descrita acima em um meio de cultura, e recolher referido L-aminoácido do meio.

25 Constitui um aspecto adicional da presente invenção proporcionar o método como descrito acima, sendo que referido L-aminoácido é selecionado do grupo que consiste de um L-aminoácido aromático e um L-aminoácido não-aromático.

Constitui um aspecto adicional da presente invenção

proporcionar o método como descrito acima, sendo que referido L-aminoácido aromático é selecionado do grupo que consiste de L-fenilalanina, L-tirosina, e L-triptofano.

Constitui um aspecto adicional da presente invenção proporcionar o método como descrito acima, sendo que referido L-aminoácido não-aromático é selecionado do grupo que consiste de L-treonina, L-lisina, L-cisteína, L-metionina, L-leucina, L-isoleucina, L-valina, L-histidina, glicina, L-serina, L-alanina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-glutamina, L-ácido glutâmico, L-prolina, L-arginina, L-citrulina, e L-ornitina.

Constitui um aspecto adicional da presente invenção proporcionar o método como descrito acima, sendo que referido L-aminoácido é L-arginina.

DESCRIÇÃO DE CONCRETIZAÇÕES

1. Bactéria

A bactéria de acordo com o objeto presentemente revelado é uma bactéria produtora de L-aminoácido da família *Enterobacteriaceae*, sendo que a bactéria foi modificada de forma a acentuar a expressão do gene *bssR*.

A expressão “bactéria produtora de L-aminoácido” pode significar uma bactéria que apresenta uma capacidade de produzir e excretar um L-aminoácido em um meio, quando a bactéria é cultivada no meio.

O termo “bactéria produtora de L-aminoácido” também pode significar uma bactéria que é capaz de produzir e causar o acúmulo de um L-aminoácido em um meio de cultura numa quantidade maior do que uma cepa de tipo selvagem ou parental de uma bactéria da família *Enterobacteriaceae*, por exemplo, *E. coli*, como *E. coli* K-12, e pode significar que o microorganismo é capaz de causar acúmulo, em um meio, de uma quantidade não inferior a 0,5 g/l, em outro exemplo não inferior a 1,0 g/l, do L-aminoácido alvo. A bactéria pode produzir um tipo de L-aminoácido ou

mistura de dois ou mais tipos de L-aminoácidos.

O termo “L-aminoácido” inclui, por exemplo, L-alanina, L-arginina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-cisteína, L-ácido glutâmico, L-glutamina, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L-tirosina, e L-valina.

O termo “L-aminoácido aromático” inclui, por exemplo, L-fenilalanina, L-tirosina, e L-triptofano. O termo “L-aminoácido não-aromático” inclui, por exemplo, L-treonina, L-lisina, L-cisteína, L-metionina, L-leucina, L-isoleucina, L-valina, L-histidina, glicina, L-serina, L-alanina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-glutamina, L-ácido glutâmico, L-prolina, e L-arginina. L-treonina, L-lisina, L-cisteína, L-leucina, L-histidina, L-ácido glutâmico, L-fenilalanina, L-triptofano, L-prolina, e L-arginina são exemplos particulares.

A família *Enterobacteriaceae* inclui bactérias pertencentes aos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Photorhabdus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Morganella*, *Yersinia*, etc. Especificamente, é possível usar aquelas classificadas nas *Enterobacteriaceae* de acordo com a taxonomia usada no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information [Centro Nacional para Informação de Biotecnologia] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=543>)). Uma bactéria pertencente ao gênero *Escherichia* ou *Pantoea* são exemplos particulares.

A expressão “uma bactéria pertencente ao gênero *Escherichia*” pode significar que a bactéria é classificada no gênero *Escherichia* de acordo com a classificação conhecida por uma pessoa versada na arte da microbiologia. Exemplos de uma bactéria pertencente ao gênero *Escherichia* incluem, mas sem limitação, *Escherichia coli* (*E. coli*).

A bactéria pertencente ao gênero *Escherichia* não é particularmente limitada, contudo, por exemplo, é possível usar bactérias descritas por Neidhardt, F.C. *et al.* (*Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1208, Tabela 1).

A expressão “uma bactéria pertencente ao gênero *Pantoea*” pode significar que a bactéria é classificada como o gênero *Pantoea* de acordo com a classificação conhecida por uma pessoa versada na arte da microbiologia. Algumas espécies de *Enterobacter agglomerans* têm sido reclassificadas recentemente em *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea stewartii* ou análogos, com base na análise de sequências de nucleotídeos de 16S rRNA, etc. (Int. J. Syst. Bacteriol., 43, 162-173 (1993)).

A expressão “a bactéria foi modificada para acentuar a expressão do gene” pode significar que a expressão do gene é maior do que aquela de uma cepa não-modificada, por exemplo, uma cepa de tipo selvagem. Exemplos de referida modificação incluem aumentar o número de cópias do gene expresso por célula, aumentar o nível de transcrição do gene, aumentar o nível de tradução do mRNA transcrito do gene, e assim por diante. A quantidade do número de cópias de um gene expresso é medido, por exemplo, por meio de restrição do DNA cromossômico seguido de Southern blotting usando uma sonda baseada na sequência gênica, hibridação *in situ* por fluorescência direta (FISH), e análogos. O nível de transcrição gênica pode ser medido por meio de vários métodos conhecidos incluindo mancha *Northern blotting*, RT-PCR quantitativa, e análogos. O nível de tradução do mRNA, ou a quantidade do produto gênico pode ser medida por meio de vários métodos conhecidos incluindo Western blotting usando-se anticorpos. Análise por mancha Western blotting também reflete o nível de transcrição juntamente com o nível de tradução. Adicionalmente, cepas de tipo selvagem que podem atuar como um controle incluem, por exemplo,

Escherichia coli K-12 ou *Pantoea ananatis* FERM BP-6614.

O gene *bssR* (sinônimos: *yliH*, *b0836*) codifica o regulador da formação de biopelícula BssR. O gene *bssR* (nucleotídeos de 877.471 a 877.854; nº de acesso GenBank NC_000913.2; gi: 49175990) encontra-se
5 localizado entre o gene *rimO*, orientado na direção oposta, e o gene *yliI* no cromossomo de *E. coli* K-12. A sequência de nucleotídeos do gene *bssR* e a sequência de aminoácidos da proteína BssR codificadas pelo gene *bssR* são mostradas na SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2, respectivamente.

Como pode haver algumas diferenças em sequências de DNA
10 entre os gêneros ou cepas da família *Enterobacteriaceae*, o gene *bssR* a ser modificado para acentuar sua expressão não é limitado ao gene mostrado na SEQ ID No:1, mas pode incluir genes homólogos à SEQ ID No:1. Portanto, a variante de proteína codificada pelo gene *bssR* pode apresentar uma homologia não inferior a 80 %, em outro exemplo não inferior a 90 %, em
15 outro exemplo não inferior a 95 %, em outro exemplo não inferior a 98 %, e em outro exemplo não inferior a 99 %, com relação à sequência de aminoácido inteira mostrada na SEQ ID NO. 2, desde que a variante de proteína apresente a atividade da proteína BssR. O termo "homologia" pode significar "identidade".

20 A expressão “variante de proteína” pode significar proteínas que apresentam em suas sequências, quer sejam deleções, inserções, adições, ou substituições de um ou vários aminoácidos. O número de alterações nas proteínas variantes depende da posição na estrutura tridimensional da proteína ou do tipo de radicais de aminoácidos. Ele pode ser de 1 a 30, em outro
25 exemplo de 1 a 15, e em outro exemplo de 1 a 5 na SEQ ID NO: 2. Estas alterações nas variantes podem ocorrer em regiões da proteína que não são críticas para a estrutura tridimensional da proteína. Isto se deve ao fato de que alguns aminoácidos apresentam elevada homologia entre si, de forma que a estrutura tridimensional não é afetada por uma alteração do tipo referido.

A homologia entre duas sequências de aminoácidos pode ser determinada usando-se métodos bem conhecidos, por exemplo, o programa de computador BLAST 2.0, que calcula três parâmetros: escore, identidade e similaridade.

5 A substituição, deleção, inserção ou adição de um ou vários radicais de aminoácidos deveria(m) ser mutação/mutações conservativa(s) de forma a manter a atividade. A mutação conservativa representativa é uma substituição conservativa. Exemplos de substituições conservativas incluem substituição de Ser ou Thr por Ala, substituição de Gln, His ou Lys por Arg, 10 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 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, 15 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.

20 Além disso, o gene *bssR* pode ser uma variante que hibridiza em condições estridentes com a sequência de nucleotídeos mostrada na SEQ ID NO: 1, ou uma sonda que pode ser preparada a partir da sequência de nucleotídeos, desde que codifique uma proteína BssR funcional. “Condições estridentes” incluem aquelas em que um híbrido específico, por exemplo, um 25 híbrido apresentando homologia não inferior a 60 %, em outro exemplo não inferior a 70 %, em outro exemplo não inferior a 80 %, em outro exemplo não inferior a 90 %, em outro exemplo não inferior a 95 %, em outro exemplo não inferior a 98 %, e em outro exemplo não inferior a 99 %, é formado; e um híbrido não-específico, por exemplo, um híbrido apresentando homologia

inferior à acima, não é formado. Por exemplo, condições estringentes podem ser exemplificadas por meio de lavagem uma vez ou mais, ou em outro exemplo, duas ou três vezes, a uma concentração de sal de 1 $\times$ SSC, 0,1 % de SDS, ou em outro exemplo, 0,1 $\times$ SSC, 0,1 % de SDS a 60°C. A duração da lavagem depende do tipo de membrana usada para o manchamento e, via de regra, deveria ser o que é recomendado pelo fabricante. Por exemplo, a duração recomendada de lavagem para a membrana de nylon HybondTM (Amersham) em condições estringentes é de 15 minutos. A etapa de lavagem pode ser realizada de 2 a 3 vezes. O comprimento da sonda pode ser selecionado vantajosamente dependendo das condições de hibridização, e é usualmente de 100 bp a 1 kbp.

Métodos de incrementar a expressão gênica incluem aumentar o número de cópias do gene. A introdução de um gene em um vetor que é capaz de funcionar em uma bactéria da família *Enterobacteriaceae* aumenta o número de cópias do gene. É possível usar vetores com baixo número de cópias. Exemplos de vetores com baixo número de cópias incluem, mas sem limitação, pSC101, pMW118, pMW119, e análogos. O termo “vetor com baixo número de cópias” é usado para vetores, cujo número de cópias é de até 5 cópias por célula. No entanto, também é possível usar vetores com elevado número de cópias, como plasmídeos derivados de pBR.

O incremento da expressão gênica também pode ser obtido introduzindo-se múltiplas cópias do gene em um cromossomo bacteriano por meio de, por exemplo, recombinação homóloga, integração do Mu, ou análogos. Por exemplo, um ato de integração do Mu permite a introdução de até 3 cópias do gene em um cromossomo bacteriano.

O aumento do número de cópias de um gene também pode ser alcançado introduzindo-se múltiplas cópias do gene no DNA cromossômico da bactéria. Para introduzir múltiplas cópias do gene em um cromossomo bacteriano, a recombinação homóloga é realizada usando-se múltiplas cópias

de uma sequência como alvos no DNA cromossômico. Sequências apresentando múltiplas cópias no DNA cromossômico incluem, mas sem limitação DNA repetitivo, ou repetições invertidas presentes na extremidade de um elemento transponível. Da mesma forma, é possível incorporar o gene em um transpóson, e permitir que o mesmo seja transferido para introduzir múltiplas cópias do gene no DNA cromossômico.

O aumento da expressão gênica também pode ser obtido modificando-se uma sequência de controle de expressão do gene, como promotor, terminador e sequência Shine-Dalgarno (SD) sequence, por exemplo, por meio de colocação do gene objeto sob o controle de um promotor potente. Por exemplo, o promotor *lac*, o promotor *trp*, o promotor *trc*, o promotor P_R , ou os promotores P_L do fago lambda são, todos, conhecidos por serem promotores potentes. O uso de um promotor potente pode ser combinado com a multiplicação de cópias de genes. Alternativamente, o efeito de um promotor pode ser acentuado, por exemplo, por meio da introdução de uma mutação no promotor para incrementar o nível de transcrição de um gene localizado a jusante do promotor. Adicionalmente, é de conhecimento geral que a substituição de vários nucleotídeos na região espaçadora entre o sítio de ligação do ribossoma (RBS, *ribosome binding site*) e o códon de iniciação, particularmente as sequências imediatamente a montante do códon de iniciação, podem afetar profundamente a traduzibilidade do mRNA. Por exemplo, encontrou-se uma faixa de 20 vezes nos níveis de expressão, dependendo da natureza dos três nucleotídeos que precedem o códon de iniciação (Gold *et al.*, Annu. Rev. Microbiol., 35, 365-403, 1981; Hui *et al.*, EMBO J., 3, 623-629, 1984).

Além disso, também é possível introduzir uma substituição de nucleotídeo na região promotora de um gene no cromossomo bacteriano, o que resulta em uma função promotora mais forte. A alteração da sequência de controle de expressão pode ser realizada, por exemplo, da mesma maneira que

a substituição do gene usando um plasmídeo sensível a temperatura, como divulgado no WO 00/18935 e JP 1-215280 A.

Métodos para a preparação de DNA plasmídico, digestão e ligação de DNA, transformação, seleção de um oligonucleotídeo como um iniciador [*primer*], e análogos podem ser ordinariamente métodos bem conhecidos por alguém com prática na arte. Estes métodos são descritos, por exemplo, em Sambrook, J., Fritsch, E.F., e Maniatis, T., “Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition”, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

Bactérias produtoras de L-aminoácido

Como uma bactéria de acordo com o objeto presentemente revelado que é modificada de forma a acentuar a expressão do gene *bssR*, é possível usar bactérias que são capazes de produzir L-aminoácidos aromáticos ou não-aromáticos.

A bactéria de acordo com o objeto presentemente revelado pode ser obtida acentuando-se a expressão do gene *bssR* em uma bactéria que possui inerentemente a capacidade de produzir L-aminoácido. Alternativamente, a bactéria de acordo com o objeto presentemente revelado pode ser obtida conferindo-se a capacidade de produzir L-aminoácido a uma bactéria que já apresenta a expressão acentuada do gene *bssR*.

Bactérias produtoras de L-treonina

Exemplos de bactérias produtoras de L-treonina ou cepas parentais, que podem ser usadas para derivar as bactérias produtoras de L-treonina incluem, mas sem limitação, cepas pertencentes ao gênero *Escherichia*, como *E. coli* TDH-6/pVIC40 (VKPM B-3996) (Patente dos Estados Unidos nº 5.175.107, Patente dos Estados Unidos nº 5.705.371), *E. coli* 472T23/pYN7 (ATCC 98081) (Patente dos Estados Unidos nº 5.631.157), *E. coli* NRRL-21593 (Patente dos Estados Unidos nº 5.939.307), *E. coli* FERM BP-3756 (Patente dos Estados Unidos nº 5.474.918), *E. coli*

FERM BP-3519 e FERM BP-3520 (Patente dos Estados Unidos nº 5.376.538), *E. coli* MG442 (Gusyatiner *et al.*, Genetika (em Russo), 14, 947-956 (1978)), *E. coli* VL643 e VL2055 (EP 1149911 A), e análogos.

A cepa TDH-6 é deficiente de gene *thrC*, e também é
 5 assimilativa de sacarose, e o gene *ilvA* apresenta uma mutação hipomórfica. Esta cepa também apresenta uma mutação no gene *rhtA*, que confere resistência a elevadas concentrações de treonina ou homoserina. A cepa B-3996 contém o plasmídeo pVIC40 que foi obtido inserindo-se um óperon *thrA*BC* que inclui um gene mutante *thrA* no vetor derivado de RSF1010.
 10 Este gene mutante *thrA* codifica aspartoquinase homoserina desidrogenase I que apresenta inibição de feedback substancialmente dessensibilizada pela treonina. A cepa B-3996 foi depositada em 19 de novembro de 1987 no *All-Union Scientific Center of Antibiotics* (Russia, 117105 Moscow, Nagatinskaya Street 3-A) sob o número de acesso RIA 1867. A cepa também
 15 foi depositada na Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) [Coleção nacional russa de microorganismos industriais] (GNII genetika, 1 Dorozhny proezd, 1, Moscow 117545, Federação Russa) em 7 de abril de 1987 sob o número de acesso B-3996.

E. coli VKPM B-5318 (EP 0593792B) também pode ser usada
 20 como uma cepa parental para derivar bactérias produtoras de L-treonina. A cepa B-5318 é prototrófica com relação à isoleucina, e um repressor de fago-lambda C1 sensível à temperatura e promotor PR substitui a região reguladora do óperon treonina no plasmídeo pVIC40. A cepa VKPM B-5318 foi depositado na *Russian National Collection of Industrial Microorganisms*
 25 (VKPM) em 3 de maio de 1990 sob número de acesso de VKPM B-5318.

A bactéria pode ser modificada adicionalmente para acentuar a expressão de um ou mais dos seguintes genes:

- o gene *thrA* mutante que codifica para aspartoquinase homoserina desidrogenase I resistente a inibição de feedback por treonina;

- o gene *thrB* que codifica para homoserina quinase;
- o gene *thrC* que codifica para treonina sintase;
- o gene *rhtA* que codifica para uma proteína de transmembrana putativa;

5 - o gene *asd* que codifica para aspartato- β -semialdeído desidrogenase; e

 - o gene *aspC* que codifica para aspartato aminotransferase (aspartato transaminase);

 O gene *thrA* que codifica aspartoquinase homoserina desidrogenase I de *Escherichia coli* já foi elucidado (posições de nucleotídeos de 337 a 2799, nº de acesso GenBank NC_000913.2, gi: 49175990). O gene *thrA* encontra-se localizado entre os genes *thrL* e *thrB* no cromossomo de *E. coli* K-12. O gene *thrB* que codifica homoserina quinase de *Escherichia coli* foi elucidado (posições de nucleotídeos de 2801 a 3733, nº de acesso GenBank NC_000913.2, gi: 49175990). O gene *thrB* encontra-se localizado entre os genes *thrA* e *thrC* no cromossomo de *E. coli* K-12. O gene *thrC* que codifica treonina sintase de *Escherichia coli* foi elucidado (posições de nucleotídeos de 3734 a 5020, nº de acesso GenBank NC_000913.2, gi: 49175990). O gene *thrC* encontra-se localizado entre o gene *thrB* e a matriz de leitura aberta *yaaX* no cromossomo de *E. coli* K-12. Todos os três genes funcionam como um óperon de treonina simples. Para acentuar a expressão do óperon de treonina, a região atenuadora que afeta a transcrição é removida desejavelmente do óperon (WO2005/049808, WO2003/097839).

25 Um gene *thrA* mutante que codifica para aspartoquinase homoserina desidrogenase I resistente a inibição de feedback por treonina, bem como os genes *thrB* e *thrC*, podem ser obtidos como um óperon do bem conhecido plasmídeo pVIC40 que está presente na cepa VKPM B-3996 de *E. coli* produtora de treonina. O plasmídeo pVIC40 é descrito detalhadamente na Patente dos Estados Unidos nº 5.705.371.

O gene *rhtA* existe a 18 min no cromossomo de *E. coli* próximo do óperon *glnHPQ*, que codifica componentes do sistema de transporte de glutamina. O gene *rhtA* é idêntico à ORF1 (gene *ybiF*, posições de nucleotídeos de 764 a 1651, número de acesso GenBank AAA218541, gi:440181) e encontra-se localizado entre os genes *pexB* e *ompX*. A unidade que expressa uma proteína codificada pela ORF1 foi designada o gene *rhtA* (*rht*: resistência à homoserina e treonina). Da mesma forma, revelou-se que a mutação *rhtA23* é uma substituinte de A-por-G na posição 1 com relação ao códon de iniciação ATG (*ABSTRACTS of the 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology* em conjugação com *Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, San Francisco, Califórnia, agosto de 24-29, 1997, *abstract No. 457*, EP 1013765 A).

O gene *asd* de *E. coli* já foi elucidado (posições de nucleotídeos de 3572511 a 3571408, nº de acesso GenBank NC_000913.1, gi:16131307), e pode ser obtido por meio de PCR (reação em cadeia da polimerase; referir a White, T.J. *et al.*, *Trends Genet.*, 5, 185 (1989)) usando iniciadores preparados com base na sequência de nucleotídeos do gene. Os genes *asd* de outros microorganismos podem ser obtidos de uma maneira similar.

Da mesma forma, o gene *aspC* de *E. coli* já foi elucidado (posições de nucleotídeos de 983742 a 984932, nº de acesso GenBank NC_000913.1, gi:16128895), e pode ser obtido por meio de PCR. Os genes *aspC* de outros microorganismos podem ser obtidos de uma maneira similar.

Bactérias produtoras de L-lisina

Exemplos de bactérias produtoras de L-lisina pertencentes ao gênero *Escherichia* incluem mutantes apresentando resistência a um análogo de L-lisina. O análogo de L-lisina inibe o crescimento de bactérias pertencentes ao gênero *Escherichia*, mas esta inibição é totalmente ou parcialmente dessensibilizada quando a L-lisina está presente no meio.

Exemplos do análogo de L-lisina incluem, mas sem limitação, oxalisina, lisina hidroxamato, S-(2-aminoetil)-L-cisteína (AEC), γ -metil-lisina, α -clorocaprolactama etc. Mutantes apresentando resistência a estes análogos de lisina podem ser obtidos submetendo-se bactérias pertencentes ao gênero

5 *Escherichia* a um tratamento convencional de mutagênese artificial. Exemplos específicos de cepas bacterianas úteis para produzir L-lisina incluem *Escherichia coli* AJ11442 (FERM BP-1543, NRRL B-12185; ver Patente dos Estados Unidos nº 4.346.170) e *Escherichia coli* VL611. Nestes microorganismos, a dessensibilização de feedback de aspartoquinase por L-

10 lisina é dessensibilizada.

A cepa WC196 pode ser usada como uma bactéria produtora de L-lisina de *Escherichia coli*. Esta cepa bacteriana foi cultivada conferindo-se resistência a AEC à cepa W3110, que foi derivada de *Escherichia coli* K-12. A cepa resultante foi designada como cepa AJ13069 de *Escherichia coli* e

15 foi depositada no *National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology* (correntemente *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary*, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukubashi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japão) em 6 de dezembro de 1994 e recebeu um

20 número de acesso FERM P-14690. Em seguida, foi convertida a um depósito internacional sob as provisões do Tratado de Budapeste em 29 de setembro de 1995, e recebeu um número de acesso FERM BP-5252 (Patente dos Estados Unidos nº 5.827.698).

Exemplos de bactérias produtoras de L-lisina ou cepas

25 parentais, que podem ser usados para derivar bactérias produtoras de L-lisina também incluem cepas em que a expressão de um ou mais genes que codificam uma enzima biossintética de L-lisina são acentuados. Exemplos de referidos genes incluem, mas sem limitação, genes que codificam diidrodipicolinato sintase (*dapA*), aspartoquinase (*lysC*), diidrodipicolinato

redutase (*dapB*), diaminopimelato descarboxilase (*lysA*), diaminopimelato desidrogenase (*ddh*) (Patam 6,040,160), fosfoenolpiruvato carboxilase (*ppc*), aspartato semialdeído desidrogenase (*asd*), e aspartase (*aspA*) (EP 1253195 A). Adicionalmente, as cepas parentais podem apresentar expressão incrementada do gene envolvido na eficiência energética (*cyo*) (EP 1170376 A), o gene que codifica a nicotinamida nucleotídeo transidrogenase (*pntAB*) (Patente dos Estados Unidos nº 5.830.716), o gene *ybjE* (WO2005/073390), ou combinações dos mesmos.

Exemplos de cepas parentais, que podem ser usados para derivar bactérias produtoras de L-lisina também incluem cepas apresentando atividade diminuída ou eliminada de uma enzima que catalisa uma reação para gerar um composto diferente da L-lisina por meio de ramificação secundária da via biossintética da L-lisina. Exemplos das enzimas que catalisam uma reação para gerar um composto diferente da L-lisina por meio de ramificação secundária da via biossintética da L-lisina incluem homoserina desidrogenase, lisina descarboxilase (Patente dos Estados Unidos nº 5.827.698), e a enzima málica (WO2005/010175).

Bactérias produtoras de L-cisteína

Exemplos de bactérias produtoras de L-cisteína ou cepas parentais que podem ser usadas para derivar bactérias produtoras de L-cisteína incluem, mas sem limitação, cepas pertencentes ao gênero *Escherichia*, como *E. coli* JM15 que é transformada com diferentes alelos *cysE* que codificam para serina acetiltransferases resistentes a feedback (Patente dos Estados Unidos nº 6.218.168, pedido de patente russa 2003121601); *E. coli* W3110 apresentando genes superexpressos que codificam proteínas vantajosas para secretar substâncias tóxicas para células (Patente dos Estados Unidos nº 5.972.663); cepas de *E. coli* apresentando atividade reduzida de cisteína dessulfidrase (JP11155571A2); *E. coli* W3110 com atividade incrementada de um regulador transcricional positivo para o

régulon de cisteína codificado pelo gene *cysB* (WO0127307A1), e análogos.

Bactérias produtoras de L-leucina

Exemplos de bactérias produtoras de L-leucina ou cepas parentais que podem ser usadas para derivar bactérias produtoras de L-leucina incluem, mas sem limitação, cepas pertencentes ao gênero *Escherichia*, como cepas de *E. coli* resistentes à leucina (por exemplo, a cepa 57 (VKPM B-7386, Patente dos Estados Unidos nº 6.124.121)) ou análogos de leucina incluindo β -2-tienilalanina, 3-hidroxileucina, 4-azaleucina, 5,5,5-trifluoroleucina (JP 62-34397 B e JP 8-70879 A); cepas de *E. coli* obtidas pelo método de manipulação genética descrito no WO96/06926; *E. coli* H-9068 (JP 8-70879 A), e análogos.

A bactéria pode ser aperfeiçoada acentuando-se a expressão de um ou mais genes envolvidos na biossíntese da L-leucina. Exemplos incluem genes do óperon *leuABCD*, que são representados, de preferência, por um gene *leuA* mutante que codifica para isopropilmalato sintase que é livre de inibição de *feedback* por L-leucina (Patente dos Estados Unidos nº 6.403.342). Adicionalmente, a bactéria pode ser aperfeiçoada acentuando-se a expressão de um ou mais genes que codificam para proteínas que excretam L-aminoácido da célula bacteriana. Exemplos de referidos genes incluem os genes b2682 e b2683 (genes *ygaZH*) (EP 1239041 A2).

Bactérias produtoras de L-histidina

Exemplos de bactérias produtoras de L-histidina ou cepas parentais que podem ser usadas para derivar bactérias produtoras de L-histidina incluem, mas sem limitação, cepas pertencentes ao gênero *Escherichia*, como *E. coli* cepa 24 (VKPM B-5945, RU2003677); *E. coli* cepa 80 (VKPM B-7270, RU2119536); *E. coli* NRRL B-12116 – B12121 (Patente dos Estados Unidos nº 4.388.405); *E. coli* H-9342 (FERM BP-6675) e H-9343 (FERM BP-6676) (Patente dos Estados Unidos nº 6.344.347); *E. coli* H-9341 (FERM BP-6674) (EP1085087); *E. coli* AI80/pFM201 (Patente dos

Estados Unidos nº 6.258.554) e análogos.

Exemplos de cepas parentais, que podem ser usadas para derivar bactérias produtoras de L-histidina também incluem cepas em que a expressão de um ou mais genes que codifica, uma enzima biossintética de L-histidina é acentuada. Exemplos de referidos genes incluem genes que codificam ATP fosforibosiltransferase (*hisG*), fosforibosil AMP cicloidrolase (*hisI*), fosforibosil-ATP pirofosfoidrolase (*hisIE*), fosforibosilformimino-5-aminoimidazol carboxamida ribotídeo isomerase (*hisA*), amidotransferase (*hisH*), histidinol fosfato aminotransferase (*hisC*), histidinol fosfatase (*hisB*), histidinol desidrogenase (*hisD*), etc.

É de conhecimento geral que enzimas biossintéticas de L-histidina codificadas por *hisG* e *hisBHAFI* são inibidas por L-histidina, e, portanto, também é possível acentuar uma capacidade produtora de L-histidina via introdução de uma mutação em ATP fosforibosiltransferase que confere resistência à inibição de feedback (patentes russas nums. 2003677 e 2119536).

Exemplos específicos de cepas apresentando uma capacidade produtora de L-histidina incluem *E. coli* FERM-P 5038 e 5048 que foram introduzidas com um vetor que porta um DNA que codifica uma enzima biossintética de L-histidina (JP 56-005099 A), cepas de *E. coli* introduzidas com *rht*, um gene para uma exportação de aminoácido (EP1016710A), cepa 80 de *E. coli* conferida com sulfaguanidina, DL-1,2,4-triazol-3-alanina, e resistência à estreptomicina (VKPM B-7270, Patente russa nº 2119536), etc.

Bactérias produtoras de L-ácido glutâmico

Exemplos de bactérias produtoras de L-ácido glutâmico ou cepas parentais que podem ser usadas a derivar bactérias produtoras de L-ácido glutâmico incluem, mas sem limitação, cepas pertencentes ao gênero *Escherichia*, como *E. coli* VL334thrC⁺ (EP 1172433). *E. coli* VL334 (VKPM B-1641) é uma cepa auxotrófica de L-isoleucina e L-treonina apresentando

mutações em genes *thrC* e *ilvA* (Patente dos Estados Unidos nº 4.278.765). Um alelo de tipo selvagem do gene *thrC* foi transferido por meio do método de transdução geral usando um bacteriófago P1 que foi desenvolvido em células de K12 de *E. coli* de tipo selvagem (VKPM B-7). Como um resultado, 5 obteve-se uma cepa auxotrófica para L-isoleucina VL334*thrC*⁺ (VKPM B-8961), que é capaz de produzir L-ácido glutâmico.

Exemplos de cepas parentais, que podem ser usadas para derivar as bactérias produtoras de L-ácido glutâmico incluem, mas sem limitação, cepas que são deficientes de atividade de α -cetoglutarato desidrogenase, ou cepas em que um ou mais genes que codificam uma enzima 10 biossintética de L-ácido glutâmico são sintetizados. Exemplos dos genes envolvidos na biossíntese do L-ácido glutâmico incluem genes que codificam glutamato desidrogenase (*gdhA*), glutamina sintetase (*glnA*), glutamato sintetase (*gltAB*), isocitrato desidrogenase (*icdA*), aconitato hidratase (*acnA*, 15 *acnB*), citrato sintase (*gltA*), fosfoenolpiruvato carboxilase (*ppc*), piruvato carboxilase (*pyc*), piruvato desidrogenase (*aceEF*, *lpdA*), piruvato quinase (*pykA*, *pykF*), fosfoenolpiruvato sintase (*ppsA*), enolase (*eno*), fosfogliceromutase (*pgmA*, *pgmI*), fosfoglicerato quinase (*pgk*), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gapA*), triose fosfato isomerase (*tpiA*), frutose 20 bifosfato aldolase (*fbp*), fosfofrutoquinase (*pfkA*, *pfkB*), e glicose fosfato isomerase (*pgi*).

Exemplos de cepas modificadas para que a expressão do gene citrato sintetase, o gene fosfoenolpiruvato carboxilase, e/ou o gene glutamato desidrogenase é/seja acentuada incluindo aquelas reveladas na EP1078989A, 25 EP955368A, e EP952221A.

Exemplos de cepas que foram modificadas para que a expressão do gene citrato sintetase e/ou o gene fosfoenolpiruvato carboxilase fosse reduzida, e/ou/são deficientes de atividade de α -cetoglutarato desidrogenase incluem aquelas reveladas na EP1078989A, EP955368A, e

EP952221A.

Exemplos de cepas parentais, que podem ser usadas para derivar as bactérias produtoras de L-ácido glutâmico também incluem cepas apresentando atividades diminuída ou eliminada de um enzima que catalisa a síntese de um composto diferente do L-ácido glutâmico por meio de ramificação secundária de uma via de biossíntese do L-ácido glutâmico. Exemplos de referidas enzimas incluem isocitrato liase (*aceA*), α -cetoglutarato desidrogenase (*sucA*), fosfotransacetilase (*pta*), acetato quinase (*ack*), ácido acetoidróxi sintase (*ilvG*), acetolactato sintase (*ilvI*), formiato acetiltransferase (*pfl*), lactato desidrogenase (*ldh*), e glutamato descarboxilase (*gadAB*). Bactérias pertencentes ao gênero *Escherichia* deficientes da atividade de α -cetoglutarato desidrogenase ou apresentando uma reduzida atividade de α -cetoglutarato desidrogenase e métodos para obter as mesmas são descritas nas Patentes dos Estados Unidos num. 5.378.616 e 5.573.945. Especificamente, estas cepas incluem as seguintes:

E. coli W3110*sucA::Km^R*

E. coli AJ12624 (FERM BP-3853)

E. coli AJ12628 (FERM BP-3854)

E. coli AJ12949 (FERM BP-4881)

E. coli W3110*sucA::Km^R* é uma cepa obtida por meio de interrupção do gene α -cetoglutarato desidrogenase (referido a seguir como “gene *sucA*”) de *E. coli* W3110. Esta cepa é completamente deficiente da α -cetoglutarato desidrogenase.

Outros exemplos de bactérias produtoras de L-ácido glutâmico incluem aquelas que pertencem ao gênero *Escherichia* e apresentam resistência a um antimetabólito de ácido aspártico. Estas cepas também podem ser deficientes da atividade de α -cetoglutarato desidrogenase e incluem, por exemplo, *E. coli* AJ13199 (FERM BP-5807) (Patente dos Estados Unidos nº 5.908.768), FFRM P-12379, que apresenta adicionalmente

uma baixa capacidade de decomposição do L-ácido glutâmico (Patente dos Estados Unidos nº 5.393.671); AJ13138 (FERM BP-5565) (Patente dos Estados Unidos nº 6.110.714), e análogos.

Exemplos de bactérias produtoras de L-ácido glutâmico incluem cepas mutantes pertencentes ao gênero *Pantoea* que são deficientes da atividade de α -cetoglutarato desidrogenase ou que apresentam uma atividade diminuída de α -cetoglutarato desidrogenase, e podem ser obtidas como descrito acima. Referidas cepas incluem *Pantoea ananatis* AJ13356. (Patente dos Estados Unidos nº 6.331.419). *Pantoea ananatis* AJ13356 foi depositada no *National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry* (correntemente, *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary*, Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japão) em 19 de fevereiro de 1998 sob um número de acesso de FERM P-16645. Em seguida, foi convertido a um depósito internacional sob as provisões do Tratado de Budapeste em 11 de janeiro de 1999 e receberam um número de acesso de FERM BP-6615. *Pantoea ananatis* AJ13356 é deficiente da atividade de α -cetoglutarato desidrogenase como um resultado da rompimento do gene de subunidade de α KGDH-E1 (*sucA*). A cepa acima foi identificada como *Enterobacter agglomerans* quando ela foi isolada e depositada como *Enterobacter agglomerans* AJ13356. No entanto, foi recentemente reclassificada como *Pantoea ananatis* com base no sequência de nucleotídeos de 16S rRNA etc. Embora AJ13356 fosse depositada no depositório previamente indicado como *Enterobacter agglomerans*, para os fins desta descrição, elas são descritas como *Pantoea ananatis*.

Bactérias produtoras de L-fenilalanina

Exemplos de bactérias produtoras de L-fenilalanina ou cepas parentais que podem ser usadas para derivar bactérias produtoras de L-

fenilalanina incluem, mas sem limitação, cepas pertencentes ao gênero *Escherichia*, como *E. coli* AJ12739 (tyrA::Tn10, tyrR) (VKPM B-8197); *E. coli* HW1089 (ATCC 55371) abrigando o gene pheA34 mutante (Patente dos Estados Unidos nº 5.354.672); *E. coli* MWEC101-b (KR8903681); *E. coli* NRRL B-12141, NRRL B-12145, NRRL B-12146 e NRRL B-12147 (Patente dos Estados Unidos nº 4.407.952). Da mesma forma, como uma cepa parental, *E. coli* K-12 [W3110 (tyrA)/pPHAB (FERM BP-3566), *E. coli* K-12 [W3110 (tyrA)/pPHAD] (FERM BP-12659), *E. coli* K-12 [W3110 (tyrA)/pPHATerm] (FERM BP-12662) e *E. coli* K-12 [W3110 (tyrA)/pBR-aroG4, pACMAB] denominado AJ 12604 (FERM BP-3579) podem ser usadas (EP 488424 B1). Adicionalmente, bactérias produtoras de L-fenilalanina pertencentes ao gênero *Escherichia* com uma atividade incrementada da proteína codificada pelo gene *yedA* ou o gene *yddG* também podem ser usadas (Pedidos de Patentes dos E.U.A. 2003/0148473 A1 e 2003/0157667 A1).

Bactérias produtoras de L-triptofano

Exemplos de bactérias produtoras de L-triptofano ou cepas parentais que podem ser usadas para derivar as bactérias produtoras de L-triptofano incluem, mas sem limitação, cepas pertencentes ao gênero *Escherichia*, como *E. coli* JP4735/pMU3028 (DSM10122) e JP6015/pMU91 (DSM10123) que é deficiente da triptofanoil-tRNA sintetase codificada pelo gene *trpS* mutante (Patente dos Estados Unidos nº 5.756.345); *E. coli* SV164 (pGH5) apresentando um alelo *serA* que codifica fosfoglicerato desidrogenase livre de inibição de feedback por serina e um alelo *trpE* codificando antranilato sintase livre de inibição de feedback por triptofano (Patente dos Estados Unidos nº 6.180.373); *E. coli* AGX17 (pGX44) (NRRL B-12263) e AGX6(pGX50)aroP (NRRL B-12264) deficiente da enzima triptofanoase (Patente dos Estados Unidos nº 4.371.614); *E. coli* AGX17/pGX50,pACKG4-pps em que uma capacidade produtora de fosfoenolpiruvato é incrementada (WO9708333, Patente dos Estados Unidos nº 6.319.696), e análogos podem

ser usados. Bactérias produtoras de L-triptofano pertencentes ao gênero *Escherichia* com uma atividade incrementada da proteína identificada codificada por e o gene *yedA* ou o gene *yddG* também podem ser usados (Pedidos de Patentes dos E.U.A. 2003/0148473 A1 e 2003/0157667 A1).

5 Exemplos de cepas parentais para derivar as bactérias produtoras de L-triptofano também incluem cepas em que uma ou mais atividades das enzimas selecionadas dentre antranilato sintase, fosfoglicerato desidrogenase, e triptofano sintase são incrementadas. A antranilato sintase e fosfoglicerato desidrogenase são, ambas, sujeitas à inibição de feedback por
10 L-triptofano e L-serina, de forma que uma mutação dessensibilizadora da inibição de feedback podem ser introduzidas nestas enzimas. Exemplos específicos de cepas apresentando uma mutação do tipo referido incluem uma *E. coli* SV164 que abriga antranilato sintase dessensibilizada e uma cepa transformante obtida por meio de introdução na *E. coli* SV164 do plasmídeo pGH5 (WO 94/08031), que contém um gene *serA* mutante que codifica
15 fosfoglicerato desidrogenase dessensibilizada para feedback.

Exemplos de cepas parentais para derivar as bactérias produtoras de L-triptofano também incluem cepas em que o óperon de triptofano que contém um gene que codifica antranilato sintase
20 dessensibilizada foi introduzido (JP 57-71397 A, JP 62-244382 A, Patente dos Estados Unidos nº 4.371.614). Além disso, a capacidade produtora de L-triptofano pode ser conferida via acentuação da expressão de um gene que codifica triptofano sintase, entre óperons de triptofano (*trpBA*). A triptofano sintase consiste de subunidades α e β que são codificadas pelos genes *trpA* e
25 *trpB*, respectivamente. Adicionalmente, a capacidade produtora de L-triptofano pode ser conferida acentuando-se a expressão do óperon de isocitrato liase-malato sintase (WO2005/103275).

Bactérias produtoras de L-prolina

Exemplos de bactérias produtoras de L-prolina ou cepas

parentais que podem ser usadas para derivar bactérias produtoras de L-prolina incluem, mas sem limitação, cepas pertencentes ao gênero *Escherichia*, como *E. coli* 702ilvA (VKPM B-8012) que é deficiente do gene *ilvA* e que é capaz de produzir L-prolina (EP 1172433). As bactérias podem ser aperfeiçoadas acentuando-se a expressão de um ou mais genes envolvidos na biossíntese da L-prolina. Exemplos de referidos genes para bactérias produtoras de L-prolina que são preferidas incluem o gene *proB* que codifica para glutamato quinase cuja inibição de feedback por L-prolina é dessensibilizada (patente alemã DE 3127361). Adicionalmente, as bactérias podem ser aperfeiçoadas acentuando-se a expressão de um ou mais genes que codificam para proteínas que excretam L-aminoácido da célula bacteriana. Referidos genes são exemplificados pelos genes b2682 e b2683 (genes *ygaZH*) (EP1239041 A2).

Exemplos de bactérias pertencentes ao gênero *Escherichia*, que apresentam uma atividade para produzir L-prolina incluem as seguintes cepas de *E. coli*: NRRL B-12403 e NRRL B-12404 (GB Patent 2075056), VKPM B-8012 (Russian patent application 2000124295), mutantes de plasmídeos descritos na patente DE 3127361, mutantes de plasmídeos descritos por Bloom F.R. *et al* (*The 15th Miami winter symposium*, 1983, p. 34), e análogos.

Bactérias produtoras de L-arginina

Exemplos de bactérias produtoras de L-arginina ou cepas parentais que podem ser usadas para derivar bactérias produtoras de L-arginina incluem, mas sem limitação, cepas pertencentes ao gênero *Escherichia*, como *E. coli* cepa 237 (VKPM B-7925) (Pedido de Patente dos E.U.A. 2002/058315 A1) e suas cepas derivadas que abrigam a N-acetilglutamato sintase mutante (Pedido de Patente Russa nº 2001112869), *E. coli* cepa 382 (VKPM B-7926) (EP1170358A1), uma cepa produtora de arginina em que gene *argA* que codifica N-acetilglutamato sintetase é introduzido ali (EP1170361A1), e análogos.

Exemplos de cepas parentais para derivar bactérias produtoras de L-arginina também incluem cepas cuja expressão de um ou mais genes que codificam uma enzima biossíntese de L-arginina é acentuada. Exemplos de referidos genes incluem genes que codificam N-acetilglutamato fosfato redutase (*argC*), ornitina acetil transferase (*argJ*), N-acetilglutamato quinase (*argB*), acetilornitina transaminase (*argD*), ornitina carbamoil transferase (*argF*), ácido argininossuccínico sintetase (*argG*), ácido argininossuccínico liase (*argH*), e carbamoil fosfato sintetase (*carAB*).

Bactérias produtoras de L-citrulina

Exemplos de bactérias produtoras de L-citrulina ou cepas parentais que podem ser usadas para derivar bactérias produtoras de L-citrulina incluem, mas sem limitação, cepas pertencentes ao gênero *Escherichia*, como cepas mutantes de *E. coli* N-acetilglutamato sintase 237/pMADS11, 237/pMADS12 e 237/pMADS13 (RU2215783, EP1170361B1, US6790647B2), cepas de *E. coli* 333 (VKPM B-8084) e 374 (VKPM B-8086), ambas abrigando carbamoil fosfato sintetase mutante resistente a feedback (Patente Russa RU2264459 C2), cepas *E. coli*, em que a atividade de α -cetoglutarato sintase é incrementada, e atividades de ferredoxina NADP⁺ redutase, piruvato sintase ou α -cetoglutarato desidrogenase são modificadas adicionalmente (EP 2133417 A1), e cepa *P. ananantis* NA1sucAsdhA, em que as atividades de succinato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase são diminuídas (Pedido de Patente dos E.U.A. nº 2009286290), e análogos.

Como a L-citrulina é um intermediário da via biossíntese da L-arginina, exemplos de cepas parentais, que podem ser usadas para derivar bactérias produtoras de L-citrulina, incluem cepas, cuja expressão de um ou mais genes que codificam uma via biossintética da L-arginina é acentuada. Exemplos de referidos genes incluem, mas sem limitação, genes que codificam N-acetilglutamato sintase (*argA*), N-acetilglutamato quinase

(*argB*), N-acetilglutamato fosfato redutase (*argC*), acetilornitina transaminase (*argD*), acetilornitina desacetilase (*argE*), ornitina carbamoiltransferase (*argF/I*), e carbamoil fosfato sintetase (*carAB*), ou combinações dos mesmos.

Da mesma forma bactérias produtoras de citrulina podem ser facilmente obtidas de qualquer bactéria produtora de arginina, por exemplo, cepa de *E. coli* 382 (VKPM B-7926), por meio de inativação de argininossuccinato sintase codificada pelo gene *argG*.

A expressão “inativação de argininossuccinato sintase” significa que a bactéria foi modificada de tal modo que a bactéria modificada contém argininossuccinato sintase inativa ou ela também pode significar que a bactéria é incapaz de sintetizar a argininossuccinato sintase. A inativação da argininossuccinato sintase pode ser realizada por meio de inativação do gene *argG*.

A expressão “inativação do gene *argG*” significa que o gene modificado codifica uma proteína completamente não-funcional. Também é possível que a região de DNA modificada é incapaz de expressar naturalmente o gene devido à deleção de uma parte do gene ou do gene inteiro, ao desvio da matriz de leitura do gene, à introdução de mutação/mutações *missense* [n.t.: sentido trocado]/*nonsense* [n.t.: sem sentido], ou a modificação de uma região adjacente do gene, incluindo sequências que controlam a expressão gênica, como um promotor, acentuador, atenuador, sítio de ligação de ribossoma, etc.

A presença ou ausência do gene *argG* no cromossomo de uma bactéria pode ser detectada por meio de métodos bem conhecidos, incluindo PCR, *Southern blotting*, e análogos. Adicionalmente, o nível da expressão gênica pode ser estimado medindo-se a quantidade de mRNA transcrito do gene que usa vários métodos bem conhecidos, incluindo *Northern blotting*, RT-PCR quantitativa, e análogos. A quantidade da proteína codificada pelo gene *argG* pode ser medida por meio de métodos bem conhecidos, incluindo

SDS-PAGE seguido de um ensaio de imuno-manchamento (análise por manchamento Western *blotting*), e análogos.

A expressão do gene *argG* pode ser atenuada introduzindo-se uma mutação no gene no cromossomo de modo que a atividade intracelular da proteína codificada pelo gene é diminuída em comparação com uma cepa não-modificada. Mutações que resultam em atenuação da expressão do gene incluem a substituição de uma base ou mais causando uma substituição de aminoácidos na proteína codificada pelo gene (mutação *missense*), introdução de um códon de interrupção [*stop*] (mutação *nonsense*), deleção de uma ou duas bases para causar um desvio de matriz, inserção de um gene de resistência a droga, ou deleção de uma parte do gene ou de todo o gene (Qiu, Z. e Goodman, M.F., J. Biol. Chem., 272, 8611-8617 (1997); Kwon, D. H. *et al*, J. Antimicrob. Chemother., 46, 793-796 (2000)). A expressão do gene *argG* também pode ser atenuada modificando-se uma sequência reguladora de expressão, como o promotor, a sequência Shine-Dalgarno (SD), etc. (WO95/34672, Carrier, T.A. e Keasling, J.D., Biotechnol Prog 15, 58-64 (1999)).

Por exemplo, os métodos a seguir podem ser usados para introduzir uma mutação por meio de recombinação de genes. Prepara-se um gene mutante que codifica uma proteína mutante com menor atividade, e a bactéria a ser modificada é transformada com um fragmento de DNA contendo o gene mutante. Em seguida, o gene nativo no cromossomo é substituído pelo gene mutante por meio de recombinação homóloga, e a cepa resultante é selecionada. É possível realizar substituição ou disrupção gênica usando recombinação homóloga por meio do uso de um DNA linear, que é conhecido como “integração impelida ao vermelho [*Red-driven integration*]” (Datsenko, K.A. e Wanner, B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 12, p 6640-6645 (2000)), ou por meio do uso de um plasmídeo contendo uma origem de replicação sensível à temperatura (Patente dos Estados Unidos nº 6.303.383 ou

JP 05-007491A). Adicionalmente, a mutação sítio-específica por meio de substituição gênica também pode ser incorporada usando recombinação homóloga, como apresentando acima usando-se um plasmídeo que é incapaz de replicar no hospedeiro.

5 A expressão do gene também pode ser atenuada inserindo-se um transpóson ou um fator IS na região codificante do gene (Patente dos Estados Unidos nº 5.175.107), ou por meio de métodos convencionais, como por meio de mutagênese com irradiação UV ou nitrosoguanidina (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina).

10 Bactérias produtoras de L-ornitina

Bactéria produtora de L-ornitina pode ser obtida facilmente de qualquer bactéria produtora de arginina, por exemplo, a cepa de *E. coli* 382 (VKPM B-7926), por meio de inativação da ornitina carbamoiltransferase codificada por ambos os genes *argF* e *argI*. Métodos para inativação da
15 ornitina carbamoiltransferase são descritos acima.

Bactérias produtoras de L-valina

Exemplos de bactérias produtoras de L-valina ou cepas parentais que podem ser usadas para derivar bactérias produtoras de L-valina incluem bactérias pertencentes ao gênero *Escherichia*, como H-81 (VKPM B-
20 8066), NRRL B-12287 e NRRL B-12288 (US patent No. 4,391,907), VKPM B-4411 (US patent No. 5,658,766), VKPM B-7707 (Pedido de Patente Européia EP1016710A2), ou análogos.

Exemplo de cepas parentais para derivar bactérias produtoras de L-valina incluem, mas sem limitação, cepas que foram modificadas para
25 superexpressar o óperon *ilvGMEDA* (Patente dos Estados Unidos nº 5.998.178). É desejável remover a região do óperon *ilvGMEDA* que é requerido para atenuação de modo que a expressão do óperon não seja atenuada por L-valina que é produzida. Adicionalmente, o gene *ilvA* no óperon é desejavelmente rompido de modo que a atividade de treonina

desaminase seja diminuída.

Exemplos de cepas parentais para derivar bactérias produtoras de L-valina também incluem mutantes apresentando uma mutação de aminoacil t-RNA sintetase (Patente dos Estados Unidos nº 5.658.766). Por exemplo, é possível usar *E. coli* VL1970, que apresenta uma mutação no gene *ileS* que codifica isoleucina tRNA sintetase. *E. coli* VL1970 foi depositado na Coleção Nacional Russa de Microorganismos Industriais [Russian National Collection of Industrial Microorganisms] (VKPM) (GNII genetika, 1 Dorozhny proezd, 1, Moscow 117545, Federação Russa) em 24 de junho de 1988 sob número de acesso VKPM B-4411.

Adicionalmente, também é possível usar mutantes que requerem ácido lipóico para crescimento e/ou que carecem de H^+ -ATPase, as cepas parentais (WO96/06926).

Bactérias produtoras de L-isoleucina

Exemplos de bactérias produtoras de L-isoleucina ou cepas parentais que podem ser usadas para derivar bactérias produtoras de L-isoleucina incluem, mas sem limitação, mutantes apresentando resistência a 6-dimetilaminopurina (JP 5-304969 A), mutantes apresentando resistência a um análogo de isoleucina, como tiaisoleucina e isoleucina hidroxamato, e mutantes apresentando adicionalmente resistência a etionina DL e/ou arginina hidroxamato (JP 5-130882 A). Adicionalmente, também é possível usar cepas recombinantes transformadas com genes que codificam proteínas envolvidas na biossíntese da L-isoleucina, como treonina desaminase e acetoidroxato sintase, como cepas parentais (JP 2-458 A, FR 0356739, e Patente dos Estados Unidos nº 5.998.178).

Bactérias produtoras de L-metionina

Exemplos de bactérias produtoras de L-metionina e cepas parentais para derivar bactérias produtoras de L-metionina incluem, mas sem limitação, cepa mutante auxotrófica para L-treonina e cepa mutante resistente

a norleucina (JP 2000-139471 A). Adicionalmente, uma cepa deficiente de repressor de metionina e cepas recombinantes transformadas com genes que codificam proteínas envolvidas na biossíntese da L-metionina, como homoserina transsuccinilase e cistationina γ -sintase (JP 2000-139471 A) também podem ser usadas como cepas parentais.

2. Método

Métodos exemplares de acordo com o objeto presentemente revelado incluem a produção de um L-aminoácido por meio do cultivo da bactéria de acordo com o objeto presentemente revelado em um meio de cultura para produzir e excretar o L-aminoácido no meio, e recolher o L-aminoácido do meio.

O cultivo, coleta, e purificação de um L-aminoácido do meio e análogos pode ser realizado de uma maneira similar a métodos de fermentação convencionais em que um aminoácido é produzido usando-se uma bactéria.

O meio selecionado para a cultura pode ser um meio sintético ou um meio natural, desde que o meio inclua uma fonte de carbono e uma fonte de nitrogênio e minerais e, se necessário, quantidades apropriadas de nutrientes que a bactéria selecionada requer para o crescimento. A fonte de carbono pode incluir vários carboidratos, como glicose e sacarose, e vários ácidos orgânicos. Dependendo do modo de assimilação do microorganismo usado é possível usar álcool, incluindo etanol e glicerol. Como a fonte de nitrogênio, é possível usar vários sais de amônio, como amônia e sulfato de amônio, outros compostos de nitrogênio, como aminas, uma fonte de nitrogênio natural, como peptona, hidrolisado de soja, e microorganismo fermentativo digerido. Como minerais, é possível usar monofosfato de potássio, sulfato de magnésio, cloreto de sódio, sulfato ferroso, sulfato de manganês, cloreto de cálcio, e análogos. Como vitaminas é possível usar tiamina, extrato de levedura, e análogos.

O cultivo pode ser realizado em condições aeróbicas, como por meio de sacudimento e/ou agitação com aeração, a uma temperatura de 20 a 40 °C, ou em outro exemplo, de 30 a 38 °C. O pH da cultura é usualmente entre 5 e 9, ou em outro exemplo, entre 6,5 e 7,2. O pH da cultura pode ser ajustado com amônia, carbonato de cálcio, vários ácidos, várias bases, e tamponadores. usualmente, um cultivo de 1 a 5 dias leva ao acúmulo do L-aminoácido que é alvo no meio líquido.

Após o cultivo, é possível remover sólidos, como células, do meio líquido por meio de centrifugação ou filtração por membrana, e então o L-aminoácido pode ser recolhido e purificado por meio de troca de íon, concentração, e/ou métodos de cristalização.

Exemplos

A presente invenção será explicada abaixo mais concretamente com referência aos exemplos não-limitantes a seguir.

Exemplo 1. Construção da cepa de *E. coli* MG1655::P_{L-tac}bssR.

A cepa de *E. coli* MG1655::P_{L-tac}bssR foi obtida por meio de substituição da região promotora nativa do gene *bssR* na cepa MG1655 por meio do promotor P_{L-tac}.

Para substituir a região promotora nativa do gene *bssR*, o fragmento de DNA que porta um promotor P_{L-tac} e marcador de resistência ao cloranfenicol (Cm^R) codificado pelo gene *cat* foi integrado no cromossomo do *E. coli* MG1655 em lugar da região promotora nativa por meio do método descrito por Datsenko K.A. e Wanner B.L. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97, 6640-6645), que também é denominado “integração mediada com vermelho [*Red-mediated integration*]” e/ou “integração impelida com vermelho [*Red-driven integration*]”.

O fragmento do conjunto promotor P_{L-tac} com o gene *cat* foi obtido por meio de PCR usando DNA cromossômico da cepa de *E. coli* MG1655P_{L-tac}xylE (WO2006/043730) como um modelo. A sequência de

nucleotídeos do promotor P_{L-tac} é apresentada na listagem de sequências (SEQ ID NO: 3). Os iniciadores P1 (SEQ ID NO: 4) e P2 (SEQ ID NO: 5) foram usados para amplificação com PCR. O iniciador P1 contém 36 nucleotídeos complementares à região localizada 166 bp [pares de bases] a montante do códon *start* [n.t.: *sequência de iniciação de tradução*] do gene *bssR* introduzido no iniciador para integração adicional no cromossomo bacteriano e o iniciador P2 contém 36 nucleotídeos idênticos à sequência a 5' do gene *bssR*.

PCR foi proporcionada usando o amplificador “Gene Amp PCR System 2700” (Applied Biosystems). A mistura de reação (volume total - 50 μ l) consistiu de 5 μ l de 10x tamponador de PCR com 15 mM de $MgCl_2$ (“Fermentas”, Lithuania), 200 μ M cada de dNTP, 25 pmol cada dos iniciadores explorados e 1 U de Taq-polimerase (“Fermentas”, Lithuania). Aproximadamente 20 ng do DNA genômico de *E.coli* MG1655 P_{L-tac} xyle foram adicionados nas misturas de reação como um modelo para PCR.

O perfil de temperaturas foi o seguinte: desnaturação de DNA inicial durante 5 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 30 s, recombinação a 54 °C durante 30 s, alongamento a 72 °C durante 1,5 min e o alongamento final durante 5 min a 72 °C. Em seguida, o fragmento de DNA amplificado foi purificado por meio de gel de agarose-eletroforese, extraído usando “GenElute Spin Columns” (“Sigma”, E.U.A.) e precipitado com etanol. O fragmento de DNA obtido foi usado para eletroporação e integração mediada com vermelho no cromossomo bacteriano de *E. coli* MG1655/pKD46. O plasmídeo pKD46 (Datsenko, K.A. e Wanner, B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97:12:6640-45) contém uma origem de replicação sensível a temperatura, e inclui um fragmento de DNA com 2.154 nucleotídeos de fago λ (posições de nucleotídeos de 31088 a 33241, nº de acesso GenBank J02459), e também os genes do sistema de recombinação homóloga λ Red (genes *exo*, γ , β), que estão sob o controle do promotor P_{araB}

induzível com arabinose. O plasmídeo pKD46 é necessário para integração do produto de PCR no cromossomo da cepa MG1655. A cepa MG1655 pode ser obtida da American Type Culture Collection. (P.O. Box 1549 Manassas, VA 20108, E.U.A.).

5 Células MG1655/pKD46 foram desenvolvidas de um dia para o outro a 30 °C no meio LB líquido com a adição de ampicilina (100 µg/ml), depois diluídas a 1:100 com o meio SOB (Extrato de levedura, 5 g/l; NaCl, 0,5 g/l; Triptona, 20 g/l; KCl, 2,5 mM; MgCl₂, 10 mM) com a adição de ampicilina (100 µg/ml) e L-arabinose (10 mM) (arabinose é usada para
10 induzir os genes codificantes do plasmídeo no sistema Red) e desenvolvidos a 30 °C para atingir a densidade óptica da cultura bacteriana OD₆₀₀=0,4-0,7. Células desenvolvidas de 10 ml da cultura bacteriana foram lavadas 3 vezes com a água deionizada gelada, seguido de suspensão em 100 µl da água. Adicionou-se 10 µl de fragmento de DNA (100 ng) dissolvidos na água
15 deionizada à suspensão de células. A eletroporação foi realizada com eletroporador “Bio-Rad” (E.U.A.) (nº 165-2098, versão 2-89) de acordo com as instruções do fabricante. Células submetidas a choque foram adicionadas a 1 ml de meio SOC (Sambrook *et al*, “Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition”, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)),
20 incubado durante 2 horas a 37 °C, e então foram espalhadas sobre agar L contendo 25 µg/ml de cloranfenicol. Colônias que se desenvolveram dentro de 24 horas foram testadas quanto à presença do marcador Cm^R, em lugar da região promotora nativa do gene *bssR* por meio de PCR usando-se iniciadores P3 (SEQ ID NO: 6) e P4 (SEQ ID NO: 7). Para tal fim, uma colônia
25 recentemente isolada foi suspensa em 20 µl de água e então usou-se 1 µl da suspensão obtida para PCR. Usou-se o perfil de temperatura a seguir: desnaturação de DNA inicial durante 10 min a 95 °C; depois 30 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 30 s, recombinação a 55 °C durante 30 s e alongamento a 72 °C durante 1 min; o alongamento final durante 7 min a 72

°C. Algumas poucas colônias Cm^R testadas continham o fragmento de DNA desejado com ~2000 bp, confirmando a presença do promotor P_{L-tac} e DNA marcador de Cm^R em lugar da região promotora nativa com 255 bp do gene *bssR*. Uma destas cepas foi curada do plasmídeo termossensível pKD46 por meio de cultivo a 37°C e a cepa resultante foi denominada *E. coli* MG1655 $P_{L-tac}bssR$.

Exemplo 2. Produção de L-arginina por meio de *E. coli* 382 $P_{L-tac}bssR$

Para testar o efeito da expressão acentuada do gene *bssR* que se encontra sob o controle do promotor P_{L-tac} sobre a produção de arginina, fragmentos de DNA do cromossomo da assim descrita *E. coli* MG1655 $P_{L-tac}bssR$ foram transferidos para a cepa 283 de *E. coli* produtora de arginina por meio de transdução de P1 (Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY). A cepa 382 foi depositado na Coleção Nacional Russa de Microorganismos Industriais [Russian National Collection of Industrial Microorganisms] (VKPM) (GNII genetika, 1 Dorozhny proezd, 1, Moscow 117545, Federação Russa) em 10 de abril de 2000 sob número de acesso VKPM B-7926.

Ambas as cepas, 382 e 382 $P_{L-tac}bssR$, foram cultivadas separadamente com agitação a 37 °C durante 18 horas em 3 ml de brodo de nutriente, e 0,3 ml das culturas foi inoculado em 2 ml de um meio de fermentação em tubos de teste de 20 x 200 mm em um agitador rotativo a 37 °C durante 48 horas.

Após o cultivo, a quantidade de L-arginina que havia se acumulado no meio foi determinada por meio de cromatografia em papel usando-se a fase móvel a seguir: butanol:ácido acético:água = 4 : 1 : 1 (v/v). Usou-se uma solução de ninidrina (2 %) em acetona como um reagente de visualização. Recortou-se um ponto [*spot*] contendo L-arginina, a L-arginina foi eluiu com solução em água a 0,5 % de CdCl_2 , e a quantidade de L-arginina foi estimada espectrofotometricamente a 540 nm.

A composição do meio de fermentação (g/l) é como a seguir:

Glicose	48,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	35,0
KH ₂ PO ₄	2,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,0
Tiamina HCl	0,0002
Extrato de levedura	1,0
Isoleucina L	0,1
CaCO ₃	5,0

Glicose e sulfato de magnésio são esterilizados separadamente. CaCO₃ é esterilizado com calor seco a 180 °C durante 2 horas. O pH é ajustado em 7,0.

Os resultados das fermentações em tubo de ensaio são mostradas na Tabela 1. Como se pode ver na Tabela 1, a cepa 382 P_{l-tac}bssR com expressão acentuada do gene *bssR* foi capaz de produzir uma maior quantidade de acúmulo de L-arginina em comparação com a cepa 283 de *E. coli* parental produtora de L-arginina.

Tabela 1

Cepa	Quantidade de L-arginina, g/l
	37°C
382 (controle)	6,2±0,1
382 P _{l-tac} <i>bssR</i>	8,1±0,1

Exemplo 3. Produção de L-treonina pela cepa de *E. coli* B-3996 P_{l-tac}bssR

Para testar o efeito de acentuar a expressão do gene *bssR* sobre a produção de treonina, os fragmentos de DNA do cromossomo de *E. coli* MG1655 P_{l-tac}bssR como descrito acima podem ser transferidos para a cepa *E. coli* VKPM B-3996 produtora de treonina por meio de transdução de P1 (Miller, J.H. *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1972, Plainview, NY) para se obter B-3996 P_{l-tac}bssR. A cepa B-3996 foi depositada em 19 de novembro de 1987 no *All-Union Scientific Center of Antibiotics* (Russia, 117105 Moscow, Nagatinskaya Street, 3-A) sob o número de acesso RIA 1867. A cepa também foi depositada na Coleção Nacional Russa de Microorganismos Industriais [*Russian National Collection of*

Industrial Microorganisms] (VKPM) (GNII genetika, 1 Dorozhny proezd, 1, Moscow 117545, Federação Russa) sob o número de acesso B-3996.

Ambas as cepas de *E. coli*, B-3996 e B-3996 P_{I-tac}bssR, podem ser desenvolvidas durante 18-24 horas a 37 °C em placas de L-agar. Para se obter uma cultura de sementes, as cepas podem ser desenvolvidas em um agitador rotativo (250 rpm) a 32 °C durante 18 horas em tubos de ensaio de 20x200 mm contendo 2 ml de brodo L suplementada com glicose a 4 %. Em seguida, o meio de fermentação pode ser inoculado com 0,21 ml (10 %) de material de semente. A fermentação pode ser realizada em 2 ml de meio mínimo para fermentação em tubos de ensaio de 20x200 mm. Células podem ser desenvolvidas durante 65 horas a 32 °C com agitação a 250 rpm.

Após o cultivo, a quantidade de L-treonina, que havia se acumulado no meio, pode ser determinada por meio de cromatografia em papel usando-se a fase móvel a seguir: butanol-ácido acético-água = 4 : 1 : 1 (v/v). Usou-se uma solução de ninidrina (2 %) em acetona como um reagente de visualização. É possível recortar um ponto contendo L-treonina, L-treonina pode ser eluída com solução de CdCl₂ em água a 0,5 %, e a quantidade de L-treonina pode ser estimada espectrofotometricamente a 540 nm.

A composição do meio de fermentação (g/l) é como a seguir:

Glicose	80,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	22,0
NaCl	0,8
KH ₂ PO ₄	2,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,8
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,02
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0,02
Tiamina HCl	0,0002
Extrato de levedura	1,0
CaCO ₃	30,0

Glicose e sulfato de magnésio são esterilizados separadamente. CaCO_3 é esterilizado por meio de calor seco a 180 °C durante 2 horas. O pH é ajustado em 7,0. O antibiótico é introduzido no meio após esterilização.

Exemplo 4. Produção de L-lisina por meio de *E. coli* AJ11442

5 P_{l-tac}bssR

Para testar o efeito da acentuação da expressão do gene *bssR* sobre a produção de lisina, os fragmentos de DNA do cromossomo da cepa de *E. coli* MG1655 P_{l-tac}bssR descrita acima podem ser transferidos para a cepa de *E. coli* AJ11442 produtora de lisina por meio de transdução de P1 (Miller, J.H. 10 *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1972, Plainview, NY) para se obter a cepa AJ11442 P_{l-tac}bssR. A cepa AJ11442 foi depositada no *National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science e Technology* (correntemente *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism* 15 *Depository*, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japão) em 1 de maio de 1981 e recebeu um número de acesso de FERM P-5084. Em seguida, isto foi convertido a um depósito internacional sob as provisões do Tratado de Budapeste em 29 de outubro de 1987, e recebeu um número de acesso de FERM BP-1543.

20 Ambas as cepas de *E. coli*, AJ11442 e AJ11442 P_{l-tac}bssR, podem ser cultivadas em meio L a 37 °C, e 0,3 ml da cultura obtida pode ser inoculado em 20 ml do meio de fermentação contendo as drogas requeridas em um frasco de 500 ml. O cultivo pode ser realizado a 37 °C durante 16 h com o uso de um agitador recíprocante na velocidade de agitação de 115 rpm. Após o cultivo, as 25 quantidades de L-lisina e glicose residual no meio podem ser medidas por meio de um método conhecido (Biotech-analyzer AS210 fabricado pela Sakura Seiki Co.). Em seguida, o rendimento da L-lisina pode ser calculado relativamente à glicose consumida para cada uma das cepas.

A composição do meio de fermentação (g/l) é como a seguir:

Glicose	40
(NH ₄) ₂ SO ₄	24
K ₂ HPO ₄	1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,0
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0,01
Extrato de levedura	2,0

O pH é ajustado em 7,0 com KOH e o meio é autoclavado a 115 °C durante 10 min. Glicose e MgSO₄·7H₂O são esterilizadas separadamente. CaCO₃ é esterilizado com calor seco a 180 °C durante 2 horas e adicionado ao meio para uma concentração final de 30 g/l.

5 Exemplo 5. Produção de L-cisteína pela cepa de *E. coli* JM15(ydeD) P_{l-tac}bssR

Para testar o efeito da acentuação da expressão do gene *bssR* sobre a produção de L-cisteína, os fragmentos de DNA do cromossomo da acima descrita *E. coli* MG1655 P_{l-tac}bssR podem ser transferidos para a cepa
10 JM15(ydeD) de *E. coli* produtora de L-cisteína por meio de transdução de P1 (Miller, J.H. *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1972, Plainview, NY) para se obter a cepa JM15(ydeD) P_{l-tac}bssR.

A cepa de *E. coli* JM15(ydeD) é um derivado da cepa de *E. coli* JM15 (Patente dos Estados Unidos nº 6.218.168) que pode ser
15 transformada com DNA apresentando o gene *ydeD*, que codifica para uma proteína de membrana, e não está envolvida em uma via biossintética de qualquer L-aminoácido (Patente dos Estados Unidos nº 5.972.663). A cepa JM15 (CGSC# 5042) pode ser obtida da *The Coli Genetic Stock Collection* no E.coli Genetic Resource Center, MCD Biology Department, Yale University
20 (<http://cgsc.biology.yale.edu/>).

As condições de fermentação para avaliação da produção de L-cisteína foram descritas detalhadaente no Exemplo 6 da Patente dos Estados

Unidos nº 6.218.168.

Exemplo 6. Produção de L-leucina por meio de *E. coli* 57 P_{l-tac} $bssR$

Para testar o efeito da acentuação da expressão do gene *bssR* sobre a produção de L-leucina, os fragmentos de DNA do cromossomo da acima descrita cepa de *E. coli* MG1655 P_{l-tac} $bssR$ podem ser transferidos para a cepa 57 de *E. coli* produtora de L-leucina (VKPM B-7386, Patente dos Estados Unidos nº 6.124.121) por meio de transdução de P1 (Miller, J.H. *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1972, Plainview, NY) para se obter a cepa 57 P_{l-tac} $bssR$. A cepa 57 foi depositada na Coleção Nacional Russa de Microorganismos Industriais [*Russian National Collection of Industrial Microorganisms*] (VKPM) (GNII genetika, 1 Dorozhny proezd, 1, Moscow 117545, Federação Russa) em 19 de maio de 1997 sob número de acesso VKPM B-7386.

Ambas as cepas de *E. coli*, 57 e 57 P_{l-tac} $bssR$, podem ser cultivadas durante 18-24 horas a 37 °C em placas de agar L. Para obter uma cultura de sementes, as cepas podem ser desenvolvidas em um agitador rotativo (250 rpm) a 32 °C durante 18 horas em tubos de ensaio de 20x200 mm contendo 2 ml de brodo L suplementado com 4 % de sacarose. Em seguida, o meio de fermentação pode ser inoculado com 0,21 ml de material de semente (10 %). A fermentação pode ser realizada em 2 ml de um meio de fermentação mínimo em tubos de ensaio de 20x200 mm. Células podem ser desenvolvidas durante 48-72 horas a 32 °C com agitação a 250 rpm. A quantidade de L-leucina pode ser medida por meio de cromatografia em papel (composição da fase líquida: butanol-ácido acético-água = 4:1:1).

A composição do meio de fermentação (g/l) (pH 7.2) é como a seguir:

Glicose	60,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	25,0

K ₂ HPO ₄	2,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,0
Tiamina	0,01
CaCO ₃	25,0

Glicose e CaCO₃ são esterilizadas separadamente.

Exemplo 7. Produção de L-histidina pela cepa de *E. coli* 80 P_{l-tac}bssR

Para testar o efeito da acentuação da expressão do gene *bssR* sobre a produção de L-histidina, os fragmentos de DNA do cromossomo da
 5 acima descrita *E. coli* MG1655 P_{l-tac}bssR podem ser transferidos para a cepa 89 de *E. coli* produtora de histidina por meio de transdução de P1 (Miller, J.H. *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1972, Plainview, NY) para se obter a cepa 80 P_{l-tac}bssR. A cepa 80 foi descrita na Patente Russa 2119536 e depositada na Coleção Nacional Russa de
 10 Microorganismos Industriais [*Russian National Collection of Industrial Microorganisms*] (GNII genetika, 1 Dorozhny proezd, 1, Moscow 117545, Federação Russa) em 15 de outubro de 1999 sob número de acesso VRPM B-7270 e então convertida em um depósito sob o Tratado de Budapeste em 12 de julho de 2004.

15 Ambas as cepas de *E. coli*, 80 e 80 P_{l-tac}bssR, podem, cada uma, ser cultivadas em brodo L durante 6 h a 29 °C. Em seguida, 0,1 ml da cultura obtida pode ser inoculado em 2 ml de meio de fermentação em um tubo de ensaio de 20x200 mm e cultivado durante 65 horas a 29 °C com agitação em um agitador rotativo (350 rpm). Após o cultivo, a quantidade de
 20 histidina que se acumula no meio pode ser determinada por meio de cromatografia em papel. O papel pode ser revelado com uma fase móvel consistindo de n-butanol:ácido acético:água = 4 : 1 : 1 (v/v). Uma solução de ninidrina (0,5 %) em acetona pode ser usada como um reagente de visualização.

25 A composição do meio de fermentação (g/l) é como a seguir

(pH 6,0):

Glicose	100,0
Mameno (hidrolisado de soja)	0,2 de como nitrogênio total
L-prolina	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	25,0
KH ₂ PO ₄	2,0
MgSO ₄ 7H ₂ O	1,0
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,01
MnSO ₄	0,01
Tiamina	0,001
Betaína	2,0
CaCO ₃	60,0

Glicose, prolina, betaína e CaCO₃ são esterilizados separadamente. O pH é ajustado em 6,0 antes da esterilização.

Exemplo 8. Produção de L-ácido glutâmico pela cepa de *E.*

5 *coli* VL334thrC⁺ P_{l-tac}bssR

Para testar o efeito da acentuação da expressão do gene *bssR* sobre o L-ácido glutâmico produção, os fragmentos de DNA do cromossomo da acima descrita cepa de *E. coli* MG1655 P_{l-tac}bssR podem ser transferidos para a cepa VL334thrC⁺ de *E. coli* produtora de L-ácido glutâmico (EP 10 1172433) por meio de transdução de P1 (Miller, J.H. *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1972, Plainview, NY) para se obter a cepa VL334thrC⁺-P_{l-tac}bssR. A cepa VL334thrC⁺ foi depositada na Coleção Nacional Russa de Microorganismos Industriais [Russian National Collection of Industrial Microorganisms] (VKPM) (GNII 15 genetika, 1 Dorozhny proezd, 1, Moscow 117545, Federação Russa) em 6 de dezembro de 2004 sob o número de acesso VKPM B-8961 e então convertida em um depósito internacional sob o Tratado de Budapeste em 8 de dezembro

de 2004.

Ambas as cepas, VL334thrC⁺ e VL334thrC⁺ P_{l-tac}bssR, podem ser desenvolvidas durante 18-24 horas a 37 °C sobre placas de agar L. Em seguida, uma alça das células pode ser transferida para tubos de ensaio contendo 2 ml de meio de fermentação. O meio de fermentação contém glicose (60g/l), sulfato de amônio (25 g/l), KH₂PO₄ (2g/l), MgSO₄ (1 g/l), tiamina (0,1 mg/ml), L-isoleucina (70 µg/ml), e CaCO₃ (25 g/l). O pH é ajustado em 7,2. Glicose e CaCO₃ são esterilizados separadamente. O cultivo pode ser realizado a 30 °C durante 3 dias com agitação. Após o cultivo, a quantidade de L-ácido glutâmico que é produzida pode ser determinada por meio de cromatografia em papel (composição da fase líquida de butanol-ácido acético-água = 4:1:1) com manchamento subsequente por meio de ninidrina (solução a 1 % em acetona) e eluição adicional dos compostos em 50 % de etanol com 0,5 % de CdCl₂.

Exemplo 9. Produção de L-fenilalanina pela cepa de *E. coli* AJ12739 P_{l-tac}bssR

Para testar o efeito da acentuação da expressão do gene *bssR* sobre a produção de L-fenilalanina, os fragmentos de DNA do cromossomo da acima descrita *E. coli* MG1655 P_{l-tac}bssR podem ser transferidos para a cepa AJ12739 de *E. coli* produtora de fenilalanina por meio de transdução de P1 (Miller, J.H. *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1972, Plainview, NY) para se obter a cepa AJ12739 P_{l-tac}bssR. A cepa AJ12739 foi depositado na Coleção Nacional Russa de Microorganismos Industriais [*Russian National Collection of Industrial Microorganisms*] (VKPM) (GNII genetika, 1 Dorozhny proezd, 1, Moscow 117545, Federação Russa) em 6 de novembro de 2001 sob número de acesso nº VKPM B-8197 e então convertida em um depósito sob o Tratado de Budapeste em 23 de agosto de 2002.

Ambas as cepas, AJ12739 e AJ12739 P_{l-tac}bssR, podem ser

cultivadas a 37 °C durante 18 horas em um brodo de nutriente, e 0,3 ml da cultura obtida pode ser, cada uma inoculado em 3 ml de um meio de fermentação em um tubo de ensaio de 20x200 mm e cultivadas a 37 °C durante 48 horas com agitação em um agitador rotativo. Após o cultivo, a quantidade de fenilalanina que se acumula no meio pode ser determinada por meio de TLC. As placas de TLC com 10x15 cm revestidas com camadas de 0,11 mm do sílica-gel Sorbfil não contendo indicador fluorescente (Stock Company Sorbpolymer, Krasnodar, Russia) podem ser usadas. As placas Sorbfil podem ser reveladas com um fase móvel consistindo de propan-2-ol : etilacetato : 25 % de amônia aquosa : água = 40 : 40 : 7 : 16 (v/v). Uma solução de ninidrina (2 %) em acetona pode ser usada como um reagente de visualização.

A composição do meio de fermentação (g/l) é como a seguir:

Glicose	40,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	16,0
K ₂ HPO ₄	0,1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,0
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0,01
Tiamina HCl	0,0002
Extrato de levedura	2,0
Tirosina	0,125
CaCO ₃	20,0

Glicose e sulfato de magnésio são esterilizados separadamente. CaCO₃ é esterilizado com calor seco a 180 °C durante 2 horas. O pH é ajustado em 7,0.

Exemplo 10. Produção de L-triptofano pela cepa de *E. coli* SV164 (pGH5) P_{L-tac}bssR

Para testar o efeito da acentuação da expressão do gene *bssR* sobre a produção de L-triptofano, os fragmentos de DNA do cromossomo da acima

descrita cepa de *E. coli* MG1655 $P_{l-tac}bssR$ podem ser transferidos para a cepa SV164 de *E. coli* produtora de triptofano (pGH5) por meio de transdução de P1 (Miller, J.H. *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1972, Plainview, NY) para ser obter a cepa SV164(pGH5) $P_{l-tac}bssR$. A

5 cepa SV164 foi obtida introduzindo-se o alelo *trpE* que codifica antranilato sintase livre de inibição de feedback por triptofano em uma cepa deficiente de *trpE*, *E. coli* KB862 (DSM7196) (WO94/08031, Divulgação de Patente Japonesa nº 7-507693). O plasmídeo pGH5 abriga um gene *serA* mutante que codifica fosfoglicerato desidrogenase livre de inibição de feedback por serina. A

10 cepa SV164 (pGH5) foi descrita detalhadamente na Patente dos Estados Unidos nº 6.180.373 ou Patente Européia 0662143. A cepa KB862 foi denominada AJ13828 e foi depositado em 21 de dezembro de 2000 no *National Institute of Bioscience and Human Technology of Agency of Industrial Science and Technology* (correntemente agência administrativa independente, *National*

15 *Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary*, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japan) como um depósito internacional sob as provisões do Tratado de Budapeste com um número de depósito de FERM BP-7405.

Ambas as cepas, SV164(pGH5) e SV164(pGH5) $P_{l-tac}bssR$,

20 podem ser cultivadas com agitação a 32 °C durante 18 horas em 3 ml de brodo de nutriente suplementado com tetraciclina (10 mg/ml, marcador do plasmídeo pGH5). As culturas obtidas (0,3 ml cada um) podem ser inoculadas em 3 ml de um meio de fermentação contendo tetraciclina (10 mg/ml) em tubos de ensaio de 20 x 200 mm, e cultivadas a 32 °C durante 72 horas com

25 um agitador rotativo a 250 rpm. Após o cultivo, a quantidade de triptofano que se acumula no meio pode ser determinada por meio de TLC como descrito no Exemplo 9.

Os componentes do meio de fermentação encontram-se listados na Tabela 2, mas deveriam ser esterilizados em grupos separados (A, B, C, D, E, F,

G e H), como mostrado, para evitar interações adversas durante a esterilização.

Tabela 2

Soluções	Componente	Concentração final, g/l
A	KH ₂ PO ₄	1,5
	NaCl	0,5
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5
	L-Metionina	0,05
	L-Fenilalanina	0,1
	L-Tirosina	0,1
	Mameno (N total)	0,07
B	Glicose	40,0
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,3
C	CaCl ₂	0,011
D	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,075
	Citrato de sódio	1,0
E	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,00015
	H ₃ BO ₃	0,0025
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,00007
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,00025
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,0016
	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	0,0003
F	Tiamina HCl	0,005
G	CaCO ₃	30,0
H	Piridoxina	0,03

O pH da solução A é ajustado em 7,1 com NH₄OH.

Exemplo 11. Produção de L-prolina pela cepa de *E. coli*

5 702ilvA P_{l-tac}bssR

Para testar o efeito da acentuação da expressão do gene *bssR* sobre a produção de L-prolina, os fragmentos de DNA do cromossomo da acima descrita cepa de *E. coli* MG1655 P_{l-tac}bssR podem ser transferidos para a cepa 702ilvA de *E. coli* produtora de prolina por meio de transdução de P1 (Miller, J.H. *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1972, Plainview, NY) para se obter a cepa 702ilvA P_{l-tac}bssR. A cepa 702ilvA foi depositado na Coleção Nacional Russa de Microorganismos Industriais [*Russian National Collection of Industrial Microorganisms*] (VKPM) (GNII genetika, 1 Dorozhny proezd, 1, Moscow 117545, Federação Russa) em 18 de julho de 2000 sob número de acesso VKPM B-8012 e então convertida em um depósito internacional sob o Tratado de Budapeste em 18

de maio de 2001.

Ambas as cepas de *E. coli*, 702ilvA e 702ilvA P_{l-tac}bssR, podem ser desenvolvidas durante 18-24 horas a 37 °C em placas de agar L. Em seguida, estas cepas podem ser cultivadas nas mesmas condições que no Exemplo 8.

Exemplo 12. Produção de L-citrulina pela cepa de *E. coli* 382ΔargG P_{l-tac}bssR.

Para testar o efeito da acentuação da expressão do gene *bssR* sobre a produção de L-citrulina, os fragmentos de DNA do cromossomo da acima descrita cepa de *E. coli* MG1655 P_{l-tac}bssR podem ser transferidos para a cepa 382ΔargG de *E. coli* produtora de L-citrulina por meio de transdução de P1 (Miller, J.H. *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1972, Plainview, NY) para se obter a cepa 382ΔargG P_{l-tac}bssR. A cepa 382ΔargG pode ser obtida por meio de deleção do gene *argG* no cromossomo de 382 cepa (VKPM B-7926) por meio do método inicialmente desenvolvido por Datsenko, K.A. e Wanner, B.L. denominado “integração impelida ao vermelho” (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97(12), 6640-6645). De acordo com este procedimento é possível construir os iniciadores de PCR homólogos tanto à região adjacente ao gene *argG* e ao gene que confere resistência a antibiótico no plasmídeo modelo. O plasmídeo pMW118-attL-Cm-attR (WO 05/010175) pode ser usado como o modelo na reação PCR.

Ambas as cepas de *E. coli*, 382ΔargG e 382ΔargG P_{l-tac}bssR, podem ser cultivadas separadamente com agitação a 37 °C durante 18 horas em 3 ml de brodo de nutriente, e 0,3 ml das culturas obtidas foi inoculado em 2 ml de um meio de fermentação em tubos de ensaio de 20 x 200 mm e cultivado a 32 °C durante 48 horas em um agitador rotativo.

Após o cultivo, a quantidade de citrulina que se acumula no meio pode ser determinada por meio de cromatografia em papel usando-se a fase móvel a seguir: butanol:ácido acético:água = 4 : 1 : 1 (v/v). Uma solução

de ninidrina (2 %) em acetona pode ser usada como um reagente de visualização. É possível recortar um ponto contendo citrulina, a citrulina pode ser eluída com solução em água a 0,5 % de CdCl_2 , e a quantidade de citrulina pode ser estimada espectrofotometricamente a 540 nm.

5 A composição do meio de fermentação (g/l) pode ser como a seguir:

Glicose	48,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	35,0
KH_2PO_4	2,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0
Tiamina HCl	0,0002
Extrato de levedura	1,0
Isoleucina L	0,1
Arginina L	0,1
CaCO_3	5,0

Glicose e sulfato de magnésio são esterilizados separadamente. CaCO_3 é esterilizado com calor seco a 180 °C durante 2 horas. O pH é ajustado em 7,0.

Exemplo 13. Produção de L-ornitina pela cepa de *E. coli* 382 Δ argF Δ argI P_{l-tac} bssR.

10 Para testar o efeito da acentuação da expressão do gene *bssR* sobre a produção de L-ornitina, os fragmentos de DNA do cromossomo da acima descrita cepa de *E. coli* MG1655 P_{l-tac} bssR podem ser transferidos para a cepa 382 Δ argF Δ argI de *E. coli* produtora de L-ornitina por meio de transdução de P1 (Miller, J.H. *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1972, Plainview, NY) para se obter a cepa 15 382 Δ argF Δ argI P_{l-tac} bssR. A cepa 382 Δ argF Δ argI pode ser obtido por meio de deleção consecutiva de genes *argF* e *argI* no cromossomo da cepa 382 (VKPM B-7926) por meio do método inicialmente desenvolvido por Datsenko, K.A. e Wanner, B.L. denominado “integração impelida ao 20 vermelho” (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97(12), 6640-6645). De acordo

com este procedimento, é possível construir dois pares de iniciadores de PCR homólogos tanto à região adjacente ao gene *argF* ou *argI* e ao gene que confere resistência a antibiótico no plasmídeo modelo. O plasmídeo pMW118-attL-Cm-attR (WO 05/010175) pode ser usado como o modelo na reação PCR.

Ambas as cepas de *E. coli*, 382 Δ argF Δ argI e 382 Δ argF Δ argI P_{tac}bssR, can be separadamente cultivated com agitação a 37 °C durante 18 horas em 3 ml de brodo de nutriente, e 0,3 ml das culturas obtidas foi incubado em 2 ml de a meio de fermentação em tubos de ensaio de 20 x 200 mm e cultivado a 32 °C durante 48 horas em um agitador rotativo.

Após o cultivo, a quantidade de ornitina que se acumula no meio pode ser determinada por meio de cromatografia em papel usando-se a fase móvel a seguir: butanol:ácido acético:água = 4 : 1 : 1 (v/v). Uma solução de ninidrina (2 %) em acetona pode ser usada como um reagente de visualização. É possível recortar um ponto contendo ornitina, ornitina pode ser eluiu com solução em água a 0,5 % de CdCl₂, e a quantidade de ornitina pode ser estimada espectrofotometricamente a 540 nm.

A composição do meio de fermentação (g/l) pode ser como a seguir:

Glicose	48,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	35,0
KH ₂ PO ₄	2,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,0
Tiamina HCl	0,0002
Extrato de levedura	1,0
isoleucina L	0,1
arginina L	0,1
CaCO ₃	5,0

Glicose e sulfato de magnésio são esterilizados separadamente. CaCO₃ é esterilizado com calor seco a 180 °C durante 2 horas. O pH é ajustado em 7,0.

Exemplo 14. Produção de L-valina pela cepa de *E. coli* H-81 P_{l-tac}bssR

Para testar o efeito da acentuação da expressão do gene *bssR* sobre a produção de L-valina, os fragmentos de DNA do cromossomo da acima descrita cepa de *E. coli* MG1655 P_{l-tac}bssR podem ser transferidos para a cepa H-81 de *E. coli* produtora de valina por meio de transdução de P1 (Miller, J.H. *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1972, Plainview, NY) para se obter a cepa H-81 P_{l-tac}bssR. A cepa H-81 foi depositada na Coleção Nacional Russa de Microorganismos Industriais [*Russian National Collection of Industrial Microorganisms*] (VKPM) (GNII genetika, 1 Dorozhny proezd, 1, Moscow 117545, Federação Russa) em 30 de janeiro de 2001 sob o número de acesso VKPM B-8066, e em seguida foi convertida em um depósito internacional sob as provisões do Tratado de Budapeste em 1 de fevereiro de 2002.

As cepas H-81 e H-81 P_{l-tac}bssR podem ser cultivadas a 37 °C durante 18 horas em um brodo de nutriente e 0,1 ml de cada uma das culturas obtidas podem ser inoculadas em 2 ml de meio de fermentação em um tubo de ensaio de 20x200 mm e cultivadas a 32 °C durante 72 horas com um agitador rotativo. Após o cultivo durante 48 horas e durante 72 horas é possível medir com TLC quantidades acumuladas de L-valina. As placas de TLC de 10x15 cm com camadas de 0,11 mm de sílica-gel Sorbfil não contendo indicador fluorescente (Stock Company Sorbpolymer, Krasnodar, Russia) podem ser usadas. As placas de Sorbfil podem ser desenvolvidas com um fase móvel consistindo de propan-2-ol:etilacetato:25 % de amônia aquosa:água = 40 : 40 : 7 : 16 (v/v). Uma solução de ninidrina (2 %) em acetona pode ser usada como um reagente de visualização.

Composição do meio de fermentação (g/l):

Glicose	60,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	18,0
KH ₂ PO ₄	1,8

MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,2
CaCO ₃	20,0
Tiamina HCl	0,001

CaCO₃ é esterilizado com calor seco a 180 °C durante 2 horas. O pH é ajustado em 7,0.

Embora a invenção tenha sido descrita detalhadamente com referência a suas concretizações preferidas, alguém com prática na arte perceberá que é possível realizar várias modificações, e usar equivalentes, sem afastar-se do escopo da invenção. Todas as referências aqui indicadas são incorporadas como uma parte deste pedido, por referência.

Aplicabilidade industrial

De acordo com a presente invenção, é possível melhorar a produção de aminoácido L por uma bactéria da família *Enterobacteriaceae*.

REIVINDICAÇÕES

1. Bactéria produtora de L-aminoácido da família *Enterobacteriaceae*, caracterizada pelo fato de que referida bactéria foi modificada para acentuar a expressão do gene *bssR*.

5 2. Bactéria de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que referida expressão é acentuada modificando-se uma sequência de controle de expressão do gene *bssR*.

3. Bactéria de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que referida bactéria pertence ao gênero *Escherichia*.

10 4. Bactéria de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que referida bactéria é *Escherichia coli*.

5. Bactéria de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que referida bactéria pertence ao gênero *Pantoea*.

15 6. Bactéria produtora de L-aminoácido de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizada pelo fato de que referido L-aminoácido é selecionado do grupo que consiste de um L-aminoácido aromático e um L-aminoácido não-aromático.

20 7. Bactéria produtora de L-aminoácido de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que referido L-aminoácido aromático é selecionado do grupo que consiste de L-fenilalanina, L-tirosina, e L-triptofano.

25 8. Bactéria produtora de L-aminoácido de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que referido L-aminoácido não-aromático é selecionado do grupo que consiste de L-treonina, L-lisina, L-cisteína, L-metionina, L-leucina, L-isoleucina, L-valina, L-histidina, glicina, L-serina, L-alanina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-glutamina, L-ácido glutâmico, L-prolina, L-arginina, L-citrulina e L-ornitina.

9. Bactéria produtora de L-aminoácido de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizada pelo fato de que

referido L-aminoácido é L-arginina.

10. Método para produzir um L-aminoácido, caracterizado pelo fato de que compreende cultivar a bactéria como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 9 em um meio de cultura, e coletar referido L-aminoácido do meio.

11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que referido L-aminoácido é selecionado do grupo que consiste de um L-aminoácido aromático e um L-aminoácido não-aromático.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que referido L-aminoácido aromático é selecionado do grupo que consiste de L-fenilalanina, L-tirosina, e L-triptofano.

13. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que referido L-aminoácido não-aromático é selecionado do grupo que consiste de L-treonina, L-lisina, L-cisteína, L-metionina, L-leucina, L-isoleucina, L-valina, L-histidina, glicina, L-serina, L-alanina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-glutamina, L-ácido glutâmico, L-prolina, L-arginina, L-citrulina e L-ornitina.

14. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que referido L-aminoácido é L-arginina.

RESUMO

“BACTÉRIA PRODUTORA DE L-AMINOÁCIDO, E, MÉTODO PARA
PRODUZIR UM L-AMINOÁCIDO”

A presente invenção proporciona um método para produzir L-
5 aminoácido usando uma bactéria da família *Enterobacteriaceae*,
particularmente uma bactéria pertencente ao gênero *Escherichia* ou *Pantoea*,
que foi modificada para acentuar a expressão do gene *bssR* que codifica
regulador de biopelícula por meio de secreção de sinal.