

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

(21) **PI0606609-7 A2**



(22) Data de Depósito: 18/01/2006
(43) Data da Publicação: 16/03/2010
(RPI 2045)

(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/00 (2010.01)
C12N 1/00 (2010.01)
C12P 13/04 (2010.01)

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

(30) Prioridade Unionista: 19/01/2005 RU 2005101110

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

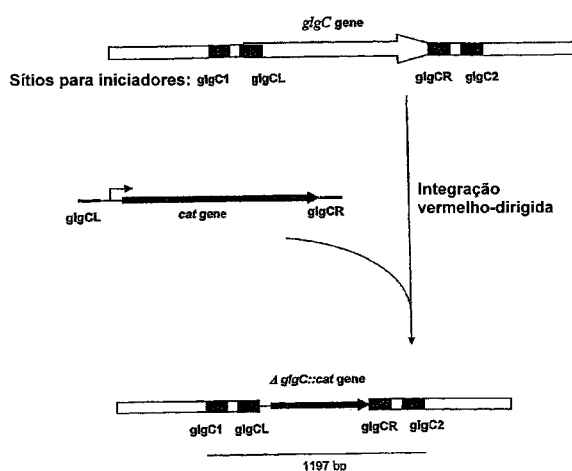
(72) Inventor(es): Ekaterina Aleksandrovna Slivinskaya, Elvira Borisovna Voroshilova, Konstantin Vyacheslavovich Rybak, Yury Ivanovich Kozlov

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

(86) Pedido Internacional: PCT JP2006301089 de 18/01/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/078050 de 27/07/2006

(57) Resumo: BACTÉRIA PRODUTORA DE L-AMINOÁCIDO DA FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEAE, E, MÉTODO PARA PRODUZIR L-AMINOÁCIDO. É fornecido um método para produzir um L-aminoácido usando uma bactéria da família Enterobacteriaceae, particularmente uma bactéria pertencendo ao gênero *Escherichia* ou *Pan toea*, tendo a via de biossíntese do glicogênio interrompida.



“BACTÉRIA PRODUTORA DE L-AMINOÁCIDO DA FAMÍLIA *ENTEROBACTERIACEAE*, E, MÉTODO PARA PRODUZIR L-AMINOÁCIDO”

Campo Técnico

5 A presente invenção se refere à indústria microbiológica, e especificamente a um método para produzir um L-aminoácido usando uma bactéria da família *Enterobacteriaceae*, em que a via de biossíntese do glicogênio foi interrompida.

Arte de Fundo

10 Glicogênio representa a principal forma de carbono armazenado para *Escherichia coli* e muitos outros procariotos, e fornece um substrato prontamente metabolizado para energia de manutenção. Acumulação de glicogênio em *Escherichia coli* é inversamente relacionada à taxa de crescimento e ocorre mais ativamente quando células entram na fase
15 estacionária. Os níveis das três enzimas biossintéticas passam por mudanças correspondentes sob estas condições, sugerindo que controle genético de biossíntese de enzimas pode responder por pelo menos parte da regulação (Preiss, J., Annu. Rev. Microbiol. 38, 419-458 (1984)). Em *Escherichia coli*, os genes estruturais para biossíntese de glicogênio são agrupados em operons
20 adjacentes – *glgBX* e *glgCAP*. Interessantemente, os genes biossintético (*glgCA*) e degradativo (*glgP*) de glicogênio são localizados juntos em um agrupamento, possivelmente para facilitar a regulação destes sistemas *in vivo* (Romeo, T., Gene. 70(2), 363-76 (1988)). O gene *glgC* é o gene estrutural para glicose-1-fosfato adenililtransferase. Sinônimos para glicose-1-fosfato
25 adenililtransferase são ADP-glicose sintase, ADP-glicose pirofosforilase, ADP: a-D-glicose-1-fosfato adenililtransferase, proteína GlgC.

Glicose-1-fosfato adenililtransferase (EC 2.7.7.27) é uma enzima alostérica na via biossintética do glicogênio de eubactérias. Entre as bactérias entéricas, glicose-1-fosfato adenililtransferase é regulada por

intermediários glicolíticos com frutose 1,6- bifosfato como o ativador e AMP, ADP, e P_i como inibidores. A enzima catalisa a síntese de ADP glicose e PP_i a partir de glicose 1-fosfato e ATP. Esta reação é a primeira etapa única em biossíntese bacteriana de glicogênio.

5 É conhecido que o sistema regulador de armazenamento de carbono de *Escherichia coli* controla a expressão de genes envolvidos em metabolismo de carboidrato e mobilidade celular. Ligação de CsrA a transcritos de *glgCAP* inibe metabolismo de glicogênio promovendo decaimento de mRNA de *glgCAP*. RNA de CsrB funciona como um
10 antagonista de CsrA sequestrando sua proteína e prevenindo sua ação (Baker, C.S. et al, Mol. Microbiol., 44(6), 1599-610 (2002)).

O operon *glgCAP* está sob o controle positivo de AMP cíclico (cAMP) e da proteína de receptor cAMP (CRP). Tanto o gene *cya* codificando adenilato ciclase (EC 4.6.1.1) como o gene *crp* codificando CRP
15 são requeridos para síntese ótima de glicogênio (Fletterick, R.J. and Madsen, N.B., Annu. Rev. Biochem., 49, 31-61 (1980)). CRP se liga a um sítio localizado anteriormente ao gene *glgC*. Síntese de glicogênio em *E. coli* também é positivamente regulada por ppGpp, que estimula a transcrição do operon *glgCAP* (Preiss, J., and Romeo, T., Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.
20 47, 299-329 (1994)).

Usando uma biblioteca cromossômica aleatória mini-Mu e selecionando por super-produção de glicogênio, um novo gene (*glgS*) envolvido em síntese de glicogênio foi identificado (Hengge-Aronis, R. and Fischer, D., Mol Microbiol. 6, 14, 1877-86 (1992)). Também foi mostrado
25 que a proteína GlgS de *Escherichia coli* é aumentada em resposta a estresse por inanição e foi mostrado que sua superexpressão estimula síntese de glicogênio (Kozlov, G. et al, BMC Biol., 2, 1, 10 (2004)).

O substrato inicial para biossíntese de glicólise é glicose-1-P, obtido a partir de glicose-6-P, de forma que dita via compete com glicólise

por glicose-6-P. Mas atualmente, não houveram relatos de inativar os operons *glgBX* e/ou *glgCAP* ou inativar o gene *glgS* para produzir L-aminoácidos.

Descrição da Invenção

Objetos da presente invenção incluem realçar a produtividade de cepas produzindo L-aminoácido e fornecer um método para produzir um L-aminoácido usando estas cepas.

Os objetos acima foram atingidos descobrindo que inativação dos operons *glgBX* e/ou *glgCAP* pode realçar produção de L-aminoácidos, tal como L-treonina, L-lisina, L-cisteína, L-leucina, L-histidina, L-ácido glutâmico, L-fenilalanina, L-triptofano, L-prolina, e L-arginina.

A presente invenção fornece uma bactéria da família *Enterobacteriaceae* tendo uma capacidade aumentada para produzir aminoácidos, tal como L-treonina, L-lisina, L-cisteína, L-leucina, L-histidina, L-ácido glutâmico, L-fenilalanina, L-triptofano, L-prolina, e L-arginina.

É um objeto da presente invenção fornecer uma bactéria produtora de L-aminoácido- da família *Enterobacteriaceae*, caracterizada pelo fato de que a bactéria foi modificada de forma que a via de biossíntese do glicogênio é interrompida.

É um objeto adicional da presente invenção fornecer a bactéria como descrito acima, caracterizada pelo fato de que a via de biossíntese do glicogênio é interrompida por atenuação de expressão dos operons *glgBX* e/ou *glgCAP*.

É um objeto adicional da presente invenção fornecer a bactéria como descrito acima, caracterizada pelo fato de que a via de biossíntese do glicogênio é interrompida por inativação dos operons *glgBX* e/ou *glgCAP*.

É um objeto adicional da presente invenção fornecer a bactéria como descrito acima, caracterizada pelo fato de que a inativação dos operons *glgBX* e/ou *glgCAP* é realizada por deleção de pelo menos um gene selecionado a partir de um grupo consistindo de *glgB*, *glgX*, *glgC* e *glgA*,

glgP, e combinações destes.

É um objeto adicional da presente invenção fornecer a bactéria como descrito acima, em que a via de biossíntese do glicogênio é interrompida por atenuação de expressão do gene *glgS*.

5 É um objeto adicional da presente invenção fornecer a bactéria como descrito acima, em que a via de biossíntese do glicogênio é interrompida por inativação do gene *glgS*.

É um objeto adicional da presente invenção fornecer a bactéria como descrito acima, em que a bactéria pertence ao gênero *Escherichia*.

10 É um objeto adicional da presente invenção fornecer a bactéria como descrito acima, em que a bactéria pertence ao gênero *Pantoea*.

É um objeto adicional da presente invenção fornecer a bactéria como descrito acima, em que dito L-aminoácido é selecionado a partir do grupo consistindo de um L-aminoácido aromático e um L-aminoácido não aromático.

É um objeto adicional da presente invenção fornecer a bactéria como descrito acima, em que dito L-aminoácido aromático é selecionado a partir do grupo consistindo de L-fenilalanina, L-tirosina, e L-triptofano.

20 É um objeto adicional da presente invenção fornecer a bactéria como descrito acima, em que dito L-aminoácido não aromático é selecionado a partir do grupo consistindo de L-treonina, L-lisina, L-cisteína, L-metionina, L-leucina, L-isoleucina, L-valina, L-histidina, L-glicina, L-serina, L-alanina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-glutamina, L-ácido glutâmico, L-prolina, e L-arginina.

25 É um objeto adicional da presente invenção fornecer a método para produzir um L-aminoácido compreendendo:

- cultivar a bactéria como descrito acima em um meio para produzir e excretar L-aminoácido no meio, e
- coletar dito L-aminoácido do meio.

É um objeto adicional da presente invenção fornecer o método como descrito acima, em que dito L-aminoácido é selecionado a partir do grupo consistindo de um L-aminoácido aromático e um L-aminoácido não aromático.

5 É um objeto adicional da presente invenção fornecer o método como descrito acima, em que dito L-aminoácido aromático é selecionado a partir do grupo consistindo de L-fenilalanina, L-tirosina, e L-triptofano.

É um objeto adicional da presente invenção fornecer o método como descrito acima, em que dito L-aminoácido não aromático é selecionado a partir do grupo consistindo de L-treonina, L-lisina, L-cisteína, L-metionina, 10 L-leucina, L-isoleucina, L-valina, L-histidina, L-glicina, L-serina, L-alanina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-glutamina, L-ácido glutâmico, L-prolina, e L-arginina.

Breve Descrição de Ilustrações

15 Figura 1 mostra as posições relativas de iniciadores glgCL e glgCR em plasmídeo pACYC184, que foram usadas para amplificação do gene *cat*.

Figura 2 mostra a construção do fragmento de DNA cromossômico contendo o gene *glgC* inativado.

20 Figura 3 mostra a construção do fragmento de DNA cromossômico contendo os operons *glgBX* e *glgCAP* inativados.

Descrição Detalhada das Formas de Realização Preferidas

A presente invenção é descrita em detalhe abaixo.

1. Bactéria da presente invenção

25 A bactéria da presente invenção é uma bactéria produtora de L-aminoácido da família *Enterobacteriaceae*, caracterizada pelo fato de que a bactéria foi modificada de forma que a via de biossíntese do glicogênio é interrompida.

Na presente invenção, “bactéria produtora de L-aminoácido”

significa uma bactéria que tem uma capacidade para produzir e excretar L-aminoácido em um meio, quando a bactéria é cultivada no meio.

O termo “bactéria produtora de L-aminoácido” como usado neste lugar também significa uma bactéria que é capaz de produzir e causar
 5 acumulação de um L-aminoácido em um meio de cultura em uma quantidade maior do que uma cepa tipo selvagem ou parental de *E. coli*, tal como *E. coli* K-12, e preferivelmente significa que o microorganismo é capaz de causar acumulação em um meio de uma quantidade não menor do que 0,5 g/L, mais preferivelmente não menor do que 1,0 g/L, do L-aminoácido alvo. O termo
 10 “L-aminoácidos” inclui L-alanina, L-arginina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-cisteína, L-ácido glutâmico, L-glutamina, L-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” compreende L-
 15 fenilalanina, L-tirosina, e L-triptofano. O termo “L-aminoácido não aromático” compreende L-treonina, L-lisina, L-cisteína, L-metionina, L-leucina, L-isoleucina, L-valina, L-histidina, L-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
 20 glutâmico, L-fenilalanina, L-triptofano, L-prolina e L-arginina são particularmente preferidos.

A família *Enterobacteriaceae* inclui bactérias pertencendo aos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Photorhabdus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Morganella*
 25 *Yersinia*, etc.. Especificamente, aquelas classificadas na *Enterobacteriaceae* de acordo com a taxonomia usada no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbinpost/Taxonomy/wgetorg?mode=Tree&id=1236&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock>) podem ser usadas. Uma bactéria

pertencendo ao gênero de *Escherichia* ou *Pantoea* é preferida.

A frase “uma bactéria pertencendo ao gênero *Escherichia*” significa que a bactéria é classificada no gênero *Escherichia* de acordo com a classificação conhecida por uma pessoa versada na arte de microbiologia.

5 Exemplos de uma bactéria pertencendo ao gênero *Escherichia* como usado na presente invenção incluem, mas não são limitados a, *Escherichia coli* (*E. coli*).

10 A bactéria pertencendo ao gênero *Escherichia* que pode ser usada na presente invenção não é particularmente limitada, entretanto por exemplo, bactérias descritas por Neidhardt, F.C. et al. (*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1208, Tabela 1) são abrangidas pela presente invenção.

15 A frase “uma bactéria pertencendo ao gênero *Pantoea*” significa que a bactéria é classificada no gênero *Pantoea* de acordo com a classificação conhecida por uma pessoa versada na arte de microbiologia. Algumas espécies de *Enterobacter agglomerans* foram recentemente re-classificadas em *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea stewartii* ou as semelhantes com base em análise de sequência de nucleotídeos de 16S rRNA, etc. (Int. J. Syst. Bacteriol., 43, 162-173 (1993)). Tais cepas são
20 abrangidas por “bactérias pertencendo ao gênero *Pantoea*”.

A frase “bactéria foi modificada para ter a via de biossíntese do glicogênio interrompida” significa que a bactéria foi modificada de uma maneira tal que a bactéria modificada tem uma capacidade reduzida para sintetizar glicogênio se comparado com uma bactéria não modificada ou é
25 incapaz de sintetizar e acumular glicogênio. Interrupção de via biossintética do glicogênio pode ser realizada por atenuação de expressão de genes codificando enzimas envolvidas em biossíntese de glicogênio, tal como GlgB, GlgX, GlgC, GlgA, GlgP, e GlgS, e é preferivelmente realizada por inativação de ditos genes.

A frase “atenuação de expressão dos operons *glgBX* e/ou *glgCAP*” ou “atenuação de expressão do gene *glgS*” significa que o operon ou gene alvo é modificado de uma maneira tal que o operon ou gene modificado codifica uma(s) proteína(s) mutante(s) que tem (têm) uma atividade diminuída. A frase “inativação dos operons *glgBX* e/ou *glgCAP*” ou “inativação do gene *glgS*” significa que tal operon ou gene modificado codifica uma(s) proteína(s) completamente inativa(s). Também é possível que a região modificada de DNA seja incapaz de expressar naturalmente o(s) gene(s) devido à deleção de uma parte do(s) gene(s), à mudança do quadro de leitura do(s) gene(s), à introdução de mutação(ões) de sentido incorreto/sem sentido, ou à modificação de uma região adjacente do(s) gene(s), incluindo seqüências controlando expressão de gene, tal como promotor(es), intensificador(es), atenuador(es), sítio(s) de ligação de ribossomo, etc..

O nível de expressão gênica pode ser estimado medindo a quantidade de mRNA transcrito a partir do gene usando vários métodos conhecidos incluindo Northern blotting, RT-PCR quantitativo, e os semelhantes. A quantidade da proteína codificada pelo gene pode ser medida por métodos conhecidos incluindo SDS-PAGE seguido por ensaio de imunoblotting (análise western blotting) e os semelhantes.

O gene *glgC* codifica glicose-1-fosfato adenililtransferase (sinônimo – B3430). O gene *glgC* (gi: 16131304; nucleotídeos complementares aos nucleotídeos 3566056 a 3567351 no número de acesso do GenBank NC_000913.2; SEQ ID NO: 1) é localizado entre os genes *glgA* e *glgX* no cromossomo de *E. coli* K-12. A seqüência de nucleotídeos do gene *glgC* e a seqüência de aminoácidos da glicose-1-fosfato adenililtransferase codificada pelo gene *glgC* são mostradas em SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2, respectivamente.

O gene *glgA* codifica uma subunidade de glicogênio sintase (sinônimo – B3429). O gene *glgA* (posições de nucleotídeos: 3.566.056 a

3.564.623; no. de acesso do GenBank NC_000913.2; gi: 49175990) é localizado entre os genes *glgP* e *glgC* no cromossomo de *E. coli* K-12. A sequência de nucleotídeos do gene *glgA* e a sequência de aminoácidos da subunidade de glicogênio sintase codificada pelo gene *glgA* são mostradas em
 5 SEQ ID NO:11 e SEQ ID NO:12, respectivamente.

O gene *glgP* codifica uma subunidade de glicogênio fosforilase / glicogênio-maltotetraose fosforilase (sinônimos – B3428, GlgY). O gene *glgP* (posições de nucleotídeos: 3.564.604 a 3.562.157; no. de acesso do GenBank NC_000913.2; gi: 49175990) é localizado entre os genes *yzgL* e
 10 *glgA* no cromossomo de *E. coli* K-12. A sequência de nucleotídeos do gene *glgP* e a sequência de aminoácidos da subunidade de glicogênio fosforilase / glicogênio-maltotetraose fosforilase codificada pelo gene *glgP* são mostradas em SEQ ID NO:13 e SEQ ID NO:14, respectivamente.

O gene *glgX* codifica glicogênio fosforilase-dextrina limite α -
 15 1,6-glicohidrolase (sinônimos – B3431, GlyX). O gene *glgX* (posições de nucleotídeos: 3.569.342 a 3.567.369; no. de acesso do GenBank NC_000913.2; gi: 49175990) é localizado entre os genes *glgC* e *glgB* no cromossomo de *E. coli* K-12. A sequência de nucleotídeos do gene *glgX* e a sequência de aminoácidos da glicogênio fosforilase-dextrina limite α -1,6-
 20 glicohidrolase codificada pelo gene *glgX* são mostradas em SEQ ID NO:15 e SEQ ID NO:16, respectivamente.

O gene *glgB* codifica uma enzima de ramificação do glicogênio (sinônimo – B3432). O gene *glgB* (posições de nucleotídeos: 3.571.525 a 3.569.339; no. de acesso do GenBank NC_000913.2; gi:
 25 49175990) é localizado entre os genes *glgX* e *asd* no cromossomo de *E. coli* K-12. A sequência de nucleotídeos do gene *glgB* e a sequência de aminoácidos da enzima de ramificação do glicogênio codificada pelo gene *glgB* são mostradas em SEQ ID NO:17 e SEQ ID NO:18, respectivamente.

O *glgS* gene codifica uma proteína dependente de *rpoS* de

biossíntese de glicogênio (sinônimo – B3049). O gene *glgS* (posições de nucleotídeos: 3.189.961 a 3.189.731; no. de acesso do GenBank NC_000913.2; gi: 49175990) é localizado entre os ORFs *yqiI* e *yqiJ* no cromossomo de *E. coli* K-12. A sequência de nucleotídeos do gene *glgS* e a
5 sequência de aminoácidos da proteína dependente de *rpoS* de biossíntese de glicogênio codificada pelo gene *glgS* são mostradas em SEQ ID NO:19 e SEQ ID NO:20, respectivamente.

Uma vez que podem haver algumas diferenças em sequências de DNA entre os gêneros ou cepas da família *Enterobacteriaceae*, o gene
10 *glgC* a ser deletado no cromossomo não é limitado ao gene mostrado em SEQ ID No:1, mas pode incluir um gene homólogo de SEQ ID No:1. Portanto, a variante de proteína codificada pelo gene *glgC* pode ter uma homologia de não menos do que 80%, preferivelmente não menos do que 90%, e o mais preferivelmente não menos do que 95%, com respeito à sequência de
15 aminoácidos inteira codificada mostrada em SEQ ID NO. 2, contanto que a atividade de glicose-1-fosfato adenililtransferase antes de inativação seja mantida.

Além disso, o gene *glgC* gene pode ser uma variante que hibridiza sob condições estringentes com a sequência de nucleotídeos
20 mostrada em SEQ ID NO: 1, ou uma sonda que pode ser preparada a partir da sequência de nucleotídeos, contanto que ela codifique uma 1-fosfato adenililtransferase antes de inativação. “Condições estringentes” incluem aquelas sob as quais um híbrido específico, por exemplo, um híbrido tendo homologia de não menos do que 60%, preferivelmente não menos do que
25 70%, mais preferivelmente não menos do que 80%, e ainda mais preferivelmente não menos do que 90%, e o mais preferivelmente não menos do que 95% é formado e um híbrido não específico, por exemplo, um híbrido tendo homologia inferior do que a acima não é formado. Por exemplo, condições estringentes são exemplificadas lavando uma vez, preferivelmente

duas ou três vezes em uma concentração de sal correspondendo a $1\times\text{SSC}$, 0,1% de SDS, preferivelmente $0,1\times\text{SSC}$, 0,1% de SDS a 60°C. O comprimento da sonda pode ser adequadamente selecionado dependendo das condições de hibridização, e normalmente é 100 bp a 1 kbp.

5 A expressão similar como descrito acima para o gene *glgC* pode ser aplicada para as variantes de outros genes dos operons *glgBX* e *glgCAP*.

Inativação do gene pode ser realizada por métodos convencionais, tal como tratamento por mutagênese usando radiação UV ou
10 tratamento por nitrosoguanidina (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina), mutagênese sítio dirigida, ruptura gênica usando recombinação homóloga, ou/e mutagênese por inserção-deleção (Yu, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97:12: 5978-83) e (Datsenko, K.A. and Wanner, B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97:12: 6640-45) também chamado “Integração
15 vermelho-dirigida”.

Atividade de glicose-1-fosfato adenililtransferase codificada pelo gene *glgC* pode ser medida pelo método descrito por, por exemplo, Haugen, T.H. et al (J. Biol. Chem. 251 (24), 7880-5 (1976)). Assim, a atividade decrescente ou ausente de glicose-1-fosfato adenililtransferase na
20 bactéria de acordo com a presente invenção pode ser determinada quando comparada com a bactéria não modificada parental.

Atividade de glicogênio sintase codificada pelo gene *glgA* pode ser medida pelo método descrito por, por exemplo, Fox, J. et al (Methods Enzymol., 28, 539-544 (1972)). Assim, a atividade decrescente ou
25 ausente de glicogênio sintase na bactéria de acordo com a presente invenção pode ser determinada quando comparada com a bactéria não modificada parental.

Atividade de glicogênio fosforilase / glicogênio-maltotetraose fosforilase codificada pelo gene *glgP* pode ser medida pelo método descrito

por, por exemplo, Graves, D.J. and Wang, J.H. (The Enzymes, 7 (3rd ed.), 435-482 (1972)). Assim, a atividade decrescente ou ausente de glicogênio fosforilase / glicogênio-maltotetraose fosforilase na bactéria de acordo com a presente invenção pode ser determinada quando comparada com a bactéria não modificada parental.

Atividade de glicogênio fosforilase-dextrina limite α -1,6-glicohidrolase codificada pelo gene *glgX* pode ser medida pelo método descrito por, por exemplo, Jeanningros, R. et al (Biochim Biophys Acta, 438(1), 186-199 (1976)). Assim, a atividade decrescente ou ausente de glicogênio fosforilase-dextrina limite α -1,6-glicohidrolase na bactéria de acordo com a presente invenção pode ser determinada quando comparada com a bactéria não modificada parental.

Atividade de enzima de ramificação de glicogênio codificada pelo gene *glgB* pode ser medida pelo método descrito por, por exemplo, Illingworth, B.B. and Brown, D.H. (Methods Enzymol., 8, 395-403 (1966)). Assim, a atividade decrescente ou ausente de enzima de ramificação de glicogênio na bactéria de acordo com a presente invenção pode ser determinada quando comparada com a bactéria não modificada parental.

Atividade de proteína dependente de *rpoS* de biossíntese de glicogênio codificada pelo gene *glgS* pode ser detectada por complementação de mutação nula de *glgS* que inibe síntese de glicogênio como descrito por, por exemplo, Hengge-Aronis, R, and Fischer, D. (Mol. Microbiol., 6, 14, 1877-1886 (1992)). Assim, a atividade decrescente ou ausente de proteína dependente de *rpoS* de biossíntese de glicogênio na bactéria de acordo com a presente invenção pode ser determinada quando comparada com a bactéria não modificada parental.

Métodos para preparação de DNA de plasmídeo, digestão e ligação de DNA, transformação, seleção de um oligonucleotídeo como iniciador e os semelhantes podem ser métodos habituais bem conhecidos por

alguém versado na arte. Estes métodos são descritos, por exemplo, em Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

5 Bactérias produtoras de L-aminoácido

Como uma bactéria da presente invenção, que é modificada para inativar os operons *glgBX* e/ou *glgCAP* ou o gene *glgS*, bactérias que são capazes de produzir L-aminoácidos ou aromáticos ou não aromáticos podem ser usadas.

10 A bactéria da presente invenção pode ser obtida inativando os operons *glgBX* e/ou *glgCAP* ou o gene *glgS* em uma bactéria que inerentemente tem a capacidade de produzir L-aminoácidos. Alternativamente, a bactéria da presente invenção pode ser obtida concedendo a capacidade de produzir L-aminoácidos a uma bactéria já tendo os operons
15 *glgBX* e/ou *glgCAP* ou o gene *glgS* inativado.

Bactérias produtoras de L-treonina

Exemplos de cepas parentais para derivar as bactérias produtoras de L-treonina da presente invenção incluem, mas não são limitados a, cepas pertencendo ao gênero *Escherichia*, tal como *E. coli* TDH-
20 6/pVIC40 (VKPM B-3996) (US No. 5.175.107, US No. 5.705.371), *E. coli* NRRL-21593 (US No. 5.939.307), *E. coli* FERM BP-3756 (US No. 5.474.918), *E. coli* FERM BP-3519 e FERM BP-3520 (US 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 os semelhantes.

25 A cepa TDH-6 é deficiente no gene *thrC* gene, assim como é assimiladora de sacarose, e o gene *ilvA* tem uma mutação defeituosa. Esta cepa também tem uma mutação no gene *rhtA*, que concede resistência a altas concentrações de treonina ou homoserina. A cepa B-3996 contém o plasmídeo pVIC40 que foi obtido inserindo um operon *thrA*BC* que inclui

um gene *thrA* mutante em um vetor derivado de RSF1010. Este gene *thrA* mutante codifica aspartoquinase homoserina desidrogenase I que tem inibição por retroalimentação substancialmente dessensibilizada por treonina. A cepa B-3996 foi depositada em 10 de Novembro de 1987 no All-Union Scientific Center of Antibiotics (Nagatinskaya Street 3-A, 117105 Moscow, Russian Federation) sob o número de acesso RIA 1867. A cepa também foi depositada no Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (Russia, 117545 Moscow, 1 Dorozhny proezd,. 1) em 7 de Abril de 1987 sob o número de acesso B-3996.

Preferivelmente, a bactéria da presente invenção é adicionalmente modificada para realçar expressão de um ou mais dos seguintes genes:

- o gene *thrA* mutante que codifica para aspartoquinase homoserina desidrogenase I resistente a inibição por retroalimentação 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 transmembrana hipotética;

- 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* foi elucidado (posições de nucleotídeos 337 a 2799, acesso do GenBank NC_000913.2, gi: 49175990). O gene *thrA* é 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 2801 a 3733, acesso do GenBank NC_000913.2, gi:

49175990). O gene *thrB* é 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 3734 a 5020, acesso do GenBank NC_000913.2, gi: 49175990). O gene *thrC* é localizado entre o gene *thrB* e o quadro de leitura aberto de *yaaX* no cromossomo de *E. coli* K-12. Todos os três genes funcionam como um único operon de treonina.

Um gene *thrA* mutante que codifica para aspartoquinase homoserina desidrogenase I resistente a inibição por retroalimentação por treonina, assim como, os genes *thrB* e *thrC* podem ser obtidos como um operon a partir de um plasmídeo pVIC40 bem conhecido que é apresentado na cepa de *E. coli* produtora de treonina VKPM B-3996. Plasmídeo pVIC40 é descrito em detalhe em US No. 5.705.371.

O gene *rhtA* existe em 18 min no cromossomo de *E. coli* perto do operon *glnHPQ*, que codifica componentes do sistema de transporte de glutamina. O gene *rhtA* é idêntico a ORF1 (gene *ybiF*, posições de nucleotídeos 764 a 1651, número de acesso do GenBank AAA218541, gi:440181) e localizado entre os genes *pexB* e *ompX*. A unidade expressando uma proteína codificada pelo ORF1 foi designada o gene *rhtA* (*rht*: resistência a homoserina e treonina). Também, foi revelado que a mutação *rhtA23* é uma substituição de A por G na posição -1 com respeito ao códon de início ATG (RESUMOS do 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology em conjugação com Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, San Francisco, California August 24-29, 1997, resumo No. 457, EP 1013765 A).

O gene *asd* de *E. coli* já foi elucidado (posições de nucleotídeos 3572511 a 3571408, acesso do GenBank NC_000913.1, gi:16131307), e pode ser obtido por PCR (reação em cadeia da polimerase; referir a White, T.J. *et al.*, *Trends Genet.*, 5, 185 (1989)) utilizando iniciadores preparados baseados na sequência de nucleotídeos do gene. Os genes *asd* de outros

microorganismos podem ser obtidos de uma maneira similar.

Também, o gene *aspC* de *E.coli* já foi elucidado (posições de nucleotídeos 983742 a 984932, acesso do GenBank NC_000913.1, gi:16128895), e pode ser obtido por 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 pertencendo ao gênero *Escherichia* incluem mutantes tendo resistência a um análogo de L-lisina. O análogo de L-lisina inibe crescimento de bactérias pertencendo ao gênero *Escherichia*, mas esta inibição é completamente ou parcialmente dessensibilizada quando L-lisina coexiste em um meio. Exemplos do análogo de L-lisina incluem, mas não são limitados a, oxalisina, lisina hidroxamato, S-(2-aminoetil)-L-cisteína (AEC), γ -metil-lisina, α -clorocaprolactam e assim por diante. Mutantes tendo resistência a estes análogos de lisina podem ser obtidos sujeitando bactérias pertencendo ao gênero *Escherichia* a um tratamento por mutagênese artificial convencional. Exemplos específicos de cepas bacterianas úteis para produzir L-lisina incluem *Escherichia coli* AJ11442 (FERM BP-1543, NRRL B-12185; veja US No. 4.346.170) e *Escherichia coli* VL611. Nestes microorganismos, inibição por retroalimentação de aspartoquinase por L-lisina é dessensibilizada.

A cepa WC196 pode ser usada como uma bactéria produtora de L-lisina de *Escherichia coli*. Esta cepa bacteriana foi criada conferindo resistência AEC à cepa W3110, que foi derivada de *Escherichia coli* K-12. A cepa resultante foi designada cepa AJ13069 de *Escherichia coli* e foi depositada no National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology (atualmente 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, Japan) em 6 de Dezembro de 1994 e recebeu um

número de acesso de FERM P-14690. Então, ela foi convertida para um depósito internacional sob as provisões do Tratado de Budapeste em 29 de Setembro de 1995, e recebeu um número de acesso de FERM BP-5252 (US No. 5.827.698).

5 Exemplos de cepas parentais para derivar bactérias produtoras de L-lisina da presente invenção também incluem cepas nas quais expressão de um ou mais genes codificando uma enzima biossintética de L-lisina é realçada. Exemplos das enzimas envolvidas em biossíntese de L-lisina incluem, mas não são limitados a, dihidrodipicolinato sintase (*dapA*),
 10 aspartoquinase (*lysC*), dihidrodipicolinato redutase (*dapB*), diaminopimelato descarboxilase (*lysA*), diaminopimelato desidrogenase (*ddh*) (US No. 6.040.160), fosfoenolpiruvato carboxilase (*ppc*), aspartato semialdeído desidrogenase (*asd*), nicotinamida adenina dinucleotídeo transhidrogenase (*pntAB*), e aspartase (*aspA*) (EP 1253195 A).

15 Exemplos de cepas parentais para derivar bactérias produtoras de L-lisina da presente invenção também incluem cepas tendo atividade diminuída ou eliminada de uma enzima que catalisa uma reação para gerar um composto outro do que L-lisina se ramificando a partir da via biossintética de L-lisina. Exemplos das enzimas que catalisam uma reação para gerar um
 20 composto outro do que L-lisina se ramificando a partir da via biossintética de L-lisina incluem homoserina desidrogenase e lisina descarboxilase (US No. 5.827.698).

Bactérias produtoras de L-cisteína

25 Exemplos de cepas parentais para derivar bactérias produtoras de L-cisteína da presente invenção incluem, mas não são limitados a, cepas pertencendo ao gênero *Escherichia*, tal como *E. coli* JM15 que é transformada com diferentes alelos de *cysE* codificando para serina acetiltransferases resistentes a retroalimentação (US No. 6.218.168, pedido de patente Russa 2003121601); *E. coli* W3110 tendo super-expressado genes que codificam

proteínas adequadas para secretar substância tóxicas para células (US No. 5.972.663); cepas de *E. coli* tendo diminuída atividade de cisteína dessulfohidrase (JP11155571A2); *E. coli* W3110 com aumentada atividade de um regulador transcricional positivo para regulador de cisteína codificado pelo gene *cysB* (WO0127307A1), e os semelhantes.

Bactérias produtoras de L-leucina

Exemplos de cepas parentais derivando bactérias produtoras de L-leucina da presente invenção incluem, mas não são limitados a, cepas pertencendo ao gênero *Escherichia*, tal como cepas de *E. coli* resistentes a leucina (por exemplo, a cepa 57 (VKPM B-7386, US 6.124.121)) ou análogos de leucina incluindo como β -2-tienilalanina, 3-hidroxileucina, 4-azaleucina, 5,5,5-trifluorleucina (JP 62-34397 B e JP 8-70879 A); cepas *E. coli* obtidas pelo método de engenharia de gene descrito em WO96/06926; *E. coli* H-9068 (JP 8-70879 A), e os semelhantes.

A bactéria da presente invenção pode ser melhorada realçando a expressão de um ou mais genes envolvidos em biossíntese de L-leucina. Exemplos incluem genes do operon *leuABCD*, que são preferivelmente representados por um gene *leuA* mutante codificando para isopropilmalato sintase livre de inibição por retroalimentação por L-leucina (US 6.403.342). Em adição, a bactéria da presente invenção pode ser melhorada realçando a expressão de um ou mais genes codificando para proteínas que excretam L-aminoácido de uma célula bacteriana. Exemplos de tais genes incluem os genes b2682 e b2683 (genes *ygaZH*) (EP 1239041 A2).

Bactérias produtoras de L-histidina

Exemplos de cepas parentais para derivar bactérias produtoras de L-histidina da presente invenção incluem, mas não são limitados a, cepas pertencendo ao gênero *Escherichia*, tal como cepa 24 de *E. coli* (VKPM B-5945, RU2003677); cepa 80 de *E. coli* (VKPM B-7270, RU2119536); *E. coli* NRRL B-12116 – B12121 (US No. 4.388.405); *E. coli* H-9342 (FERM BP-

6675) e H-9343 (FERM BP-6676) (US No. 6.344.347); *E. coli* H-9341 (FERM BP-6674) (EP 1085087); *E. coli* AI80/pFM201 (US No. 6.258.554) e os semelhantes.

Exemplos de cepas parentais para derivar bactérias produtoras de L-histidina da presente invenção também incluem cepas nas quais expressão de um ou mais genes codificando uma enzima biossintética de L-histidina é realçada. Exemplos das enzimas biossintéticas de L-histidina incluem ATP fosforibosiltransferase (*hisG*), fosforibosil AMP ciclohidrolase (*hisI*), fosforibosil-ATP pirofosfohidrolase (*hisIE*), fosforibosilformimino-5-aminoimidazol carboxamida ribotídeo isomerase (*hisA*), amidotransferase (*hisH*), histidinol fosfato aminotransferase (*hisC*), histidinol fosfatase (*hisB*), histidinol desidrogenase (*hisD*), e assim por diante.

É conhecido que os genes codificando a enzima biossintética de L-histidina (*hisG*, *hisBHAFI*) são inibidos por L-histidina, e portanto uma capacidade de produzir L-histidina também pode ser eficientemente realçada introduzindo uma mutação conferindo resistência à inibição por retroalimentação em ATP fosforibosiltransferase (*hisG*) (Patentes Russas Nos. 2003677 e 2119536).

Exemplos específicos de cepas tendo uma capacidade de produzir L-histidina incluem *E. coli* FERM-P 5038 e 5048 que foram introduzidas com um vetor carregando um DNA codificando uma enzima biossintética de L-histidina (JP 56-005099 A), cepas de *E. coli* introduzidas com *rht*, um gene para uma exportação de aminoácido (EP 1016710A), cepa 80 de *E. coli* concedida com sulfaguanidina, DL-1,2,4-triazol-3-alanina, e resistência a estreptomicina (VKPM B-7270, Patente Russa No. 2119536), e assim por diante.

Bactérias produtoras de L-ácido glutâmico

Exemplos de cepas parentais para derivar bactérias produtoras de L-ácido glutâmico da presente invenção incluem, mas não são limitados a,

cepas pertencendo ao gênero *Escherichia*, tal como *E. coli* VL334thrC⁺ (EP 1172433). *E. coli* VL334 (VKPM B-1641) é uma cepa auxotrófica de L-isoleucina e L-treonina tendo mutações em genes *thrC* e *ilvA* (US No. 4.278.765). Um alelo tipo selvagem do gene *thrC* foi transferido pelo método de transdução geral usando um bacteriófago P1 crescido nas células de cepa K12 de *E. coli* tipo selvagem (VKPM B-7). Como um resultado, uma cepa auxotrófica de L-isoleucina VL334thrC⁺ (VKPM B-8961) foi obtida. Esta cepa é capaz de produzir L-ácido glutâmico.

Exemplos de cepas parentais para derivar as bactérias produtoras de L-ácido glutâmico da presente invenção incluem, mas não são limitados a, cepas nas quais expressão de um ou mais genes codificando uma enzima biossintética de L-ácido glutâmico é realizada. Exemplos das enzimas envolvidas em biossíntese de L-ácido glutâmico incluem glutamato desidrogenase, glutamina sintetase, glutamato sintetase, isocitrato desidrogenase, aconitato hidratase, citrato sintase, fosfoenolpiruvato carboxilase, piruvato carboxilase, piruvato desidrogenase, piruvato quinase, fosfoenolpiruvato sintase, enolase, fosfogliceromutase, fosfoglicerato quinase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, triose fosfato isomerase, frutose bisfosfato aldolase, fosfofrutoquinase, e glicose fosfato isomerase.

Exemplos de cepas modificadas de forma que expressão do gene de citrato sintetase, do gene de fosfoenolpiruvato carboxilase, e/ou do gene de glutamato desidrogenase é/são realizada(s) incluem aqueles descritos em EP 1078989A, EP 955368A, e EP 952221A.

Exemplos de cepas parentais para derivar as bactérias produtoras de L-ácido glutâmico da presente invenção também incluem cepas tendo atividade diminuída ou eliminada de uma enzima que catalisa síntese de um composto outro do que L-ácido glutâmico, e se ramificando a partir de uma via de biossíntese de L-ácido glutâmico. Exemplos de tais enzimas incluem isocitrato liase, α -cetoglutarato desidrogenase, fosfotransacetilase,

acetato quinase, ácido acetohidroxi sintase, acetolactato sintase, formato acetiltransferase, lactato desidrogenase, e glutamato descarboxilase. Bactérias pertencendo ao gênero *Escherichia* deficientes na atividade de α -cetoglutarato desidrogenase ou tendo uma reduzida atividade de α -cetoglutarato e métodos para obter elas são descritos em US Nos. 5.378.616 e 5.573.945. Especificamente, estas cepas incluem as seguintes:

E. coli W3110sucA::Kmr

E. coli AJ12624 (FERM BP-3853)

E. coli AJ12628 (FERM BP-3854)

10 *E. coli* AJ12949 (FERM BP-4881)

E. coli W3110sucA::Kmr é uma cepa obtida interrompendo o gene de α -cetoglutarato desidrogenase (daqui por diante referido como “gene *sucA*”) de *E. coli* W3110. Esta cepa é completamente deficiente na α -cetoglutarato desidrogenase.

15 Outros exemplos de bactéria produtora de L-ácido glutâmico incluem aqueles que pertencem ao gênero *Escherichia* e têm resistência a um antimetabólito de ácido aspártico. Estas cepas também podem ser deficientes na atividade de α -cetoglutarato desidrogenase e incluem, por exemplo, *E. coli* AJ13199 (FERM BP-5807) (US No. 5.908.768), FFRM P-12379, que
20 adicionalmente tem uma baixa capacidade de decomposição de L-ácido glutâmico (US No. 5.393.671); AJ13138 (FERM BP-5565) (US No. 6.110.714), e as semelhantes.

Exemplos de bactérias produtoras de L-ácido glutâmico, incluem cepas mutantes pertencendo ao gênero *Pantoea* que são deficientes
25 na atividade de α -cetoglutarato desidrogenase ou têm uma diminuída atividade de α -cetoglutarato desidrogenase, e podem ser obtidas como descrito acima. Tais cepas incluem *Pantoea ananatis* AJ13356. (US 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 (atualmente, 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, Japan) em 19 de Fevereiro de 1998 sob um número de acesso de FERM P-16645. Ela foi então convertida para um depósito internacional sob as provisões de Tratado de Budapeste em 11 de Janeiro de 1999 e recebeu um número de acesso de FERM BP-6615. *Pantoea ananatis* AJ13356 é deficiente na atividade de α -cetoglutarato desidrogenase como um resultado de interrupção do gene de subunidade α KGDH-E1 (sucA).

10 A cepa acima foi identificada como *Enterobacter agglomerans* quando ela foi isolada e depositada como a *Enterobacter agglomerans* AJ13356. Entretanto, ela foi recentemente re-classificada como *Pantoea ananatis* com base em seqüenciamento de nucleotídeos de 16S rRNA e assim por diante. Embora AJ13356 tenha sido depositada no depósito acima mencionado como

15 *Enterobacter agglomerans*, para os propósitos deste relatório, elas são descritas como *Pantoea ananatis*.

Bactérias produtoras de L-fenilalanina

Exemplos de cepas parentais para derivar bactérias produtoras de L-fenilalanina da presente invenção incluem, mas não são limitados a,

20 cepas pertencendo ao gênero *Escherichia*, tal como *E.coli* AJ12739 (tyrA::Tn10, tyrR) (VKPM B-8197); *E.coli* HW1089 (ATCC 55371) abrigando o gene *pheA34* (US No. 5.354.672); *E.coli* MWEC101-b (KR8903681); *E.coli* NRRL B-12141, NRRL B-12145, NRRL B-12146 e NRRL B-12147 (US No. 4.407.952). Também, como uma cepa parental, *E.*

25 *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] nomeada como AJ 12604 (FERM BP-3579) podem ser usadas (EP 488424 B1). Além disso, bactérias produtoras de L-fenilalanina pertencendo ao

gênero *Escherichia* com uma realçada atividade da proteína codificada pelo gene *yedA* ou o gene *yddG* também podem ser usadas (pedidos de patente US 2003/0148473 A1 e 2003/0157667 A1).

Bactérias produtoras de L-triptofano

5 Exemplos de cepas parentais para derivar as bactérias produtoras de L-triptofano da presente invenção incluem, mas não são limitados a, cepas pertencendo ao gênero *Escherichia*, tal como *E. coli* JP4735/pMU3028 (DSM10122) e JP6015/pMU91 (DSM10123) deficientes na triptofanil-tRNA sintetase codificada pelo gene *trpS* mutante (US No. 10 5.756.345); *E. coli* SV164 (pGH5) tendo alelo de *serA* codificando fosfoglicerato desidrogenase livre de inibição por retroalimentação por serina e o alelo de *trpE* codificando antranilato sintase livre de inibição por retroalimentação por triptofano (US No. 6.180.373); *E. coli* AGX17 (pGX44) (NRRL B-12263) e AGX6(pGX50)aroP (NRRL B-12264) deficientes na 15 enzima triptofanase (US No. 4.371.614); *E. coli* AGX17/pGX50,pACKG4-pps na qual uma capacidade de produzir fosfoenolpiruvato é realçada (WO9708333, US No. 6.319.696), e as semelhantes podem ser usadas.

 Previamente, foi identificado que o gene *yddG* codificando uma proteína de membrana, que não está envolvido em via biossintética de 20 nenhum L-aminoácido, e concede a um microorganismo resistência a L-fenilalanina e diversos análogos de aminoácidos quando o alelo tipo selvagem do gene foi amplificado em um vetor de múltiplas cópias no microorganismo. Além disso, o gene *yddG* pode realçar produção de L-fenilalanina ou L-triptofano quando cópias adicionais são introduzidas nas células da cepa 25 produtora respectiva (WO03044192). Portanto é desejável que a bactéria produtora de L-triptofano seja adicionalmente modificada para ter expressão realçada do quadro de leitura aberto de *yddG*.

 Exemplos de cepas parentais para derivar as bactérias produtoras de L-triptofano da presente invenção também incluem cepas nas

quais uma ou mais atividades das enzimas selecionadas a partir de antranilato sintase, fosfoglicerato desidrogenase, e triptofano sintase são realçadas. A antranilato sintase e fosfoglicerato desidrogenase são ambas sujeitas a inibição por retroalimentação por L-triptofano e L-serina, de forma que uma mutação dessensibilizando a inibição por retroalimentação pode ser introduzida nestas enzimas. Exemplos específicos de cepas tendo uma tal mutação incluem uma *E. coli* SV164 que abriga antranilato sintase dessensibilizado e uma cepa transformante obtida introduzindo na *E. coli* SV164 o plasmídeo pGH5 (WO 94/08031), que contém um gene *serA* mutante codificando fosfoglicerato desidrogenase dessensibilizada por retroalimentação.

Exemplos de cepas parentais para derivar as bactérias produtoras de L-triptofano da presente invenção também incluem cepas nas quais o operon de triptofano que contém um gene codificando antranilato sintase dessensibilizado foi introduzido (JP 57-71397 A, JP 62-244382 A, US No. 4.371.614). Além disso, capacidade de produzir L-triptofano pode ser concedida realçando expressão de um gene que codifica triptofano sintase, entre operons de triptofano (*trpBA*). A triptofano sintase consiste de subunidades α e β que são codificadas por *trpA* e *trpB*, respectivamente.

Bactérias produtoras de L-prolina

Exemplos de cepas parentais para derivar bactérias produtoras de L-prolina da presente invenção incluem, mas não são limitados a, cepas pertencendo ao gênero *Escherichia*, tal como *E. coli* 702ilvA (VKPM B-8012) que é deficiente no gene *ilvA* e é capaz de produzir L-prolina (EP 1172433). A bactéria da presente invenção pode ser melhorada realçando a expressão de um ou mais genes envolvidos em biossíntese de L-prolina. Exemplos de tais genes para bactérias produtoras de L-prolina que são preferidos incluem o gene *proB* codificando para glutamato quinase da qual inibição por retroalimentação por L-prolina é dessensibilizada (DE Patent

3127361). Em adição, a bactéria da presente invenção pode ser melhorada realçando a expressão de um ou mais genes codificando para proteínas excretando L-aminoácido a partir de célula bacteriana. Tais genes são exemplificados por genes b2682 e b2683 (genes *ygaZH*) (EP 1239041 A2).

5 Exemplos de bactérias pertencendo ao gênero *Escherichia*, que têm uma atividade para produzir L-prolina incluem as seguintes cepas de *E. coli*: NRRL B-12403 e NRRL B-12404 (Patente Britânica 2075056), VKPM B-8012 (pedido de patente Russa 2000124295), mutantes de plasmídeos descritos em DE Patent 3127361, mutantes de plasmídeos descritos por
10 Bloom F.R. et al (The 15th Miami winter symposium, 1983, p.34), e os semelhantes.

Bactérias produtoras de L-arginina

Exemplos de cepas parentais para derivar bactérias produtoras de L-arginina da presente invenção incluem, mas não são limitados a, cepas
15 pertencendo ao gênero *Escherichia*, tal como cepa 237 de *E. coli* (VKPM B-7925) (Pedido de US 2002/058315 A1) e suas cepas derivadas abrigando N-acetilglutamato sintase mutante (Pedido de Patente Russa No. 2001112869), cepa 382 de *E. coli* (VKPM B-7926) (EP1170358A1), uma cepa produtora de arginina na qual gene *argA* codificando N-acetilglutamato sintetase é
20 introduzido nessa (JP 57-5693 A), e as semelhantes.

Exemplos de cepas parentais para derivar bactérias produtoras de L-arginina da presente invenção também incluem cepas nas quais expressão de um ou mais genes codificando uma enzima biossintética de L-arginina é realçada. Exemplos das enzimas biossintéticas de L-arginina
25 incluem N-acetil-glutamil fosfato redutase (*argC*), ornitina acetil transferase (*argJ*), N-acetilglutamato quinase (*argB*), acetil-ornitina transaminase (*argD*), ornitina carbamoil transferase (*argF*), ácido argininosuccínico sintetase (*argG*), ácido argininosuccínico liase (*argH*), e carbamoil fosfato sintetase.

2. Método da presente invenção

O método da presente invenção é um método para produzir um L-aminoácido compreendendo cultivar a bactéria da presente invenção em um meio de cultura para produzir e excretar o L-aminoácido no meio, e coletar o L-aminoácido do meio.

5 Na presente invenção, o cultivo, coleta, e purificação de um L-aminoácido do meio e os semelhantes podem ser realizados de uma maneira similar a métodos de fermentação convencionais caracterizados pelo fato de que um aminoácido é produzido usando uma bactéria.

Um meio usado para cultura pode ser ou um meio sintético ou
10 natural, contanto 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 requer para crescimento. A fonte de carbono pode incluir vários carboidratos tal como glicose e sacarose, e vários ácidos orgânicos. Dependendo do modo de assimilação do microorganismo usado, álcool,
15 incluindo etanol e glicerol, pode ser usado. Como a fonte de nitrogênio, vários sais de amônio tal como sulfato de amônia e amônio, outros compostos e nitrogênio tal como aminas, uma fonte natural de nitrogênio tal como peptona, hidrolisado de soja, e microorganismo fermentador digerido podem ser usados. Como minerais, monofosfato de potássio, sulfato de magnésio,
20 cloreto de sódio, sulfato ferroso, sulfato de manganês, cloreto de cálcio, e os semelhantes podem ser usados. Como vitaminas, tiamina, extrato de levedura, e os semelhantes, podem ser usados.

O cultivo é preferivelmente realizado sob condições aeróbicas, tal como uma cultura agitada, e uma cultura movimentada com aeração, em
25 uma temperatura de 20 a 40 °C, preferivelmente 30 a 38 °C. O pH da cultura normalmente é entre 5 e 9, preferivelmente entre 6,5 e 7,2. O pH da cultura pode ser ajustado com amônia, carbonato de cálcio, vários ácidos, várias bases, e tampões. Normalmente, um cultivo de 1 a 5 dias leva a acumulação do L-aminoácido alvo no meio líquido.

Depois de cultivo, sólidos tal como células podem ser removidos do meio líquido por centrifugação ou filtração em membrana, e então o L-aminoácido pode ser coletado e purificado por métodos de troca iônica, concentração, e/ou cristalização.

5 Exemplos

A presente invenção será mais concretamente explicada abaixo com referência aos seguintes Exemplos não limitantes.

Exemplo 1. Construção de uma cepa com um gene *glgC* inativado

10 1. Deleção do gene *glgC*

Uma cepa tendo deleção do gene *glgC* pode ser construída pelo método inicialmente desenvolvido por Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97(12), 6640-6645) chamado “Integração vermelho-dirigida”. De acordo com este procedimento, os iniciadores de PCR
 15 *glgCL* (SEQ ID NO: 3) e *glgCR* (SEQ ID NO: 4) complementares tanto à região adjacente ao gene *glgC* como ao gene conferindo resistência a antibiótico no plasmídeo modelo podem ser construídos. O plasmídeo pACYC184 (NBL Gene Sciences Ltd., UK) (número de acesso do GenBank/EMBL X06403) pode ser usado como um modelo em reação de
 20 PCR. Condições para PCR podem ser como segue: etapa de desnaturação a 95°C por 3 min; perfil para dois primeiros ciclos: 1 min a 95°C, 30 seg a 50°C, 40 seg a 72°C; perfil para os últimos 25 ciclos: 30 seg a 95°C, 30 seg a 54°C, 40 seg a 72°C; etapa final: 5 min a 72°C.

Um produto de PCR de 1093-bp (Fig. 1) pode ser obtido e
 25 purificado em gel de agarose e pode ser usado para eletroporação de *E. coli* MG1655 (ATCC 700926), que contém o plasmídeo pKD46 tendo replicação sensível a temperatura. O plasmídeo pKD46 (Datsenko, K.A. and Wanner, B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97:12:6640-45) inclui um fragmento de DNA de 2.154 nucleotídeos (31088-33241) de fago λ (No. de acesso do

GenBank J02459), e contém genes do sistema de recombinação homóloga vermelho λ (γ , β , genes *exo*) sob o controle do promotor P_{araB} induzível por arabinose. O plasmídeo pKD46 é necessário para integração do produto de PCR no cromossomo de cepa MG1655.

5 Células eletrocompetentes podem ser preparadas como segue: uma cultura noturna de *E. coli* MG1655 pode ser crescida a 30°C em meio LB suplementado com ampicilina (100 mg/l) e então diluída 100 vezes com 5 ml de meio SOB (Sambrook et al, “Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition”, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) contendo
10 ampicilina e L-arabinose (1 mM). A cultura obtida pode ser crescida com aeração a 30°C para uma OD_{600} de $\approx 0,6$ e então pode ser feita eletrocompetente concentrando 100 vezes e lavando três vezes com H_2O deionizada congelada. Eletroporação pode ser realizada usando 70 μ l de células e ≈ 100 ng do produto de PCR. Células depois de eletroporação podem
15 ser incubadas com 1 ml de meio SOC (Sambrook et al, “Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition”, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) a 37°C por 2,5 horas e depois disso podem ser emplantadas em L-água e crescidas a 37°C para selecionar Cm^R recombinantes. Então, para eliminar o plasmídeo pKD46, 2 passagens em L-água com Cm a 42°C podem ser
20 realizadas e as colônias obtidas podem ser testadas por sensibilidade para ampicilina.

2. Verificação da deleção do gene *glgC* por PCR

Os mutantes, contendo a deleção do gene *glgC*, marcados com gene de resistência a Cm , podem ser verificados por PCR. Iniciadores locus-específicos *glgC1* (SEQ ID NO: 5) e *glgC2* (SEQ ID NO: 6) podem ser
25 usados em PCR para verificação. Condições para verificação por PCR podem ser como segue: etapa de desnaturação a 94°C por 3 min; perfil para os 30 ciclos: 30 seg a 94°C, 30 seg a 54°C, 1 min a 72°C; etapa final: 7 min a 72°C. O produto de PCR, que pode ser obtido na reação com a cepa parental

MG1655 $glgC^+$ como um modelo, deve ter 1471 bp de comprimento. O produto de PCR, que pode ser obtido na reação com a cepa mutante MG1655 $\Delta glgC::cat$ como um modelo, deve ter 1197 bp de comprimento (Fig.2).

Exemplo 2. Produção de L-glutamato por *E. coli* VL334thrC⁺-

5 $\Delta glgC$

A deleção do gene *glgC* no cromossomo da cepa de *E. coli* produtora de L-glutamato VL334thrC⁺ (EP 1172433) pode ser realizada por um método habitual bem conhecido, por exemplo, por transdução P1 a partir de cepa MG1655 $\Delta glgC::cat$, para obter a cepa VL334thrC⁺- $\Delta glgC$. A cepa
10 VL334thrC⁺ foi depositada na Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (Russia, 117545 Moscow, 1 Dorozhny proezd, 1) em 6 de Dezembro de 2004 sob o número de acesso VKPM B-8961 e então convertida para um depósito sob o Tratado de Budapeste em 8 de Dezembro de 2004.

15 Ambas cepas, VL334thrC⁺ e VL334thrC⁺- $\Delta glgC$, podem ser crescidas por 18-24 horas a 37°C em placas de L-ágar. Então, uma alça das células pode ser transferida para tubos de teste contendo 2ml de um meio de fermentação. O meio de fermentação (pH 7,2) deve conter glicose (60g/l), sulfato de amônio (25 g/l), KH₂PO₄ (2g/l), MgSO₄ (1 g/l), tiamina (0,1
20 mg/ml), L-isoleucina (70 µg/ml), e CaCO₃ (25 g/l). Glicose e CaCO₃ devem ser esterilizados separadamente. Cultivo pode ser realizado a 30°C por 3 dias com agitação. Depois do cultivo, a quantidade de L-ácido glutâmico produzido pode ser determinada por cromatografia em papel (composição da fase líquida: butanol-ácido acético-água=4:1:1) com subsequente marcação
25 por ninhidrina (1% de solução em acetona) e eluição adicional dos compostos em 50% de etanol com 0,5% de CdCl₂.

Exemplo 3. Produção de L-prolina por *E. coli* 702ilvA- $\Delta glgC$

A deleção do gene *glgC* no cromossomo da cepa de *E. coli* produtora de L-prolina 702ilvA (VKPM B-8012, pedido de patente Russa

2000124295, EP1172433) pode ser realizada por um método habitual bem conhecido como descrito acima para obter a cepa 702ilvA- Δ glgC. A cepa 702ilvA foi depositada na Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (Russia, 117545 Moscow, 1 Dorozhny proezd, 1) em 18 de Julho de 2000 sob o número de acesso VKPM B-8012.

Ambas cepas de *E. coli*, 702ilvA e 702ilvA- Δ glgC, podem ser crescidas por 18-24 horas a 37°C em placas de L-ágar. Então estas cepas podem ser cultivadas sob as mesmas condições que descrito acima.

Exemplo 4. Produção de L-arginina por *E. coli* 237- Δ glgC

A deleção do gene *glgC* no cromossomo da cepa 237 de *E. coli* produtora de L-arginina (VKPM B-7925) pode ser realizada por um método habitual bem conhecido como descrito acima para obter a cepa 237- Δ glgC. A cepa 237 foi depositada na Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (Russia, 113545 Moscow, 1 Dorozhny proezd, 1) em 10 de Abril de 2000 sob número de acesso VKPM B-7925 e então convertida para um depósito sob o Tratado de Budapeste em 18 de Maio de 2001.

Ambas cepas de *E. coli*, 237 e 237- Δ glgC, podem ser crescidas por 18-24 horas a 37°C em placas de L-ágar. Então estas cepas podem ser cultivadas sob as mesmas condições que descrito acima.

Exemplo 5. Produção de L-leucina por *E. coli* 57- Δ glgC

A deleção do gene *glgC* no cromossomo da cepa 57 de *E. coli* produtora de L-leucina (VKPM B-7386, US 6,124,121) pode ser realizada por um método habitual bem conhecido como descrito acima para obter a cepa 57-pMW- Δ glgC. A cepa 57 foi depositada na Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (Russia, 117545 Moscow, 1 Dorozhny proezd, 1) em 19 de Maio de 1997 sob o número de acesso VKPM B-7386.

Ambas cepas de *E. coli*, 57 e 57- Δ glgC, podem ser crescidas por 18-24 horas a 37°C em placas de L-ágar. Então estas cepas podem ser

cultivadas sob as mesmas condições que descrito acima sem adição de isoleucina no meio.

Exemplo 6. Produção de L-cisteína por *E. coli* JM15(ydeD)- Δ glgC

A deleção do gene *glgC* no cromossomo da cepa de *E. coli* produtora de L-cisteína JM15(ydeD) pode ser realizada por um método habitual bem conhecido como descrito acima para obter a cepa JM15(ydeD)- Δ glgC.

E. coli JM15(ydeD), um derivado de *E. coli* JM15 (US 6.218.168), pode ser transformada com DNA tendo o gene *ydeD*, que codifica uma proteína de membrana e não está envolvido em uma via biossintética de nenhum L-aminoácido (US 5.972.663).

Condições de fermentação para avaliação de produção de L-cisteína foram descritas em detalhe em Exemplo 6 de US 6.218.168.

Exemplo 7. Produção de L-treonina por *E. coli* B-3996- Δ glgC

A deleção do gene *glgC* no cromossomo da cepa de *E. coli* produtora de L-treonina B-3996 (VKPM B-3996) pode ser realizada por um método habitual bem conhecido como descrito acima para obter cepa B-3996- Δ glgC.

Ambas cepas de *E. coli*, B-3996 e B-3996- Δ glgC, podem ser crescidas por 18-24 horas a 37°C em placas de L-água. Então estas cepas podem ser cultivadas sob as mesmas condições que descrito acima.

Exemplo 8. Produção de L-lisina por *E. coli* AJ11442- Δ glgC

A deleção do gene *glgC* no cromossomo da cepa de *E. coli* produtora de L-lisina AJ11442 (FERM BP-1543, NRRL B-12185) pode ser realizada por um método habitual bem conhecido como descrito acima para obter cepa AJ11442- Δ glgC. A cepa AJ11442 foi depositada no Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology (atualmente National Institute of Advanced Industrial Science and Technology,

International Patent Organism Depository, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japan) em 1 de Maio de 1981 e recebeu um número de acesso de FERM P-5084. Então, ela foi convertida para 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.

Ambas cepas de *E. coli*, AJ11442 e AJ11442- Δ glgC, podem ser crescidas por 18-24 horas a 37°C em placas de L-ágar. Então estas cepas podem ser cultivadas sob as mesmas condições que descrito acima.

Exemplo 9. Produção de L-fenilalanina por *E. coli* AJ12739- Δ glgC

A deleção do gene *glgC* no cromossomo da cepa de *E. coli* produtora de L-fenilalanina AJ12739 (*tyrA::Tn10*, *tyrR*) (VKPM B-8197) pode ser realizada por um método habitual bem conhecido como descrito acima para obter a cepa AJ12739- Δ glgC. A cepa AJ12739 foi depositada na Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (Russia, 117545 Moscow, 1 Dorozhny proezd, 1) em 6 de Novembro de 2001 sob no. de acesso VKPM B-8197.

Ambas cepas de *E. coli*, AJ12739 e AJ12739- Δ glgC, podem ser crescidas por 18-24 horas a 37°C em placas de L-ágar. Então estas cepas podem ser cultivadas sob as mesmas condições que descrito acima.

Exemplo 10. Construção de uma cepa com os operons *glgBX* e *glgCAP* inativados

1. Deleção dos operons *glgBX* e *glgCAP*

Uma cepa tendo deleção dos operons *glgBX* e *glgCAP* foi construída pelo método desenvolvido inicialmente por Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97(12), 6640-6645) chamado "Integração vermelho-dirigida". De acordo com este procedimento, os iniciadores de PCR *glgBXCAPL* (SEQ ID NO: 7) e *glgBXCAPR* (SEQ ID NO: 8) complementares tanto à região adjacente aos operons *glgBX* e *glgCAP*

como ao gene conferindo resistência a antibiótico no plasmídeo modelo foram
construídos. O plasmídeo pACYC184 (NBL Gene Sciences Ltd., UK)
(número de acesso do GenBank/EMBL X06403) foi usado como um modelo
em PCR. Condições para PCR foram descritas em detalhe em Exemplo 1.

Um produto de PCR de 1152-bp purificado em gel de agarose
foi usado para eletroporação de *E. coli* MG1655 (ATCC 700926) contendo o
plasmídeo pKD46 tendo replicação sensível a temperatura, como descrito em
Exemplo 1.

2. Verificação da deleção dos operons *glgBX* e *glgCAP* por PCR

Os mutantes contendo a deleção dos operons *glgBX* e *glgCAP*
e marcados com gene de resistência a Cm foram verificados por PCR.
Iniciadores locus-específicos *glgBXCAP1* (SEQ ID NO: 9) e *glgBXCAP2*
(SEQ ID NO: 10) foram usados em PCR para a verificação. Condições para
verificação por PCR foram descritas em Exemplo 1. O produto de PCR obtido
na reação com a cepa parental MG1655 *glgBXCAP*⁺ como um modelo foi de
9425 bp de comprimento. O produto de PCR obtido na reação com a cepa
mutante MG1655 Δ *glgBXCAP*::cat como um modelo foi de 1208 bp de
comprimento (Fig. 3).

Exemplo 11. Produção de L-treonina por cepa de *E. coli* B- 3996- Δ *glgBXCAP*

Para testar o efeito de inativação dos operons *glgBX* e *glgCAP*
em produção de treonina, fragmentos de DNA do cromossomo da cepa de *E.*
coli MG1655 Δ *glgBXCAP*::cat descrita acima foram transferidos para a cepa
de *E. coli* produtora de treonina B-3996 por transdução P1 (Miller, J.H.
Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1972,
Plainview, NY).

Ambas cepas de *E. coli*, B-3996 e B-3996- Δ *glgBXCAP*, foram
crescidas por 18-24 horas a 37°C em placas de L-ágar. Para obter uma cultura

seminal, as cepas foram crescidas em um agitador rotatório (250 rpm) a 32°C por 18 horas em tubos de teste de 20x200-mm contendo 2 ml de L-caldo suplementado com 4% de glicose. Então o meio de fermentação foi inoculado com 0,21 ml (10%) de material seminal. A fermentação foi realizada em 2 ml de meio mínimo para fermentação em tubos de teste de 20x200-mm. Células foram crescidas por 65 horas a 32°C com agitação a 250 rpm.

Depois de cultivo, a quantidade de L-treonina acumulada no meio foi determinada por cromatografia em papel usando a seguinte fase móvel: butanol - ácido acético - água = 4: 1: 1 (v/v). Uma solução de ninhidrina (2%) em acetona foi usada como um reagente de visualização. Um ponto contendo L-treonina foi cortado, L-treonina foi eluída com 0,5% de solução aquosa de CdCl_2 , e a quantidade de L-treonina foi estimada espectrofotometricamente a 540 nm. Os resultados de dez fermentações em tubo de teste independentes são mostrados em Tabela 1.

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

	Glicose	80,0
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	22,0
	NaCl	0,8
	KH_2PO_4	2,0
20	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,8
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02
	$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,02
	Tiamina HCl	0,0002
	Extrato de levedura	1,0
25	CaCO_3	30,0

Glicose e sulfato de magnésio foram esterilizados separadamente. CaCO_3 foi esterilizado por calor seco a 180°C por 2 horas. O pH foi ajustado para 7,0. O antibiótico foi adicionado ao meio depois de esterilização.

Como segue de Tabela 1, B-3996- Δ glgBXCAP causou acumulação de uma quantidade superior de L-treonina, se comparado com B-3996.

Exemplo 12. Produção de L-lisina por *E. coli* WC196- Δ glgBXCAP

Para testar o efeito de inativação dos operons *glgBX* e *glgCAP* em produção de L-lisina, fragmentos de DNA do cromossomo da cepa de *E. coli* MG1655 Δ glgBXCAP::cat descrita acima foram transferidos para a cepa de *E. coli* produtora de L-lisina WC196 (FERM BP-5252) por transdução P1 (Miller, J.H. Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Lab. Press, 1972, Plainview, NY).

Para obter uma cultura seminal, ambas cepas de *E. coli*, WC196 e WC196- Δ glgBXCAP, foram crescidas em um agitador rotatório (250 rpm) a 32 °C por 18 horas em tubos de teste de 20x200-mm contendo 2 ml de meio diluído duas vezes comparado ao meio de fermentação descrito abaixo. Então o meio de fermentação foi inoculado com 0,21 ml (10%) de material seminal. A fermentação foi realizada em 2 ml de meio mínimo para fermentação em tubos de teste de 20x200-mm. Células foram crescidas por 24 horas a 32 °C com agitação a 250 rpm.

Depois de cultivo, a quantidade de L-lisina acumulada no meio foi determinada por cromatografia em papel usando a seguinte fase móvel: butanol - ácido acético - água = 4: 1: 1 (v/v). Uma solução de ninhidrina (2%) em acetona foi usada como um reagente de visualização. Um ponto contendo L-lisina foi cortado, L-lisina foi eluída com 0,5% de solução aquosa de CdCl_2 , e a quantidade de L-lisina foi estimada espectrofotometricamente a 540 nm. Os resultados de dez fermentações em tubo de teste independentes são mostrados em Tabela 2.

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

Glicose	40,0
---------	------

	(NH ₄) ₂ SO ₄	24,0
	KH ₂ PO ₄	1,0
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,0
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01
5	MnSO ₄ ·5H ₂ O	0,01
	Extrato de levedura	2,0
	CaCO ₃	30,0

Glicose, fosfato de potássio e sulfato de magnésio foram esterilizados separadamente. CaCO₃ foi esterilizado por calor seco a 180°C por 2 horas. O pH foi ajustado para 7,0.

Como segue de Tabela 2, WC196-ΔglgBXCAP causou acumulação de uma quantidade superior de L-lisina, se comparado com WC196.

Embora a invenção tenha sido descrita em detalhe com referência a formas de realização preferidas desta, será perceptível para alguém versado na arte que várias mudanças podem ser feitas, e equivalentes empregados, sem se afastar do escopo da invenção. Todas as referências citadas neste lugar são incorporadas como uma parte deste pedido por referência.

Tabela 1.

Cepa	OD ₅₄₀	Quantidade de L-treonina, g/l
B-3996	23,5 ± 0,3	27,5 ± 0,4
B-3996-ΔglgBXCAP	22,1 ± 0,2	28,2 ± 1,2

Tabela 2.

Cepa	OD ₅₄₀	Quantidade de L-lisina, g/l
WC196	26,2 ± 0,5	2,1 ± 0,1
WC196-ΔglgBXCAP	26,9 ± 0,3	2,4 ± 0,1

Aplicabilidade Industrial

De acordo com a presente invenção, produção de um L-aminoácido aromático ou um L-aminoácido não aromático de uma bactéria da família *Enterobacteriaceae* pode ser realizada.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> UM MÉTODO PARA PRODUZIR UM L-AMINOÁCIDO USANDO UMA
BACTÉRIA DA FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEAE TENDO UMA VIA DE
BIOSSÍNTESE DO GLICOGÊNIO INTERROMPIDA

<130> C440-C5323

<150> RU2005101110

<151> 2005-01-19

<160> 20

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1296

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1296)

<400> 1

atg gtt agt tta gag aag aac gat cac tta atg ttg gcg cgc cag ctg	48
Met Val Ser Leu Glu Lys Asn Asp His Leu Met Leu Ala Arg Gln Leu	
1 5 10 15	
cca ttg aaa tct gtt gcc ctg ata ctg gcg gga gga cgt ggt acc cgc	96
Pro Leu Lys Ser Val Ala Leu Ile Leu Ala Gly Gly Arg Gly Thr Arg	
20 25 30	
ctg aag gat tta acc aat aag cga gca aaa ccg gcc gta cac ttc ggc	144
Leu Lys Asp Leu Thr Asn Lys Arg Ala Lys Pro Ala Val His Phe Gly	
35 40 45	
ggt aag ttc cgc att atc gac ttt gcg ctg tct aac tgc atc aac tcc	192
Gly Lys Phe Arg Ile Ile Asp Phe Ala Leu Ser Asn Cys Ile Asn Ser	
50 55 60	
ggg atc cgt cgt atg ggc gtg atc acc cag tac cag tcc cac act ctg	240
Gly Ile Arg Arg Met Gly Val Ile Thr Gln Tyr Gln Ser His Thr Leu	
65 70 75 80	
gtg cag cac att cag cgc ggc tgg tca ttc ttc aat gaa gaa atg aac	288
Val Gln His Ile Gln Arg Gly Trp Ser Phe Phe Asn Glu Glu Met Asn	
85 90 95	
gag ttt gtc gat ctg ctg cca gca cag cag aga atg aaa ggg gaa aac	336
Glu Phe Val Asp Leu Leu Pro Ala Gln Gln Arg Met Lys Gly Glu Asn	
100 105 110	
tgg tat cgc ggc acc gca gat gcg gtc acc caa aac ctc gac att atc	384
Trp Tyr Arg Gly Thr Ala Asp Ala Val Thr Gln Asn Leu Asp Ile Ile	
115 120 125	
cgc cgt tat aaa gcg gaa tac gtg gtg atc ctg gcg ggc gac cat atc	432
Arg Arg Tyr Lys Ala Glu Tyr Val Val Ile Leu Ala Gly Asp His Ile	
130 135 140	

tac aag caa gac tac tcg cgt atg ctt atc gat cac gtc gaa aaa ggc Tyr Lys Gln Asp Tyr Ser Arg Met Leu Ile Asp His Val Glu Lys Gly 145 150 155 160	480
gca cgt tgc acc gtt gct tgt atg cca gta ccg att gaa gaa gcc tcc Ala Arg Cys Thr Val Ala Cys Met Pro Val Pro Ile Glu Glu Ala Ser 165 170 175	528
gca ttt ggc gtt atg gcg gtt gat gag aac gat aaa att atc gaa ttc Ala Phe Gly Val Met Ala Val Asp Glu Asn Asp Lys Ile Ile Glu Phe 180 185 190	576
gtt gaa aaa cct gct aac ccg ccg tca atg ccg aac gat ccg agc aaa Val Glu Lys Pro Ala Asn Pro Pro Ser Met Pro Asn Asp Pro Ser Lys 195 200 205	624
tct ctg gcg agt atg ggt atc tac gtc ttt gac gcc gac tat ctg tat Ser Leu Ala Ser Met Gly Ile Tyr Val Phe Asp Ala Asp Tyr Leu Tyr 210 215 220	672
gaa ctg ctg gaa gaa gac gat cgc gat gag aac tcc agc cac gac ttt Glu Leu Leu Glu Glu Asp Asp Arg Asp Glu Asn Ser Ser His Asp Phe 225 230 235 240	720
ggc aaa gat ttg att ccc aag atc acc gaa gcc ggt ctg gcc tat gcg Gly Lys Asp Leu Ile Pro Lys Ile Thr Glu Ala Gly Leu Ala Tyr Ala 245 250 255	768
cac ccg ttc ccg ctc tct tgc gta caa tcc gac ccg gat gcc gag ccg His Pro Phe Pro Leu Ser Cys Val Gln Ser Asp Pro Asp Ala Glu Pro 260 265 270	816
tac tgg cgc gat gtg ggt acg ctg gaa gct tac tgg aaa gcg aac ctc Tyr Trp Arg Asp Val Gly Thr Leu Glu Ala Tyr Trp Lys Ala Asn Leu 275 280 285	864
gat ctg gcc tct gtg gtg ccg gaa ctg gat atg tac gat cgc aat tgg Asp Leu Ala Ser Val Val Pro Glu Leu Asp Met Tyr Asp Arg Asn Trp 290 295 300	912
cca att cgc acc tac aat gaa tca tta ccg cca gcg aaa ttc gtg cag Pro Ile Arg Thr Tyr Asn Glu Ser Leu Pro Pro Ala Lys Phe Val Gln 305 310 315 320	960
gat cgc tcc ggt agc cac ggg atg acc ctt aac tca ctg gtt tcc ggc Asp Arg Ser Gly Ser His Gly Met Thr Leu Asn Ser Leu Val Ser Gly 325 330 335	1008
ggg tgt gtg atc tcc ggt tcg gtg gtg gtg cag tcc gtt ctg ttc tcg Gly Cys Val Ile Ser Gly Ser Val Val Val Gln Ser Val Leu Phe Ser 340 345 350	1056
cgc gtt cgc gtg aat tca ttc tgc aac att gat tcc gcc gta ttg tta Arg Val Arg Val Asn Ser Phe Cys Asn Ile Asp Ser Ala Val Leu Leu 355 360 365	1104
ccg gaa gta tgg gta ggt cgc tcg tgc cgt ctg cgc cgc tgc gtc atc Pro Glu Val Trp Val Gly Arg Ser Cys Arg Leu Arg Arg Cys Val Ile 370 375 380	1152
gat cgt gct tgt gtt att ccg gaa ggc atg gtg att ggt gaa aac gca Asp Arg Ala Cys Val Ile Pro Glu Gly Met Val Ile Gly Glu Asn Ala	1200

385	390	395	400	
gag gaa gat gca cgt cgt ttc tat cgt tca gaa gaa ggc atc gtg ctg				1248
Glu Glu Asp Ala Arg Arg Phe Tyr Arg Ser Glu Glu Gly Ile Val Leu				
	405	410	415	
gta acg cgc gaa atg cta cgg aag tta ggg cat aaa cag gag cga taa				1296
Val Thr Arg Glu Met Leu Arg Lys Leu Gly His Lys Gln Glu Arg				
	420	425	430	
 <210> 2				
<211> 431				
<212> PRT				
<213> Escherichia coli				
 <400> 2				
Met Val Ser Leu Glu Lys Asn Asp His Leu Met Leu Ala Arg Gln Leu				
1	5	10	15	
Pro Leu Lys Ser Val Ala Leu Ile Leu Ala Gly Gly Arg Gly Thr Arg				
	20	25	30	
Leu Lys Asp Leu Thr Asn Lys Arg Ala Lys Pro Ala Val His Phe Gly				
	35	40	45	
Gly Lys Phe Arg Ile Ile Asp Phe Ala Leu Ser Asn Cys Ile Asn Ser				
	50	55	60	
Gly Ile Arg Arg Met Gly Val Ile Thr Gln Tyr Gln Ser His Thr Leu				
65	70	75	80	
Val Gln His Ile Gln Arg Gly Trp Ser Phe Phe Asn Glu Glu Met Asn				
	85	90	95	
Glu Phe Val Asp Leu Leu Pro Ala Gln Gln Arg Met Lys Gly Glu Asn				
	100	105	110	
Trp Tyr Arg Gly Thr Ala Asp Ala Val Thr Gln Asn Leu Asp Ile Ile				
	115	120	125	
Arg Arg Tyr Lys Ala Glu Tyr Val Val Ile Leu Ala Gly Asp His Ile				
	130	135	140	
Tyr Lys Gln Asp Tyr Ser Arg Met Leu Ile Asp His Val Glu Lys Gly				
145	150	155	160	
Ala Arg Cys Thr Val Ala Cys Met Pro Val Pro Ile Glu Glu Ala Ser				
	165	170	175	
Ala Phe Gly Val Met Ala Val Asp Glu Asn Asp Lys Ile Ile Glu Phe				
	180	185	190	
Val Glu Lys Pro Ala Asn Pro Pro Ser Met Pro Asn Asp Pro Ser Lys				
	195	200	205	
Ser Leu Ala Ser Met Gly Ile Tyr Val Phe Asp Ala Asp Tyr Leu Tyr				
	210	215	220	
Glu Leu Leu Glu Glu Asp Asp Arg Asp Glu Asn Ser Ser His Asp Phe				
225	230	235	240	

Gly Lys Asp Leu Ile Pro Lys Ile Thr Glu Ala Gly Leu Ala Tyr Ala
 245 250 255
 His Pro Phe Pro Leu Ser Cys Val Gln Ser Asp Pro Asp Ala Glu Pro
 260 265 270
 Tyr Trp Arg Asp Val Gly Thr Leu Glu Ala Tyr Trp Lys Ala Asn Leu
 275 280 285
 Asp Leu Ala Ser Val Val Pro Glu Leu Asp Met Tyr Asp Arg Asn Trp
 290 295 300
 Pro Ile Arg Thr Tyr Asn Glu Ser Leu Pro Pro Ala Lys Phe Val Gln
 305 310 315 320
 Asp Arg Ser Gly Ser His Gly Met Thr Leu Asn Ser Leu Val Ser Gly
 325 330 335
 Gly Cys Val Ile Ser Gly Ser Val Val Val Gln Ser Val Leu Phe Ser
 340 345 350
 Arg Val Arg Val Asn Ser Phe Cys Asn Ile Asp Ser Ala Val Leu Leu
 355 360 365
 Pro Glu Val Trp Val Gly Arg Ser Cys Arg Leu Arg Arg Cys Val Ile
 370 375 380
 Asp Arg Ala Cys Val Ile Pro Glu Gly Met Val Ile Gly Glu Asn Ala
 385 390 395 400
 Glu Glu Asp Ala Arg Arg Phe Tyr Arg Ser Glu Glu Gly Ile Val Leu
 405 410 415
 Val Thr Arg Glu Met Leu Arg Lys Leu Gly His Lys Gln Glu Arg
 420 425 430

<210> 3
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> iniciador

<400> 3
 gtgtgtgttc cagagatgat aaaaaaggag ttagtctgat gtccggcggt gcttttgcc 59

<210> 4
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> iniciador

<400> 4
 cgggaacatc tctgaacata catgtaaaac ctgcatttac gccccgcct gccactc 57

<210> 5
 <211> 23

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> iniciador

<400> 5
ataaccagc gattacggct gtc

23

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> iniciador

<400> 6
cgatttgctg tgccggtaat g

21

<210> 7
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> iniciador

<400> 7
atgtccgac gtcgcatag agacgtgatt aacgcgtagt aagccagtat acactcc

57

<210> 8
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> iniciador

<400> 8
ttacaatctc accggatcga tatgccagat atgatcttaa gggcaccaat aactgcc

57

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> iniciador

<400> 9
ggggtgacac aataaaacag g

21

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial

```

<220>
<223> iniciador

<400> 10
tggccccgtt ctatttattg g                                     21

<210> 11
<211> 1434
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1434)

<400> 11
atg cag gtt tta cat gta tgt tca gag atg ttc ccg ctg ctt aaa acc      48
Met Gln Val Leu His Val Cys Ser Glu Met Phe Pro Leu Leu Lys Thr
1                               5                               10                               15

ggc ggt ctg gct gat gtt att ggg gca tta ccc gca gca caa atc gca      96
Gly Gly Leu Ala Asp Val Ile Gly Ala Leu Pro Ala Ala Gln Ile Ala
20                               25                               30

gac ggc gtt gac gct cgc gta ctg ttg cct gca ttt ccc gat att cgc      144
Asp Gly Val Asp Ala Arg Val Leu Pro Ala Phe Pro Asp Ile Arg
35                               40                               45

cgt ggc gtg acc gat gcg cag gta gta tcc cgt cgt gat acc ttc gcc      192
Arg Gly Val Thr Asp Ala Gln Val Val Ser Arg Arg Asp Thr Phe Ala
50                               55                               60

gga cat atc acg ctg ttg ttc ggt cat tac aac ggg gtt ggc att tac      240
Gly His Ile Thr Leu Leu Phe Gly His Tyr Asn Gly Val Gly Ile Tyr
65                               70                               75                               80

ctg att gac gcg ccg cat ctc tat gat cgt ccg gga agc ccg tat cac      288
Leu Ile Asp Ala Pro His Leu Tyr Asp Arg Pro Gly Ser Pro Tyr His
85                               90                               95

gat acc aac tta ttt gcc tat acc gac aac gta ttg cgt ttt gcg ctg      336
Asp Thr Asn Leu Phe Ala Tyr Thr Asp Asn Val Leu Arg Phe Ala Leu
100                               105                               110

ctg ggg tgg gtt ggg gca gaa atg gcc agc ggg ctt gac cca ttc tgg      384
Leu Gly Trp Val Gly Ala Glu Met Ala Ser Gly Leu Asp Pro Phe Trp
115                               120                               125

cgt cct gat gtg gtg cat gcg cac gac tgg cat gca ggc ctt gcg cct      432
Arg Pro Asp Val Val His Ala His Asp Trp His Ala Gly Leu Ala Pro
130                               135                               140

gcg tat ctg gcg gcg cgc ggg cgt ccg gcg aag tcg gtg ttt act gtg      480
Ala Tyr Leu Ala Ala Arg Gly Arg Pro Ala Lys Ser Val Phe Thr Val
145                               150                               155                               160

cac aac ctg gcc tat caa ggc atg ttt tat gca cat cac atg aat gac      528
His Asn Leu Ala Tyr Gln Gly Met Phe Tyr Ala His His Met Asn Asp
165                               170                               175

atc caa ttg cca tgg tca ttc ttt aat att cat ggg ctg gaa ttc aac      576
Ile Gln Leu Pro Trp Ser Phe Phe Asn Ile His Gly Leu Glu Phe Asn

```

180	185	190	
gga caa atc tct ttc ctg aag gcc ggt ctg tac tat gcc gat cac att Gly Gln Ile Ser Phe Leu Lys Ala Gly Leu Tyr Tyr Ala Asp His Ile 195 200 205			624
acg gcg gtc agt cca acc tac gct cgc gag atc acc gaa ccg cag ttt Thr Ala Val Ser Pro Thr Tyr Ala Arg Glu Ile Thr Glu Pro Gln Phe 210 215 220			672
gcc tac ggt atg gaa ggt ctg ttg caa cag cgt cac cgt gaa ggg cgt Ala Tyr Gly Met Glu Gly Leu Leu Gln Gln Arg His Arg Glu Gly Arg 225 230 235 240			720
ctt tcc ggc gta ctg aac ggc gtg gac gag aaa atc tgg agt cca gag Leu Ser Gly Val Leu Asn Gly Val Asp Glu Lys Ile Trp Ser Pro Glu 245 250 255			768
acg gac tta ctg ttg gcc tcg cgt tac acc cgc gat acg ttg gaa gat Thr Asp Leu Leu Leu Ala Ser Arg Tyr Thr Arg Asp Thr Leu Glu Asp 260 265 270			816
aaa gcg gaa aat aag cgc cag tta caa atc gca atg ggg ctt aag gtt Lys Ala Glu Asn Lys Arg Gln Leu Gln Ile Ala Met Gly Leu Lys Val 275 280 285			864
gac gat aaa gtg ccg ctt ttt gca gtg gtg agc cgt ctg acc agc cag Asp Asp Lys Val Pro Leu Phe Ala Val Val Ser Arg Arg Leu Thr Ser Gln 290 295 300			912
aaa ggt ctc gac ctg gtg ctg gaa gcc tta ccg ggt ctt ctg gag cag Lys Gly Leu Asp Leu Val Leu Glu Ala Leu Pro Gly Leu Leu Glu Gln 305 310 315 320			960
ggc ggg cag ctg gcg cta ctc ggc gcg ggc gat ccg gtg ctg cag gaa Gly Gly Gln Leu Ala Leu Leu Gly Ala Gly Asp Pro Val Leu Gln Glu 325 330 335			1008
ggt ttc ctt gcg gcg gca gcg gaa tac ccc ggt cag gtg ggc gtt cag Gly Phe Leu Ala Ala Ala Ala Glu Tyr Pro Gly Gln Val Gly Val Gln 340 345 350			1056
att ggc tat cac gaa gca ttt tcg cat cgc att atg ggc ggc gcg gac Ile Gly Tyr His Glu Ala Phe Ser His Arg Ile Met Gly Gly Ala Asp 355 360 365			1104
gtc att ctg gtg ccc agc cgt ttt gaa ccg tgc ggc tta acg caa ctt Val Ile Leu Val Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Thr Gln Leu 370 375 380			1152
tat gga ttg aag tac ggt acg ctg ccg tta gtg cgg cgc acc ggt ggg Tyr Gly Leu Lys Tyr Gly Thr Leu Pro Leu Val Arg Arg Thr Gly Gly 385 390 395 400			1200
ctt gct gat acg gtt tct gac tgt tct ctt gag aac ctt gca gat ggc Leu Ala Asp Thr Val Ser Asp Cys Ser Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly 405 410 415			1248
gtc gcc agt ggg ttt gtc ttt gaa gat agt aat gcc tgg tcg ctg tta Val Ala Ser Gly Phe Val Phe Glu Asp Ser Asn Ala Trp Ser Leu Leu 420 425 430			1296
cgg gct att cga cgt gct ttt gta ctg tgg tcc cgt cct tca ctg tgg			1344

```

Arg Ala Ile Arg Arg Ala Phe Val Leu Trp Ser Arg Pro Ser Leu Trp
    435                      440                      445

cgg ttt gtg caa cgt cag gct atg gca atg gat ttt agc tgg cag gtc      1392
Arg Phe Val Gln Arg Gln Ala Met Ala Met Asp Phe Ser Trp Gln Val
    450                      455                      460

gcg gcg aag tcg tac cgt gag ctt tac tat cgc ttg aaa tag      1434
Ala Ala Lys Ser Tyr Arg Glu Leu Tyr Tyr Arg Leu Lys
    465                      470                      475

<210> 12
<211> 477
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 12
Met Gln Val Leu His Val Cys Ser Glu Met Phe Pro Leu Leu Lys Thr
 1                      5                      10                      15

Gly Gly Leu Ala Asp Val Ile Gly Ala Leu Pro Ala Ala Gln Ile Ala
    20                      25                      30

Asp Gly Val Asp Ala Arg Val Leu Leu Pro Ala Phe Pro Asp Ile Arg
    35                      40                      45

Arg Gly Val Thr Asp Ala Gln Val Val Ser Arg Arg Asp Thr Phe Ala
    50                      55                      60

Gly His Ile Thr Leu Leu Phe Gly His Tyr Asn Gly Val Gly Ile Tyr
 65                      70                      75                      80

Leu Ile Asp Ala Pro His Leu Tyr Asp Arg Pro Gly Ser Pro Tyr His
    85                      90                      95

Asp Thr Asn Leu Phe Ala Tyr Thr Asp Asn Val Leu Arg Phe Ala Leu
   100                      105                      110

Leu Gly Trp Val Gly Ala Glu Met Ala Ser Gly Leu Asp Pro Phe Trp
   115                      120                      125

Arg Pro Asp Val Val His Ala His Asp Trp His Ala Gly Leu Ala Pro
   130                      135                      140

Ala Tyr Leu Ala Ala Arg Gly Arg Pro Ala Lys Ser Val Phe Thr Val
 145                      150                      155                      160

His Asn Leu Ala Tyr Gln Gly Met Phe Tyr Ala His His Met Asn Asp
   165                      170                      175

Ile Gln Leu Pro Trp Ser Phe Phe Asn Ile His Gly Leu Glu Phe Asn
   180                      185                      190

Gly Gln Ile Ser Phe Leu Lys Ala Gly Leu Tyr Tyr Ala Asp His Ile
   195                      200                      205

Thr Ala Val Ser Pro Thr Tyr Ala Arg Glu Ile Thr Glu Pro Gln Phe
   210                      215                      220

Ala Tyr Gly Met Glu Gly Leu Leu Gln Gln Arg His Arg Glu Gly Arg
 225                      230                      235                      240

```

Leu Ser Gly Val Leu Asn Gly Val Asp Glu Lys Ile Trp Ser Pro Glu
 245 250 255
 Thr Asp Leu Leu Leu Ala Ser Arg Tyr Thr Arg Asp Thr Leu Glu Asp
 260 265 270
 Lys Ala Glu Asn Lys Arg Gln Leu Gln Ile Ala Met Gly Leu Lys Val
 275 280 285
 Asp Asp Lys Val Pro Leu Phe Ala Val Val Ser Arg Leu Thr Ser Gln
 290 295 300
 Lys Gly Leu Asp Leu Val Leu Glu Ala Leu Pro Gly Leu Leu Glu Gln
 305 310 315 320
 Gly Gly Gln Leu Ala Leu Leu Gly Ala Gly Asp Pro Val Leu Gln Glu
 325 330 335
 Gly Phe Leu Ala Ala Ala Ala Glu Tyr Pro Gly Gln Val Gly Val Gln
 340 345 350
 Ile Gly Tyr His Glu Ala Phe Ser His Arg Ile Met Gly Gly Ala Asp
 355 360 365
 Val Ile Leu Val Pro Ser Arg Phe Glu Pro Cys Gly Leu Thr Gln Leu
 370 375 380
 Tyr Gly Leu Lys Tyr Gly Thr Leu Pro Leu Val Arg Arg Thr Gly Gly
 385 390 395 400
 Leu Ala Asp Thr Val Ser Asp Cys Ser Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly
 405 410 415
 Val Ala Ser Gly Phe Val Phe Glu Asp Ser Asn Ala Trp Ser Leu Leu
 420 425 430
 Arg Ala Ile Arg Arg Ala Phe Val Leu Trp Ser Arg Pro Ser Leu Trp
 435 440 445
 Arg Phe Val Gln Arg Gln Ala Met Ala Met Asp Phe Ser Trp Gln Val
 450 455 460
 Ala Ala Lys Ser Tyr Arg Glu Leu Tyr Tyr Arg Leu Lys
 465 470 475

<210> 13
 <211> 2448
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(2448)

<400> 13
 atg aat gct ccg ttt aca tat tca tcg ccc acg ctt agc gta gaa gct 48
 Met Asn Ala Pro Phe Thr Tyr Ser Ser Pro Thr Leu Ser Val Glu Ala
 1 5 10 15
 ctt aag cac tct atc gct tac aag ctg atg ttt acg att gga aag gac 96
 Leu Lys His Ser Ile Ala Tyr Lys Leu Met Phe Thr Ile Gly Lys Asp
 20 25 30

ccg gtc gtc gcc aat aaa cat gaa tgg ctg aac gca acg tta ttt gct	144
Pro Val Val Ala Asn Lys His Glu Trp Leu Asn Ala Thr Leu Phe Ala	
35 40 45	
gtg cgc gat cgt ctc gtg gag cgc tgg tta cgt tca aac cgt gcc cag	192
Val Arg Asp Arg Leu Val Glu Arg Trp Leu Arg Ser Asn Arg Ala Gln	
50 55 60	
ttg tcg caa gaa act cgt cag gtt tac tac ctg tcg atg gag ttt ttg	240
Leu Ser Gln Glu Thr Arg Gln Val Tyr Tyr Leu Ser Met Glu Phe Leu	
65 70 75 80	
att ggc cgt acg ctc tcc aac gcc atg ttg tcg cta gga att tac gaa	288
Ile Gly Arg Thr Leu Ser Asn Ala Met Leu Ser Leu Gly Ile Tyr Glu	
85 90 95	
gat gta cag ggc gca ctg gaa gcg atg ggg tta aat ctc gaa gag ctg	336
Asp Val Gln Gly Ala Leu Glu Ala Met Gly Leu Asn Leu Glu Glu Leu	
100 105 110	
att gat gaa gaa aat gac cca ggc ctc ggt aac ggt ggc ctg gga cgt	384
Ile Asp Glu Glu Asn Asp Pro Gly Leu Gly Asn Gly Gly Leu Gly Arg	
115 120 125	
ctg gcg gct tgc ttc ctt gat tct ctg gcg acg tta ggg ttg ccg ggg	432
Leu Ala Ala Cys Phe Leu Asp Ser Leu Ala Thr Leu Gly Leu Pro Gly	
130 135 140	
cgc ggt tac ggc atc cgc tat gac tac ggt atg ttc aag cag aac atc	480
Arg Gly Tyr Gly Ile Arg Tyr Asp Tyr Gly Met Phe Lys Gln Asn Ile	
145 150 155 160	
gtt aac ggt agc cag aaa gag tcg cca gac tac tgg ctg gaa tac ggt	528
Val Asn Gly Ser Gln Lys Glu Ser Pro Asp Tyr Trp Leu Glu Tyr Gly	
165 170 175	
aac ccg tgg gaa ttc aaa cgc cac aac acg cgc tat aaa gtc cgt ttt	576
Asn Pro Trp Glu Phe Lys Arg His Asn Thr Arg Tyr Lys Val Arg Phe	
180 185 190	
ggc ggt cgc att cag cag gaa ggt aaa aaa acg cgc tgg att gaa acc	624
Gly Gly Arg Ile Gln Gln Glu Gly Lys Lys Thr Arg Trp Ile Glu Thr	
195 200 205	
gaa gag att ctg gga gtc gct tac gat cag ata atc cct ggt tac gac	672
Glu Glu Ile Leu Gly Val Ala Tyr Asp Gln Ile Ile Pro Gly Tyr Asp	
210 215 220	
acc gac gcg acc aac acg ctg cgt ttg tgg agt gcg caa gcc agt agc	720
Thr Asp Ala Thr Asn Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ala Gln Ala Ser Ser	
225 230 235 240	
gaa att aac ctc ggt aaa ttc aac cag ggt gac tac ttc gcg gca gtg	768
Glu Ile Asn Leu Gly Lys Phe Asn Gln Gly Asp Tyr Phe Ala Ala Val	
245 250 255	
gaa gat aaa aac cac tcc gag aac gta tct cgc gta ctg tat ccg gat	816
Glu Asp Lys Asn His Ser Glu Asn Val Ser Arg Val Leu Tyr Pro Asp	
260 265 270	
gac tcc acc tac tcc ggg cgt gag ctg cgc ctg cgt cag gaa tac ttc	864
Asp Ser Thr Tyr Ser Gly Arg Glu Leu Arg Leu Arg Gln Glu Tyr Phe	

275	280	285	
ctg gtt tcc tcg acc att cag gac att tta agc cgc cat tat cag ttg Leu Val Ser Ser Thr Ile Gln Asp Ile Leu Ser Arg His Tyr Gln Leu 290 295 300			912
cat aaa acc tac gat aac ctg gcg gat aaa atc gcg att cat ctc aat His Lys Thr Tyr Asp Asn Leu Ala Asp Lys Ile Ala Ile His Leu Asn 305 310 315 320			960
gat acc cat ccg gta ctg tcg att cct gag atg atg cgt ctg ctg atc Asp Thr His Pro Val Leu Ser Ile Pro Glu Met Met Arg Leu Leu Ile 325 330 335			1008
gat gag cac caa ttt agc tgg gac gac gcg ttt gag gtg tgt tgt cag Asp Glu His Gln Phe Ser Trp Asp Asp Ala Phe Glu Val Cys Cys Gln 340 345 350			1056
gtc ttc tcc tac act aac cac acg ctg atg agc gag gcg ctg gaa acc Val Phe Ser Tyr Thr Asn His Thr Leu Met Ser Glu Ala Leu Glu Thr 355 360 365			1104
tgg ccg gtt gat atg ctg ggt aaa att ctg ccg cgt cac ctg cag atc Trp Pro Val Asp Met Leu Gly Lys Ile Leu Pro Arg His Leu Gln Ile 370 375 380			1152
atc ttt gaa atc aac gac tat ttc ctg aaa acc ttg cag gaa cag tat Ile Phe Glu Ile Asn Asp Tyr Phe Leu Lys Thr Leu Gln Glu Gln Tyr 385 390 395 400			1200
ccg aac gat acc gat ctg ctg gga cgg gcg tcg atc att gat gaa tcc Pro Asn Asp Thr Asp Leu Leu Gly Arg Ala Ser Ile Ile Asp Glu Ser 405 410 415			1248
aac ggt cgt cgt gtg cgt atg gcc tgg ctg gcg gtt gtt gtg agc cac Asn Gly Arg Arg Val Arg Met Ala Trp Leu Ala Val Val Val Ser His 420 425 430			1296
aaa gtt aac ggt gta tcg gaa ctg cac tct aat ctg atg gtg caa tcg Lys Val Asn Gly Val Ser Glu Leu His Ser Asn Leu Met Val Gln Ser 435 440 445			1344
ttg ttt gcc gac ttt gcg aaa atc ttc ccg ggt cgt ttc acc aac gtc Leu Phe Ala Asp Phe Ala Lys Ile Phe Pro Gly Arg Phe Thr Asn Val 450 455 460			1392
acc aac ggt gtg acg ccg cgt cgc tgg ctg gcg gta gcg aac cca tcg Thr Asn Gly Val Thr Pro Arg Arg Trp Leu Ala Val Ala Asn Pro Ser 465 470 475 480			1440
ctt tca gcc gtg ctg gac gaa cac ctg ggc cgt aac tgg cgc acc gac Leu Ser Ala Val Leu Asp Glu His Leu Gly Arg Asn Trp Arg Thr Asp 485 490 495			1488
ctt agc ctg ctt aat gag ctg caa caa cac tgt gat ttc cca atg gtt Leu Ser Leu Leu Asn Glu Leu Gln Gln His Cys Asp Phe Pro Met Val 500 505 510			1536
aat cac gct gtg cat cag gcg aag ctg gag aac aaa aag cgt ctg gca Asn His Ala Val His Gln Ala Lys Leu Glu Asn Lys Lys Arg Leu Ala 515 520 525			1584
gag tat atc gcc cag cag ctg aat gtg gtg gtg aat cca aag gcg ttg			1632

Glu 530	Tyr	Ile	Ala	Gln	Gln	Leu 535	Asn	Val	Val	Val	Asn 540	Pro	Lys	Ala	Leu	
ttc	gat	gta	caa	atc	aaa	cgt	att	cac	gaa	tac	aaa	cgt	caa	ttg	atg	1680
Phe 545	Asp	Val	Gln	Ile	Lys 550	Arg	Ile	His	Glu	Tyr 555	Lys	Arg	Gln	Leu	Met 560	
aat	gtg	ttg	cat	gtg	att	acc	cgc	tat	aac	cgc	atc	aag	gcc	gac	ccg	1728
Asn 565	Val	Leu	His	Val	Ile	Thr	Arg	Tyr 570	Asn	Arg	Ile	Lys	Ala	Asp	Pro 575	
gat	gcg	aag	tgg	gta	ccg	cgc	gtg	aat	att	ttt	ggc	ggt	aag	gcg	gct	1776
Asp 580	Ala	Lys	Trp	Val	Pro	Arg	Val	Asn 585	Ile	Phe	Gly	Gly	Lys 590	Ala	Ala	
tcg	gcc	tat	tac	atg	gcg	aag	cac	att	att	cat	ttg	atc	aat	gac	gta	1824
Ser 595	Ala	Tyr	Tyr	Met	Ala	Lys	His 600	Ile	Ile	His	Leu 605	Ile	Asn	Asp	Val	
gcg	aaa	gtg	atc	aac	aac	gat	ccg	cag	att	ggc	gat	aag	ctg	aaa	gtc	1872
Ala 610	Lys	Val	Ile	Asn	Asn	Asp 615	Pro	Gln	Ile	Gly	Asp 620	Lys	Leu	Lys	Val	
gtg	ttc	atc	ccg	aac	tac	agc	gtt	agc	ctg	gcg	cag	ttg	atc	att	ccg	1920
Val 625	Phe	Ile	Pro	Asn	Tyr 630	Ser	Val	Ser	Leu	Ala 635	Gln	Leu	Ile	Ile	Pro 640	
gcg	gca	gat	ctg	tct	gaa	cag	att	tcg	ctg	gca	ggg	acg	gaa	gct	tcc	1968
Ala 645	Ala	Asp	Leu	Ser	Glu 645	Gln	Ile	Ser 650	Leu	Ala	Gly	Thr	Glu 655	Ala	Ser	
ggc	acc	agt	aac	atg	aag	ttt	gcg	ctt	aac	ggt	gcg	ctg	act	atc	ggt	2016
Gly 660	Thr	Ser	Asn	Met	Lys	Phe	Ala 665	Leu	Asn	Gly	Ala	Leu 670	Thr	Ile	Gly	
acg	ttg	gac	ggt	gcg	aat	gtc	gag	atg	ctg	gat	cat	gtc	ggt	gct	gac	2064
Thr 675	Leu	Asp	Gly	Ala	Asn	Val 680	Glu	Met	Leu	Asp 685	His	Val	Gly	Ala	Asp	
aat	atc	ttt	att	ttt	ggt	aac	aca	gcg	gaa	gaa	gtg	gaa	gaa	ctg	cgt	2112
Asn 690	Ile	Phe	Ile	Phe	Gly 695	Asn	Thr	Ala	Glu	Glu 700	Val	Glu	Glu	Leu	Arg	
cgt	cag	ggc	tac	aaa	ccg	cgt	gaa	tac	tac	gag	aaa	gat	gag	gag	ctg	2160
Arg 705	Gln	Gly	Tyr	Lys	Pro 710	Arg	Glu	Tyr	Tyr	Glu 715	Lys	Asp	Glu	Glu	Leu 720	
cat	cag	gtg	ctg	acg	caa	atc	ggc	agc	ggt	gta	ttc	agt	ccg	gaa	gat	2208
His 725	Gln	Val	Leu	Thr	Gln	Ile	Gly	Ser 730	Gly	Val	Phe	Ser	Pro 735	Glu	Asp	
ccg	ggt	cgc	tat	cgc	gat	ctg	gtt	gat	tcg	ctg	atc	aac	ttc	ggc	gat	2256
Pro 740	Gly	Arg	Tyr	Arg	Asp	Leu	Val 745	Asp	Ser	Leu	Ile	Asn	Phe 750	Gly	Asp	
cac	tac	cag	gta	ctg	gcg	gat	tat	cgc	agc	tat	gtc	gat	tgt	cag	gat	2304
His 755	Tyr	Gln	Val	Leu	Ala	Asp 760	Tyr	Arg	Ser	Tyr	Val 765	Asp	Cys	Gln	Asp	
aaa	gtc	gat	gaa	ctc	tac	gag	ctt	cag	gaa	gag	tgg	acc	gca	aaa	gcg	2352
Lys 770	Val	Asp	Glu	Leu	Tyr 775	Glu	Leu	Gln	Glu	Glu 780	Trp	Thr	Ala	Lys	Ala	

atg ctg aac att gcc aat atg ggc tac ttc tct tct gac cgt act atc 2400
 Met Leu Asn Ile Ala Asn Met Gly Tyr Phe Ser Ser Asp Arg Thr Ile
 785 790 795 800

aaa gag tac gcc gat cat atc tgg cat atc gat ccg gtg aga ttg taa 2448
 Lys Glu Tyr Ala Asp His Ile Trp His Ile Asp Pro Val Arg Leu
 805 810 815

<210> 14
 <211> 815
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 14
 Met Asn Ala Pro Phe Thr Tyr Ser Ser Pro Thr Leu Ser Val Glu Ala
 1 5 10 15
 Leu Lys His Ser Ile Ala Tyr Lys Leu Met Phe Thr Ile Gly Lys Asp
 20 25 30
 Pro Val Val Ala Asn Lys His Glu Trp Leu Asn Ala Thr Leu Phe Ala
 35 40 45
 Val Arg Asp Arg Leu Val Glu Arg Trp Leu Arg Ser Asn Arg Ala Gln
 50 55 60
 Leu Ser Gln Glu Thr Arg Gln Val Tyr Tyr Leu Ser Met Glu Phe Leu
 65 70 75 80
 Ile Gly Arg Thr Leu Ser Asn Ala Met Leu Ser Leu Gly Ile Tyr Glu
 85 90 95
 Asp Val Gln Gly Ala Leu Glu Ala Met Gly Leu Asn Leu Glu Glu Leu
 100 105 110
 Ile Asp Glu Glu Asn Asp Pro Gly Leu Gly Asn Gly Gly Leu Gly Arg
 115 120 125
 Leu Ala Ala Cys Phe Leu Asp Ser Leu Ala Thr Leu Gly Leu Pro Gly
 130 135 140
 Arg Gly Tyr Gly Ile Arg Tyr Asp Tyr Gly Met Phe Lys Gln Asn Ile
 145 150 155 160
 Val Asn Gly Ser Gln Lys Glu Ser Pro Asp Tyr Trp Leu Glu Tyr Gly
 165 170 175
 Asn Pro Trp Glu Phe Lys Arg His Asn Thr Arg Tyr Lys Val Arg Phe
 180 185 190
 Gly Gly Arg Ile Gln Gln Glu Gly Lys Lys Thr Arg Trp Ile Glu Thr
 195 200 205
 Glu Glu Ile Leu Gly Val Ala Tyr Asp Gln Ile Ile Pro Gly Tyr Asp
 210 215 220
 Thr Asp Ala Thr Asn Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ala Gln Ala Ser Ser
 225 230 235 240
 Glu Ile Asn Leu Gly Lys Phe Asn Gln Gly Asp Tyr Phe Ala Ala Val
 245 250 255

Glu	Asp	Lys	Asn	His	Ser	Glu	Asn	Val	Ser	Arg	Val	Leu	Tyr	Pro	Asp		
			260					265					270				
Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Gly	Arg	Glu	Leu	Arg	Leu	Arg	Gln	Glu	Tyr	Phe		
		275					280					285					
Leu	Val	Ser	Ser	Thr	Ile	Gln	Asp	Ile	Leu	Ser	Arg	His	Tyr	Gln	Leu		
	290					295					300						
His	Lys	Thr	Tyr	Asp	Asn	Leu	Ala	Asp	Lys	Ile	Ala	Ile	His	Leu	Asn		
305					310					315					320		
Asp	Thr	His	Pro	Val	Leu	Ser	Ile	Pro	Glu	Met	Met	Arg	Leu	Leu	Ile		
				325					330					335			
Asp	Glu	His	Gln	Phe	Ser	Trp	Asp	Asp	Ala	Phe	Glu	Val	Cys	Cys	Gln		
			340					345					350				
Val	Phe	Ser	Tyr	Thr	Asn	His	Thr	Leu	Met	Ser	Glu	Ala	Leu	Glu	Thr		
		355					360					365					
Trp	Pro	Val	Asp	Met	Leu	Gly	Lys	Ile	Leu	Pro	Arg	His	Leu	Gln	Ile		
	370					375					380						
Ile	Phe	Glu	Ile	Asn	Asp	Tyr	Phe	Leu	Lys	Thr	Leu	Gln	Glu	Gln	Tyr		
385				390						395					400		
Pro	Asn	Asp	Thr	Asp	Leu	Leu	Gly	Arg	Ala	Ser	Ile	Ile	Asp	Glu	Ser		
				405					410					415			
Asn	Gly	Arg	Arg	Val	Arg	Met	Ala	Trp	Leu	Ala	Val	Val	Val	Ser	His		
			420					425					430				
Lys	Val	Asn	Gly	Val	Ser	Glu	Leu	His	Ser	Asn	Leu	Met	Val	Gln	Ser		
		435					440					445					
Leu	Phe	Ala	Asp	Phe	Ala	Lys	Ile	Phe	Pro	Gly	Arg	Phe	Thr	Asn	Val		
	450					455					460						
Thr	Asn	Gly	Val	Thr	Pro	Arg	Arg	Trp	Leu	Ala	Val	Ala	Asn	Pro	Ser		
465					470					475					480		
Leu	Ser	Ala	Val	Leu	Asp	Glu	His	Leu	Gly	Arg	Asn	Trp	Arg	Thr	Asp		
				485					490					495			
Leu	Ser	Leu	Leu	Asn	Glu	Leu	Gln	Gln	His	Cys	Asp	Phe	Pro	Met	Val		
			500					505					510				
Asn	His	Ala	Val	His	Gln	Ala	Lys	Leu	Glu	Asn	Lys	Lys	Arg	Leu	Ala		
		515					520					525					
Glu	Tyr	Ile	Ala	Gln	Gln	Leu	Asn	Val	Val	Val	Asn	Pro	Lys	Ala	Leu		
	530					535					540						
Phe	Asp	Val	Gln	Ile	Lys	Arg	Ile	His	Glu	Tyr	Lys	Arg	Gln	Leu	Met		
545					550					555					560		
Asn	Val	Leu	His	Val	Ile	Thr	Arg	Tyr	Asn	Arg	Ile	Lys	Ala	Asp	Pro		
				565					570					575			
Asp	Ala	Lys	Trp	Val	Pro	Arg	Val	Asn	Ile	Phe	Gly	Gly	Lys	Ala	Ala		
			580					585					590				

Ser Ala Tyr Tyr Met Ala Lys His Ile Ile His Leu Ile Asn Asp Val
 595 600 605
 Ala Lys Val Ile Asn Asn Asp Pro Gln Ile Gly Asp Lys Leu Lys Val
 610 615 620
 Val Phe Ile Pro Asn Tyr Ser Val Ser Leu Ala Gln Leu Ile Ile Pro
 625 630 635 640
 Ala Ala Asp Leu Ser Glu Gln Ile Ser Leu Ala Gly Thr Glu Ala Ser
 645 650 655
 Gly Thr Ser Asn Met Lys Phe Ala Leu Asn Gly Ala Leu Thr Ile Gly
 660 665 670
 Thr Leu Asp Gly Ala Asn Val Glu Met Leu Asp His Val Gly Ala Asp
 675 680 685
 Asn Ile Phe Ile Phe Gly Asn Thr Ala Glu Glu Val Glu Glu Leu Arg
 690 695 700
 Arg Gln Gly Tyr Lys Pro Arg Glu Tyr Tyr Glu Lys Asp Glu Glu Leu
 705 710 715 720
 His Gln Val Leu Thr Gln Ile Gly Ser Gly Val Phe Ser Pro Glu Asp
 725 730 735
 Pro Gly Arg Tyr Arg Asp Leu Val Asp Ser Leu Ile Asn Phe Gly Asp
 740 745 750
 His Tyr Gln Val Leu Ala Asp Tyr Arg Ser Tyr Val Asp Cys Gln Asp
 755 760 765
 Lys Val Asp Glu Leu Tyr Glu Leu Gln Glu Glu Trp Thr Ala Lys Ala
 770 775 780
 Met Leu Asn Ile Ala Asn Met Gly Tyr Phe Ser Ser Asp Arg Thr Ile
 785 790 795 800
 Lys Glu Tyr Ala Asp His Ile Trp His Ile Asp Pro Val Arg Leu
 805 810 815

<210> 15
 <211> 1974
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1974)

<400> 15
 atg aca caa ctc gcc att ggc aaa ccc gct ccc ctc ggc gcg cat tac 48
 Met Thr Gln Leu Ala Ile Gly Lys Pro Ala Pro Leu Gly Ala His Tyr
 1 5 10 15
 gac ggt cag ggc gtc aac ttc aca ctt ttc tcc gct cat gcc gag cgg 96
 Asp Gly Gln Gly Val Asn Phe Thr Leu Phe Ser Ala His Ala Glu Arg
 20 25 30
 gta gaa ctg tgt gtc ttt gac gcc aat ggc cag gaa cat cgc tat gac 144
 Val Glu Leu Cys Val Phe Asp Ala Asn Gly Gln Glu His Arg Tyr Asp

35	40	45	
ttg cca ggg cac agt ggc gac att tgg cac ggt tat ctg ccg gat gcg Leu Pro Gly His Ser Gly Asp Ile Trp His Gly Tyr Leu Pro Asp Ala 50 55 60			192
cgc ccg ggt ttg cgt tat ggt tat cgc gtt cat ggc ccc tgg caa ccc Arg Pro Gly Leu Arg Tyr Gly Tyr Arg Val His Gly Pro Trp Gln Pro 65 70 75 80			240
gcc gag ggg cat cgc ttt aac ccg gcg aag ttg ttg att gat cct tgc Ala Glu Gly His Arg Phe Asn Pro Ala Lys Leu Leu Ile Asp Pro Cys 85 90 95			288
gcg cgg caa att gac ggg gag ttt aaa gat aac ccg ctg ctg cac gcc Ala Arg Gln Ile Asp Gly Glu Phe Lys Asp Asn Pro Leu Leu His Ala 100 105 110			336
ggc cat aat gaa cct gac tat cgc gac aac gcc gcc att gcg ccg aaa Gly His Asn Glu Pro Asp Tyr Arg Asp Asn Ala Ala Ile Ala Pro Lys 115 120 125			384
tgc gta gtg gtg gtt gat cac tat gac tgg gaa gat gat gcc ccg ccg Cys Val Val Val Val Asp His Tyr Asp Trp Glu Asp Asp Ala Pro Pro 130 135 140			432
cgc acg ccg tgg ggc agc acc atc att tat gaa gcc cat gtc aaa gga Arg Thr Pro Trp Gly Ser Thr Ile Ile Tyr Glu Ala His Val Lys Gly 145 150 155 160			480
tta acg tac ttg cac ccg gag atc ccg gtc gag atc cgt ggc act tat Leu Thr Tyr Leu His Pro Glu Ile Pro Val Glu Ile Arg Gly Thr Tyr 165 170 175			528
aaa gcc ctc ggg cat ccg gtg atg atc aac tat ttg aaa caa ttg ggc Lys Ala Leu Gly His Pro Val Met Ile Asn Tyr Leu Lys Gln Leu Gly 180 185 190			576
att acc gcg ctg gaa ctg ctg cca gtg gcg cag ttt gcc agt gaa cca Ile Thr Ala Leu Glu Leu Leu Pro Val Ala Gln Phe Ala Ser Glu Pro 195 200 205			624
cgt ctg caa cgc atg ggg cta agt aac tac tgg ggt tac aac ccg gtg Arg Leu Gln Arg Met Gly Leu Ser Asn Tyr Trp Gly Tyr Asn Pro Val 210 215 220			672
gcg atg ttt gcg ctg cat ccg gcg tat gcc tgc tcg cca gaa acg gcg Ala Met Phe Ala Leu His Pro Ala Tyr Ala Cys Ser Pro Glu Thr Ala 225 230 235 240			720
ctg gat gag ttt cgc gat gca atc aaa gca ctg cat aaa gcg ggt atc Leu Asp Glu Phe Arg Asp Ala Ile Lys Ala Leu His Lys Ala Gly Ile 245 250 255			768
gaa gtc att ctt gat atc gtg ctc aac cat agt gcg gaa ctg gac ctc Glu Val Ile Leu Asp Ile Val Leu Asn His Ser Ala Glu Leu Asp Leu 260 265 270			816
gac ggc ccg tta ttc tcg ctg cgt ggg atc gat aac cgt agc tat tat Asp Gly Pro Leu Phe Ser Leu Arg Gly Ile Asp Asn Arg Ser Tyr Tyr 275 280 285			864
tgg ata aga gaa gac ggc gat tat cac aac tgg acc ggt tgc ggc aac			912

Trp 290	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Asp 295	Tyr	His	Asn	Trp	Thr 300	Gly	Cys	Gly	Asn	
acg	ctc	aat	ttg	agt	cat	ccg	gcg	gtg	gtg	gat	tat	gcc	agc	gcc	tgc	960
Thr 305	Leu	Asn	Leu	Ser	His	Pro	Ala	Val	Val	Asp	Tyr	Ala	Ser	Ala	Cys	
					310					315					320	
ctg	cgt	tat	tgg	gta	gaa	acc	tgc	cac	gtc	gat	ggg	ttc	cg	ttt	gat	1008
Leu	Arg	Tyr	Trp	Val	Glu	Thr	Cys	His	Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Phe	Asp	
				325					330					335		
ctg	gcg	gca	gtc	atg	ggc	cgt	acg	cca	gag	ttc	cgt	cag	gat	gcg	ccg	1056
Leu	Ala	Ala	Val	Met	Gly	Arg	Thr	Pro	Glu	Phe	Arg	Gln	Asp	Ala	Pro	
			340					345					350			
ttg	ttt	acc	gct	atc	cag	aac	tgc	ccg	gtg	ctc	tcg	cag	gtg	aag	tta	1104
Leu	Phe	Thr	Ala	Ile	Gln	Asn	Cys	Pro	Val	Leu	Ser	Gln	Val	Lys	Leu	
		355					360					365				
att	gct	gaa	ccg	tgg	gat	atc	gct	cct	ggg	ggg	tat	cag	gtg	gga	aat	1152
Ile	Ala	Glu	Pro	Trp	Asp	Ile	Ala	Pro	Gly	Gly	Tyr	Gln	Val	Gly	Asn	
		370				375					380					
ttc	ccg	ccg	ctg	ttt	gcc	gag	tgg	aac	gat	cat	ttc	cg	gat	gct	gcc	1200
Phe	Pro	Pro	Leu	Phe	Ala	Glu	Trp	Asn	Asp	His	Phe	Arg	Asp	Ala	Ala	
385					390				395						400	
cgt	cgt	ttc	tgg	cta	cat	tat	gat	ttg	cct	ctg	ggg	gcg	ttt	gcc	ggg	1248
Arg	Arg	Phe	Trp	Leu	His	Tyr	Asp	Leu	Pro	Leu	Gly	Ala	Phe	Ala	Gly	
				405					410					415		
cgt	ttt	gct	gcc	tcc	agc	gat	gtt	ttt	aaa	cgt	aat	ggg	cgt	ctg	ccg	1296
Arg	Phe	Ala	Ala	Ser	Ser	Asp	Val	Phe	Lys	Arg	Asn	Gly	Arg	Leu	Pro	
			420					425					430			
agt	gcc	gcg	att	aat	ctc	gtc	acc	gcg	cat	gac	ggg	ttt	acg	ctt	cg	1344
Ser	Ala	Ala	Ile	Asn	Leu	Val	Thr	Ala	His	Asp	Gly	Phe	Thr	Leu	Arg	
		435					440					445				
gac	tgc	gtt	tgc	ttc	aac	cat	aaa	cac	aat	gaa	gca	aac	gga	gaa	gaa	1392
Asp	Cys	Val	Cys	Phe	Asn	His	Lys	His	Asn	Glu	Ala	Asn	Gly	Glu	Glu	
		450				455					460					
aat	cg	gac	ggg	acc	aac	aac	aat	tac	agt	aac	aat	cat	ggg	aaa	gaa	1440
Asn	Arg	Asp	Gly	Thr	Asn	Asn	Asn	Tyr	Ser	Asn	Asn	His	Gly	Lys	Glu	
465					470				475						480	
ggg	tta	ggc	ggg	tct	ctt	gac	ctg	gtt	gaa	cgg	cgg	cg	gac	agc	att	1488
Gly	Leu	Gly	Gly	Ser	Leu	Asp	Leu	Val	Glu	Arg	Arg	Arg	Asp	Ser	Ile	
				485					490					495		
cac	gcc	ctg	tta	aca	acg	ttg	ttg	ctc	tcc	cag	ggg	acg	ccg	atg	tta	1536
His	Ala	Leu	Leu	Thr	Thr	Leu	Leu	Leu	Ser	Gln	Gly	Thr	Pro	Met	Leu	
				500				505						510		
ctg	gcc	ggg	gac	gaa	cat	ggg	cac	agc	cag	cat	ggc	aat	aac	aat	gcc	1584
Leu	Ala	Gly	Asp	Glu	His	Gly	His	Ser	Gln	His	Gly	Asn	Asn	Asn	Ala	
		515					520					525				
tac	tgt	cag	gat	aac	caa	tta	acc	tgg	ttg	gac	tgg	tcg	cag	gca	agc	1632
Tyr	Cys	Gln	Asp	Asn	Gln	Leu	Thr	Trp	Leu	Asp	Trp	Ser	Gln	Ala	Ser	
		530				535					540					

agt ggt tta acc gca ttt acc gcc gcg tta atc cat ctg cgc aag cgc 1680
 Ser Gly Leu Thr Ala Phe Thr Ala Ala Leu Ile His Leu Arg Lys Arg
 545 550 555 560

att ccc gct ttg gtg gag aat cgc tgg tgg gaa gaa ggc gac ggc aat 1728
 Ile Pro Ala Leu Val Glu Asn Arg Trp Trp Glu Glu Gly Asp Gly Asn
 565 570 575

gtc cgt tgg cta aat cga tat gct caa cct tta agc acg gat gag tgg 1776
 Val Arg Trp Leu Asn Arg Tyr Ala Gln Pro Leu Ser Thr Asp Glu Trp
 580 585 590

caa aac ggg ccg aaa cag ctg caa att ctg ctc tcg gat cgc ttt ttg 1824
 Gln Asn Gly Pro Lys Gln Leu Gln Ile Leu Leu Ser Asp Arg Phe Leu
 595 600 605

atc gca att aac gcc acg ctt gag gta aca gag att gtt tta cct gct 1872
 Ile Ala Ile Asn Ala Thr Leu Glu Val Thr Glu Ile Val Leu Pro Ala
 610 615 620

ggg gag tgg cac gcc att ccc cca ttc gct gga gag gat aac cca gtg 1920
 Gly Glu Trp His Ala Ile Pro Pro Phe Ala Gly Glu Asp Asn Pro Val
 625 630 635 640

att acg gct gtc tgg cag gga cct gca cac gga ttg tgt gtg ttc cag 1968
 Ile Thr Ala Val Trp Gln Gly Pro Ala His Gly Leu Cys Val Phe Gln
 645 650 655

aga tga 1974
 Arg

<210> 16
 <211> 657
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 16
 Met Thr Gln Leu Ala Ile Gly Lys Pro Ala Pro Leu Gly Ala His Tyr
 1 5 10 15
 Asp Gly Gln Gly Val Asn Phe Thr Leu Phe Ser Ala His Ala Glu Arg
 20 25 30
 Val Glu Leu Cys Val Phe Asp Ala Asn Gly Gln Glu His Arg Tyr Asp
 35 40 45
 Leu Pro Gly His Ser Gly Asp Ile Trp His Gly Tyr Leu Pro Asp Ala
 50 55 60
 Arg Pro Gly Leu Arg Tyr Gly Tyr Arg Val His Gly Pro Trp Gln Pro
 65 70 75 80
 Ala Glu Gly His Arg Phe Asn Pro Ala Lys Leu Leu Ile Asp Pro Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Ile Asp Gly Glu Phe Lys Asp Asn Pro Leu Leu His Ala
 100 105 110
 Gly His Asn Glu Pro Asp Tyr Arg Asp Asn Ala Ala Ile Ala Pro Lys
 115 120 125
 Cys Val Val Val Val Asp His Tyr Asp Trp Glu Asp Asp Ala Pro Pro

130					135					140					
Arg	Thr	Pro	Trp	Gly	Ser	Thr	Ile	Ile	Tyr	Glu	Ala	His	Val	Lys	Gly
145					150					155					160
Leu	Thr	Tyr	Leu	His	Pro	Glu	Ile	Pro	Val	Glu	Ile	Arg	Gly	Thr	Tyr
				165					170					175	
Lys	Ala	Leu	Gly	His	Pro	Val	Met	Ile	Asn	Tyr	Leu	Lys	Gln	Leu	Gly
			180					185					190		
Ile	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Leu	Pro	Val	Ala	Gln	Phe	Ala	Ser	Glu	Pro
		195					200					205			
Arg	Leu	Gln	Arg	Met	Gly	Leu	Ser	Asn	Tyr	Trp	Gly	Tyr	Asn	Pro	Val
	210					215					220				
Ala	Met	Phe	Ala	Leu	His	Pro	Ala	Tyr	Ala	Cys	Ser	Pro	Glu	Thr	Ala
225						230					235				240
Leu	Asp	Glu	Phe	Arg	Asp	Ala	Ile	Lys	Ala	Leu	His	Lys	Ala	Gly	Ile
				245					250					255	
Glu	Val	Ile	Leu	Asp	Ile	Val	Leu	Asn	His	Ser	Ala	Glu	Leu	Asp	Leu
			260					265					270		
Asp	Gly	Pro	Leu	Phe	Ser	Leu	Arg	Gly	Ile	Asp	Asn	Arg	Ser	Tyr	Tyr
	275						280					285			
Trp	Ile	Arg	Glu	Asp	Gly	Asp	Tyr	His	Asn	Trp	Thr	Gly	Cys	Gly	Asn
	290					295					300				
Thr	Leu	Asn	Leu	Ser	His	Pro	Ala	Val	Val	Asp	Tyr	Ala	Ser	Ala	Cys
305						310					315				320
Leu	Arg	Tyr	Trp	Val	Glu	Thr	Cys	His	Val	Asp	Gly	Phe	Arg	Phe	Asp
				325					330					335	
Leu	Ala	Ala	Val	Met	Gly	Arg	Thr	Pro	Glu	Phe	Arg	Gln	Asp	Ala	Pro
			340					345					350		
Leu	Phe	Thr	Ala	Ile	Gln	Asn	Cys	Pro	Val	Leu	Ser	Gln	Val	Lys	Leu
		355					360					365			
Ile	Ala	Glu	Pro	Trp	Asp	Ile	Ala	Pro	Gly	Gly	Tyr	Gln	Val	Gly	Asn
	370					375					380				
Phe	Pro	Pro	Leu	Phe	Ala	Glu	Trp	Asn	Asp	His	Phe	Arg	Asp	Ala	Ala
385						390					395				400
Arg	Arg	Phe	Trp	Leu	His	Tyr	Asp	Leu	Pro	Leu	Gly	Ala	Phe	Ala	Gly
				405					410					415	
Arg	Phe	Ala	Ala	Ser	Ser	Asp	Val	Phe	Lys	Arg	Asn	Gly	Arg	Leu	Pro
			420					425					430		
Ser	Ala	Ala	Ile	Asn	Leu	Val	Thr	Ala	His	Asp	Gly	Phe	Thr	Leu	Arg
		435					440					445			
Asp	Cys	Val	Cys	Phe	Asn	His	Lys	His	Asn	Glu	Ala	Asn	Gly	Glu	Glu
	450					455					460				
Asn	Arg	Asp	Gly	Thr	Asn	Asn	Asn	Tyr	Ser	Asn	Asn	His	Gly	Lys	Glu

465		470		475		480
Gly Leu Gly Gly Ser Leu Asp Leu Val Glu Arg Arg Arg Asp Ser Ile						
		485		490		495
His Ala Leu Leu Thr Thr Leu Leu Leu Ser Gln Gly Thr Pro Met Leu						
		500		505		510
Leu Ala Gly Asp Glu His Gly His Ser Gln His Gly Asn Asn Asn Ala						
		515		520		525
Tyr Cys Gln Asp Asn Gln Leu Thr Trp Leu Asp Trp Ser Gln Ala Ser						
		530		535		540
Ser Gly Leu Thr Ala Phe Thr Ala Ala Leu Ile His Leu Arg Lys Arg						
		545		550		555
Ile Pro Ala Leu Val Glu Asn Arg Trp Trp Glu Glu Gly Asp Gly Asn						
		565		570		575
Val Arg Trp Leu Asn Arg Tyr Ala Gln Pro Leu Ser Thr Asp Glu Trp						
		580		585		590
Gln Asn Gly Pro Lys Gln Leu Gln Ile Leu Leu Ser Asp Arg Phe Leu						
		595		600		605
Ile Ala Ile Asn Ala Thr Leu Glu Val Thr Glu Ile Val Leu Pro Ala						
		610		615		620
Gly Glu Trp His Ala Ile Pro Pro Phe Ala Gly Glu Asp Asn Pro Val						
		625		630		635
Ile Thr Ala Val Trp Gln Gly Pro Ala His Gly Leu Cys Val Phe Gln						
		645		650		655

Arg

<210> 17
 <211> 2187
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(2187)

<400> 17	
atg tcc gat cgt atc gat aga gac gtg att aac gcg cta att gca ggc	48
Met Ser Asp Arg Ile Asp Arg Asp Val Ile Asn Ala Leu Ile Ala Gly	
1 5 10 15	
cat ttt gcg gat cct ttt tcc gta ctg gga atg cat aaa acc acc gcg	96
His Phe Ala Asp Pro Phe Ser Val Leu Gly Met His Lys Thr Thr Ala	
20 25 30	
gga ctg gaa gtc cgt gcc ctt tta ccc gac gct acc gat gtg tgg gtg	144
Gly Leu Glu Val Arg Ala Leu Leu Pro Asp Ala Thr Asp Val Trp Val	
35 40 45	
att gaa ccg aaa acc ggg cgc aaa ctc gca aaa ctg gag tgt ctc gac	192
Ile Glu Pro Lys Thr Gly Arg Lys Leu Ala Lys Leu Glu Cys Leu Asp	
50 55 60	

tca	cgg	gga	ttc	ttt	agc	ggc	gtc	att	ccg	cga	cgt	aag	aat	ttt	ttc	240
Ser	Arg	Gly	Phe	Phe	Ser	Gly	Val	Ile	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Phe	Phe	
65					70				75					80		
cgc	tat	cag	ttg	gct	gtt	gtc	tgg	cat	ggt	cag	caa	aac	ctg	att	gat	288
Arg	Tyr	Gln	Leu	Ala	Val	Val	Trp	His	Gly	Gln	Gln	Asn	Leu	Ile	Asp	
			85						90					95		
gat	cct	tac	cgt	ttt	ggt	ccg	cta	atc	cag	gaa	atg	gat	gcc	tgg	cta	336
Asp	Pro	Tyr	Arg	Phe	Gly	Pro	Leu	Ile	Gln	Glu	Met	Asp	Ala	Trp	Leu	
			100					105					110			
tta	tct	gaa	ggt	act	cac	ctg	cgc	ccg	tat	gaa	acc	tta	ggc	gcg	cat	384
Leu	Ser	Glu	Gly	Thr	His	Leu	Arg	Pro	Tyr	Glu	Thr	Leu	Gly	Ala	His	
		115					120					125				
gca	gat	act	atg	gat	ggc	gtc	aca	ggt	acg	cgt	ttc	tct	gtc	tgg	gct	432
Ala	Asp	Thr	Met	Asp	Gly	Val	Thr	Gly	Thr	Arg	Phe	Ser	Val	Trp	Ala	
	130					135					140					
cca	aac	gcc	cgt	cgg	gtc	tcg	gtg	gtt	ggg	caa	ttc	aac	tac	tgg	gac	480
Pro	Asn	Ala	Arg	Arg	Val	Ser	Val	Val	Gly	Gln	Phe	Asn	Tyr	Trp	Asp	
145					150				155						160	
ggt	cgc	cgt	cac	ccg	atg	cgc	ctg	cgt	aaa	gag	agc	ggc	atc	tgg	gaa	528
Gly	Arg	Arg	His	Pro	Met	Arg	Leu	Arg	Lys	Glu	Ser	Gly	Ile	Trp	Glu	
			165						170					175		
ctg	ttt	atc	cct	ggg	gcg	cat	aac	ggt	cag	ctc	tat	aaa	tac	gag	atg	576
Leu	Phe	Ile	Pro	Gly	Ala	His	Asn	Gly	Gln	Leu	Tyr	Lys	Tyr	Glu	Met	
			180					185					190			
att	gat	gcc	aat	ggc	aac	ttg	cgt	ctg	aag	tcc	gac	cct	tat	gcc	ttt	624
Ile	Asp	Ala	Asn	Gly	Asn	Leu	Arg	Leu	Lys	Ser	Asp	Pro	Tyr	Ala	Phe	
		195					200					205				
gaa	gcg	caa	atg	cgc	ccg	gaa	acc	gcg	tct	ctt	att	tgc	ggg	ctg	ccg	672
Glu	Ala	Gln	Met	Arg	Pro	Glu	Thr	Ala	Ser	Leu	Ile	Cys	Gly	Leu	Pro	
	210					215					220					
gaa	aag	gtt	gta	cag	act	gaa	gag	cgc	aaa	aaa	gcg	aat	cag	ttt	gat	720
Glu	Lys	Val	Val	Gln	Thr	Glu	Glu	Arg	Lys	Lys	Ala	Asn	Gln	Phe	Asp	
225					230				235						240	
gcg	cca	atc	tct	att	tat	gaa	gtt	cac	ctg	ggt	tcc	tgg	cgt	cgc	cac	768
Ala	Pro	Ile	Ser	Ile	Tyr	Glu	Val	His	Leu	Gly	Ser	Trp	Arg	Arg	His	
			245						250					255		
acc	gac	aac	aat	ttc	tgg	ttg	agc	tac	cgc	gag	ctg	gcc	gat	caa	ctg	816
Thr	Asp	Asn	Asn	Phe	Trp	Leu	Ser	Tyr	Arg	Glu	Leu	Ala	Asp	Gln	Leu	
			260					265					270			
gtg	cct	tat	gct	aaa	tgg	atg	ggc	ttt	acc	cac	ctc	gaa	cta	ctg	ccc	864
Val	Pro	Tyr	Ala	Lys	Trp	Met	Gly	Phe	Thr	His	Leu	Glu	Leu	Leu	Pro	
		275					280					285				
att	aac	gag	cat	ccc	ttc	gat	ggc	agt	tgg	ggt	tat	cag	cca	acc	ggc	912
Ile	Asn	Glu	His	Pro	Phe	Asp	Gly	Ser	Trp	Gly	Tyr	Gln	Pro	Thr	Gly	
		290				295					300					
ctg	tat	gcg	cca	acc	cgc	cgt	ttt	ggt	act	cgc	gac	gac	ttc	cgt	tat	960
Leu	Tyr	Ala	Pro	Thr	Arg	Arg	Phe	Gly	Thr	Arg	Asp	Asp	Phe	Arg	Tyr	

305	310	315	320	
ttc att gat gcc gca cac gca gct ggt ctg aac gtg att ctc gac tgg				1008
Phe Ile Asp Ala Ala His Ala Ala Gly Leu Asn Val Ile Leu Asp Trp	325	330	335	
gtg cca ggc cac ttc ccg act gat gac ttt gcg ctt gcc gaa ttt gat				1056
Val Pro Gly His Phe Pro Thr Asp Asp Phe Ala Leu Ala Glu Phe Asp	340	345	350	
ggc acg aac ttg tat gaa cac agc gat ccg cgt gaa ggc tat cat cag				1104
Gly Thr Asn Leu Tyr Glu His Ser Asp Pro Arg Glu Gly Tyr His Gln	355	360	365	
gac tgg aac acg ctg atc tac aac tat ggt cgc cgt gaa gtc agt aac				1152
Asp Trp Asn Thr Leu Ile Tyr Asn Tyr Gly Arg Arg Glu Val Ser Asn	370	375	380	
ttc ctc gtc ggt aac gcg ctt tac tgg att gaa cgt ttt ggt att gat				1200
Phe Leu Val Gly Asn Ala Leu Tyr Trp Ile Glu Arg Phe Gly Ile Asp	385	390	395	400
gcg ctg cgc gtc gat gcg gtg gcg tca atg att tat cgc gac tac agc				1248
Ala Leu Arg Val Asp Ala Val Ala Ser Met Ile Tyr Arg Asp Tyr Ser	405	410	415	
cgt aaa gag ggg gag tgg atc ccg aac gaa ttt ggc ggg cgc gag aat				1296
Arg Lys Glu Gly Glu Trp Ile Pro Asn Glu Phe Gly Gly Arg Glu Asn	420	425	430	
ctt gaa gcg att gaa ttc ttg cgt aat acc aac cgt att ctt ggt gag				1344
Leu Glu Ala Ile Glu Phe Leu Arg Asn Thr Asn Arg Ile Leu Gly Glu	435	440	445	
cag gtt tcc ggt gcg gtg aca atg gct gag gag tct acc gat ttc cct				1392
Gln Val Ser Gly Ala Val Thr Met Ala Glu Glu Ser Thr Asp Phe Pro	450	455	460	
ggc gtt tct cgt ccg cag gat atg ggc ggt ctg ggc ttc tgg tac aag				1440
Gly Val Ser Arg Pro Gln Asp Met Gly Gly Leu Gly Phe Trp Tyr Lys	465	470	475	480
tgg aac ctc ggc tgg atg cat gac acc ctg gac tac atg aag ctc gac				1488
Trp Asn Leu Gly Trp Met His Asp Thr Leu Asp Tyr Met Lys Leu Asp	485	490	495	
ccg gtt tat cgt cag tat cat cac gat aaa ctg acc ttc ggg att ctc				1536
Pro Val Tyr Arg Gln Tyr His His Asp Lys Leu Thr Phe Gly Ile Leu	500	505	510	
tac aac tac act gaa aac ttc gtc ctg ccg ttg tcg cat gat gaa gtg				1584
Tyr Asn Tyr Thr Glu Asn Phe Val Leu Pro Leu Ser His Asp Glu Val	515	520	525	
gtc cac ggt aaa aaa tcg att ctc gac cgc atg ccg ggc gac gca tgg				1632
Val His Gly Lys Lys Ser Ile Leu Asp Arg Met Pro Gly Asp Ala Trp	530	535	540	
cag aaa ttc gcg aac ctg cgc gcc tac tat ggc tgg atg tgg gca ttc				1680
Gln Lys Phe Ala Asn Leu Arg Ala Tyr Tyr Gly Trp Met Trp Ala Phe	545	550	555	560
ccg ggc aag aaa cta ctg ttc atg ggt aac gaa ttt gcc cag ggc cgc				1728

Pro Gly Lys Lys Leu Leu Phe Met Gly Asn Glu Phe Ala Gln Gly Arg	
565 570 575	
gag tgg aac cat gac gcc agc ctc gac tgg cat ctg ttg gaa ggc ggc	1776
Glu Trp Asn His Asp Ala Ser Leu Trp His Leu Leu Glu Gly Gly	
580 585 590	
gat aac tgg cac cac ggt gtc cag cgt ctg gtg cgc gat ctg aac ctc	1824
Asp Asn Trp His His Gly Val Gln Arg Leu Val Arg Asp Leu Asn Leu	
595 600 605	
acc tac cgc cac cat aaa gca atg cat gaa ctg gat ttt gac ccg tac	1872
Thr Tyr Arg His His Lys Ala Met His Glu Leu Asp Phe Asp Pro Tyr	
610 615 620	
ggc ttt gaa tgg ctg gtg gtg gat gac aaa gaa cgc tcg gtg ctg atc	1920
Gly Phe Glu Trp Leu Val Val Asp Asp Lys Glu Arg Ser Val Leu Ile	
625 630 635 640	
ttt gtg cgt cgc gat aaa gag ggt aac gaa atc atc gtt gcc agt aac	1968
Phe Val Arg Arg Asp Lys Glu Gly Asn Glu Ile Ile Val Ala Ser Asn	
645 650 655	
ttt acg ccg gta ccg cgt cat gat tat cgc ttc ggc ata aac cag ccg	2016
Phe Thr Pro Val Pro Arg His Asp Tyr Arg Phe Gly Ile Asn Gln Pro	
660 665 670	
ggc aaa tgg cgt gaa atc ctc aat acc gat tcc atg cac tat cac ggc	2064
Gly Lys Trp Arg Glu Ile Leu Asn Thr Asp Ser Met His Tyr His Gly	
675 680 685	
agt aat gca ggc aat ggc ggc acg gta cac agc gat gag att gcc agc	2112
Ser Asn Ala Gly Asn Gly Gly Thr Val His Ser Asp Glu Ile Ala Ser	
690 695 700	
cac ggt cgt cag cat tca cta agc ctg acg cta cca ccg ctg gcc act	2160
His Gly Arg Gln His Ser Leu Ser Leu Thr Leu Pro Pro Leu Ala Thr	
705 710 715 720	
atc tgg ctg gtt cgg gag gca gaa tga	2187
Ile Trp Leu Val Arg Glu Ala Glu	
725	

<210> 18

<211> 728

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 18

Met Ser Asp Arg Ile Asp Arg Asp Val Ile Asn Ala Leu Ile Ala Gly
1 5 10 15

His Phe Ala Asp Pro Phe Ser Val Leu Gly Met His Lys Thr Thr Ala
20 25 30

Gly Leu Glu Val Arg Ala Leu Leu Pro Asp Ala Thr Asp Val Trp Val
35 40 45

Ile Glu Pro Lys Thr Gly Arg Lys Leu Ala Lys Leu Glu Cys Leu Asp
50 55 60

Ser Arg Gly Phe Phe Ser Gly Val Ile Pro Arg Arg Lys Asn Phe Phe

65					70					75					80
Arg	Tyr	Gln	Leu	Ala	Val	Val	Trp	His	Gly	Gln	Gln	Asn	Leu	Ile	Asp
				85					90					95	
Asp	Pro	Tyr	Arg	Phe	Gly	Pro	Leu	Ile	Gln	Glu	Met	Asp	Ala	Trp	Leu
			100					105					110		
Leu	Ser	Glu	Gly	Thr	His	Leu	Arg	Pro	Tyr	Glu	Thr	Leu	Gly	Ala	His
		115					120					125			
Ala	Asp	Thr	Met	Asp	Gly	Val	Thr	Gly	Thr	Arg	Phe	Ser	Val	Trp	Ala
	130					135					140				
Pro	Asn	Ala	Arg	Arg	Val	Ser	Val	Val	Gly	Gln	Phe	Asn	Tyr	Trp	Asp
145					150					155					160
Gly	Arg	Arg	His	Pro	Met	Arg	Leu	Arg	Lys	Glu	Ser	Gly	Ile	Trp	Glu
			165						170					175	
Leu	Phe	Ile	Pro	Gly	Ala	His	Asn	Gly	Gln	Leu	Tyr	Lys	Tyr	Glu	Met
			180					185					190		
Ile	Asp	Ala	Asn	Gly	Asn	Leu	Arg	Leu	Lys	Ser	Asp	Pro	Tyr	Ala	Phe
	195						200					205			
Glu	Ala	Gln	Met	Arg	Pro	Glu	Thr	Ala	Ser	Leu	Ile	Cys	Gly	Leu	Pro
	210					215					220				
Glu	Lys	Val	Val	Gln	Thr	Glu	Glu	Arg	Lys	Lys	Ala	Asn	Gln	Phe	Asp
225				230						235					240
Ala	Pro	Ile	Ser	Ile	Tyr	Glu	Val	His	Leu	Gly	Ser	Trp	Arg	Arg	His
			245						250					255	
Thr	Asp	Asn	Asn	Phe	Trp	Leu	Ser	Tyr	Arg	Glu	Leu	Ala	Asp	Gln	Leu
		260						265					270		
Val	Pro	Tyr	Ala	Lys	Trp	Met	Gly	Phe	Thr	His	Leu	Glu	Leu	Leu	Pro
		275					280					285			
Ile	Asn	Glu	His	Pro	Phe	Asp	Gly	Ser	Trp	Gly	Tyr	Gln	Pro	Thr	Gly
	290					295				300					
Leu	Tyr	Ala	Pro	Thr	Arg	Arg	Phe	Gly	Thr	Arg	Asp	Asp	Phe	Arg	Tyr
305				310						315					320
Phe	Ile	Asp	Ala	Ala	His	Ala	Ala	Gly	Leu	Asn	Val	Ile	Leu	Asp	Trp
			325					330						335	
Val	Pro	Gly	His	Phe	Pro	Thr	Asp	Asp	Phe	Ala	Leu	Ala	Glu	Phe	Asp
		340						345					350		
Gly	Thr	Asn	Leu	Tyr	Glu	His	Ser	Asp	Pro	Arg	Glu	Gly	Tyr	His	Gln
		355					360					365			
Asp	Trp	Asn	Thr	Leu	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Gly	Arg	Arg	Glu	Val	Ser	Asn
	370					375					380				
Phe	Leu	Val	Gly	Asn	Ala	Leu	Tyr	Trp	Ile	Glu	Arg	Phe	Gly	Ile	Asp
385				390						395					400
Ala	Leu	Arg	Val	Asp	Ala	Val	Ala	Ser	Met	Ile	Tyr	Arg	Asp	Tyr	Ser

405							410							415		
Arg	Lys	Glu	Gly	Glu	Trp	Ile	Pro	Asn	Glu	Phe	Gly	Gly	Arg	Glu	Asn	
			420					425					430			
Leu	Glu	Ala	Ile	Glu	Phe	Leu	Arg	Asn	Thr	Asn	Arg	Ile	Leu	Gly	Glu	
			435					440					445			
Gln	Val	Ser	Gly	Ala	Val	Thr	Met	Ala	Glu	Glu	Ser	Thr	Asp	Phe	Pro	
			450					455					460			
Gly	Val	Ser	Arg	Pro	Gln	Asp	Met	Gly	Gly	Leu	Gly	Phe	Trp	Tyr	Lys	
			465					470					475			
Trp	Asn	Leu	Gly	Trp	Met	His	Asp	Thr	Leu	Asp	Tyr	Met	Lys	Leu	Asp	
			485					490					495			
Pro	Val	Tyr	Arg	Gln	Tyr	His	His	Asp	Lys	Leu	Thr	Phe	Gly	Ile	Leu	
			500					505					510			
Tyr	Asn	Tyr	Thr	Glu	Asn	Phe	Val	Leu	Pro	Leu	Ser	His	Asp	Glu	Val	
			515					520					525			
Val	His	Gly	Lys	Lys	Ser	Ile	Leu	Asp	Arg	Met	Pro	Gly	Asp	Ala	Trp	
			530					535					540			
Gln	Lys	Phe	Ala	Asn	Leu	Arg	Ala	Tyr	Tyr	Gly	Trp	Met	Trp	Ala	Phe	
			545					550					555			
Pro	Gly	Lys	Lys	Leu	Leu	Phe	Met	Gly	Asn	Glu	Phe	Ala	Gln	Gly	Arg	
			565					570					575			
Glu	Trp	Asn	His	Asp	Ala	Ser	Leu	Asp	Trp	His	Leu	Leu	Glu	Gly	Gly	
			580					585					590			
Asp	Asn	Trp	His	His	Gly	Val	Gln	Arg	Leu	Val	Arg	Asp	Leu	Asn	Leu	
			595					600					605			
Thr	Tyr	Arg	His	His	Lys	Ala	Met	His	Glu	Leu	Asp	Phe	Asp	Pro	Tyr	
			610					615					620			
Gly	Phe	Glu	Trp	Leu	Val	Val	Asp	Asp	Lys	Glu	Arg	Ser	Val	Leu	Ile	
			625					630					635			
Phe	Val	Arg	Arg	Asp	Lys	Glu	Gly	Asn	Glu	Ile	Ile	Val	Ala	Ser	Asn	
			645					650					655			
Phe	Thr	Pro	Val	Pro	Arg	His	Asp	Tyr	Arg	Phe	Gly	Ile	Asn	Gln	Pro	
			660					665					670			
Gly	Lys	Trp	Arg	Glu	Ile	Leu	Asn	Thr	Asp	Ser	Met	His	Tyr	His	Gly	
			675					680					685			
Ser	Asn	Ala	Gly	Asn	Gly	Gly	Thr	Val	His	Ser	Asp	Glu	Ile	Ala	Ser	
			690					695					700			
His	Gly	Arg	Gln	His	Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Leu	Pro	Pro	Leu	Ala	Thr	
			705					710					715			
Ile	Trp	Leu	Val	Arg	Glu	Ala	Glu									
			725													

<210> 19
 <211> 201
 <212> DNA
 <213> Escherichia coli

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(201)

<400> 19
 atg gat cat agt ctt aat tct tta aat aat ttc gat ttc ctg gcg cgt 48
 Met Asp His Ser Leu Asn Ser Leu Asn Asn Phe Asp Phe Leu Ala Arg
 1 5 10 15
 agt ttt gcc aga atg cac gca gaa ggt cgc ccg gtc gat att ctg gcc 96
 Ser Phe Ala Arg Met His Ala Glu Gly Arg Pro Val Asp Ile Leu Ala
 20 25 30
 gtt act ggt aac atg gat gaa gaa cat aga acc tgg ttt tgc gca cgt 144
 Val Thr Gly Asn Met Asp Glu Glu His Arg Thr Trp Phe Cys Ala Arg
 35 40 45
 tat gcc tgg tat tgt caa cag atg atg cag gca aga gag ctg gag tta 192
 Tyr Ala Trp Tyr Cys Gln Gln Met Met Gln Ala Arg Glu Leu Glu Leu
 50 55 60
 gag cac tga 201
 Glu His
 65

<210> 20
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 20
 Met Asp His Ser Leu Asn Ser Leu Asn Asn Phe Asp Phe Leu Ala Arg
 1 5 10 15
 Ser Phe Ala Arg Met His Ala Glu Gly Arg Pro Val Asp Ile Leu Ala
 20 25 30
 Val Thr Gly Asn Met Asp Glu Glu His Arg Thr Trp Phe Cys Ala Arg
 35 40 45
 Tyr Ala Trp Tyr Cys Gln Gln Met Met Gln Ala Arg Glu Leu Glu Leu
 50 55 60
 Glu His
 65

REIVINDICAÇÕES

1. Bactéria produtora de L-aminoácido da família *Enterobacteriaceae*, caracterizada pelo fato de que a bactéria foi modificada de forma que a via biossintética do glicogênio é interrompida.

5 2. Bactéria de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que dita via biossintética do glicogênio é interrompida por atenuação de expressão dos operons *glgBX* e/ou *glgCAP*.

3. Bactéria de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que dita via biossintética do glicogênio é interrompida por inativação
10 dos operons *glgBX* e/ou *glgCAP*.

4. Bactéria de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que a inativação dos operons *glgBX* e/ou *glgCAP* é realizada por deleção de um gene selecionado a partir de um grupo consistindo de *glgB*, *glgX*, *glgC*, *glgA*, *glgP* e combinações destes.

15 5. Bactéria de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que dita via biossintética do glicogênio é interrompida por atenuação da expressão do gene *glgS*.

6. Bactéria de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que dita via biossintética do glicogênio é interrompida por inativação
20 do gene *glgS*.

7. Bactéria de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que dita bactéria pertence ao gênero *Escherichia*.

8. Bactéria de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que dita bactéria pertence ao gênero *Pantoea*.

25 9. Bactéria produtora de L-aminoácido de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que dito L-aminoácido é selecionado a partir do grupo consistindo de um L-aminoácido aromático e um L-aminoácido não aromático.

10. Bactéria produtora de L-aminoácido de acordo com a

reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que dito L-aminoácido aromático é selecionado a partir do grupo consistindo de L-fenilalanina, L-tirosina, e L-triptofano.

11. Bactéria produtora de L-aminoácido de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que dito L-aminoácido não aromático é selecionado a partir do grupo consistindo de L-treonina, L-lisina, L-cisteína, L-metionina, L-leucina, L-isoleucina, L-valina, L-histidina, L-glicina, L-serina, L-alanina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-glutamina, L-ácido glutâmico, L-prolina, e L-arginina.

12. Método para produzir L-aminoácido, caracterizado pelo fato de compreender:

- cultivar a bactéria como definida na reivindicação 1 em um meio para produzir e excretar dito L-aminoácido no meio, e

- coletar dito L-aminoácido do meio.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que dito L-aminoácido é selecionado a partir do grupo consistindo de um L-aminoácido aromático e um L-aminoácido não aromático.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que dito L-aminoácido aromático é selecionado a partir do grupo consistindo de L-fenilalanina, L-tirosina, e L-triptofano.

15. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que dito L-aminoácido não aromático é selecionado a partir do grupo consistindo de L-treonina, L-lisina, L-cisteína, L-metionina, L-leucina, L-isoleucina, L-valina, L-histidina, L-glicina, L-serina, L-alanina, L-asparagina, L-ácido aspártico, L-glutamina, L-ácido glutâmico, L-prolina, e L-arginina.

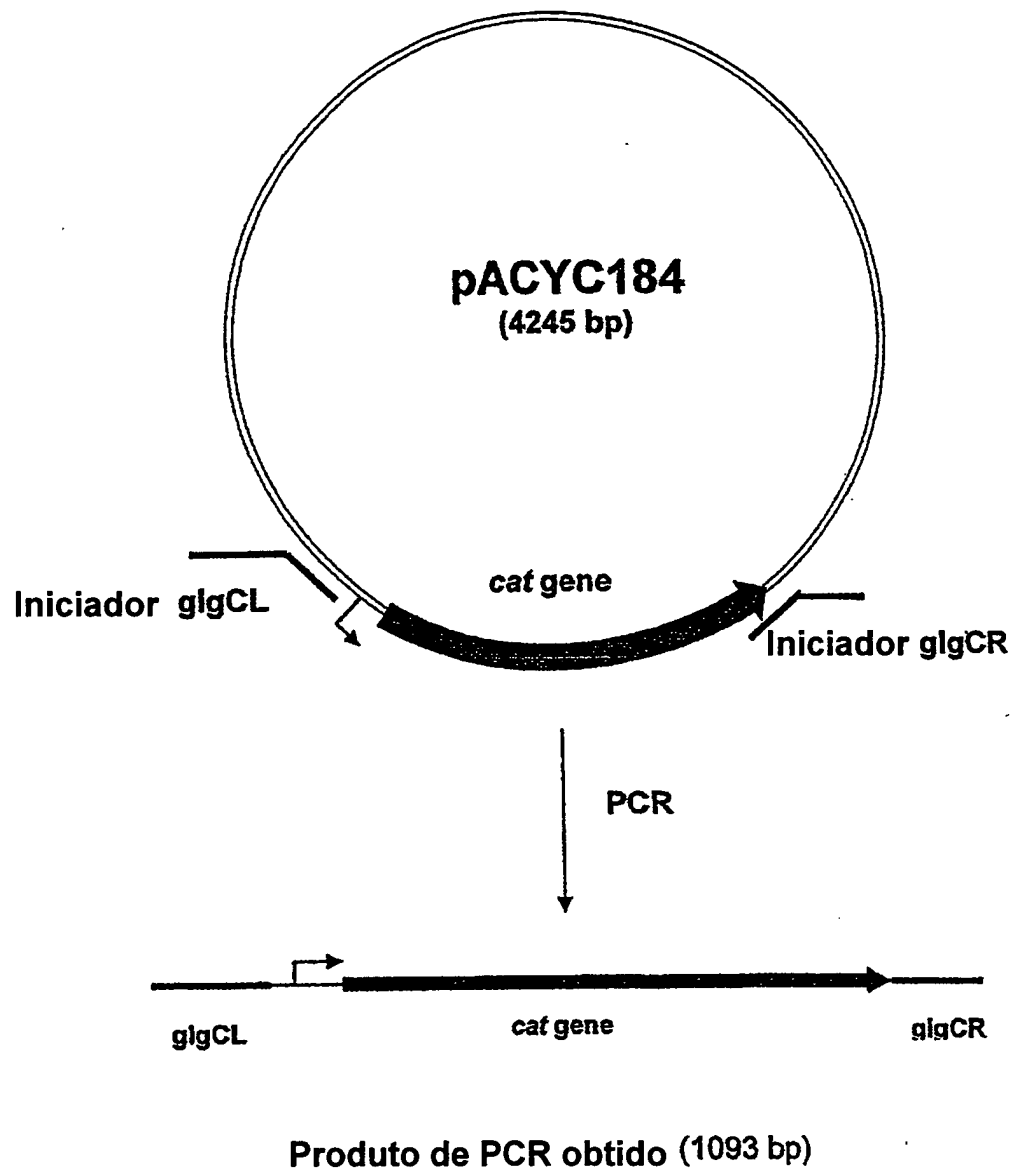
FIG.1

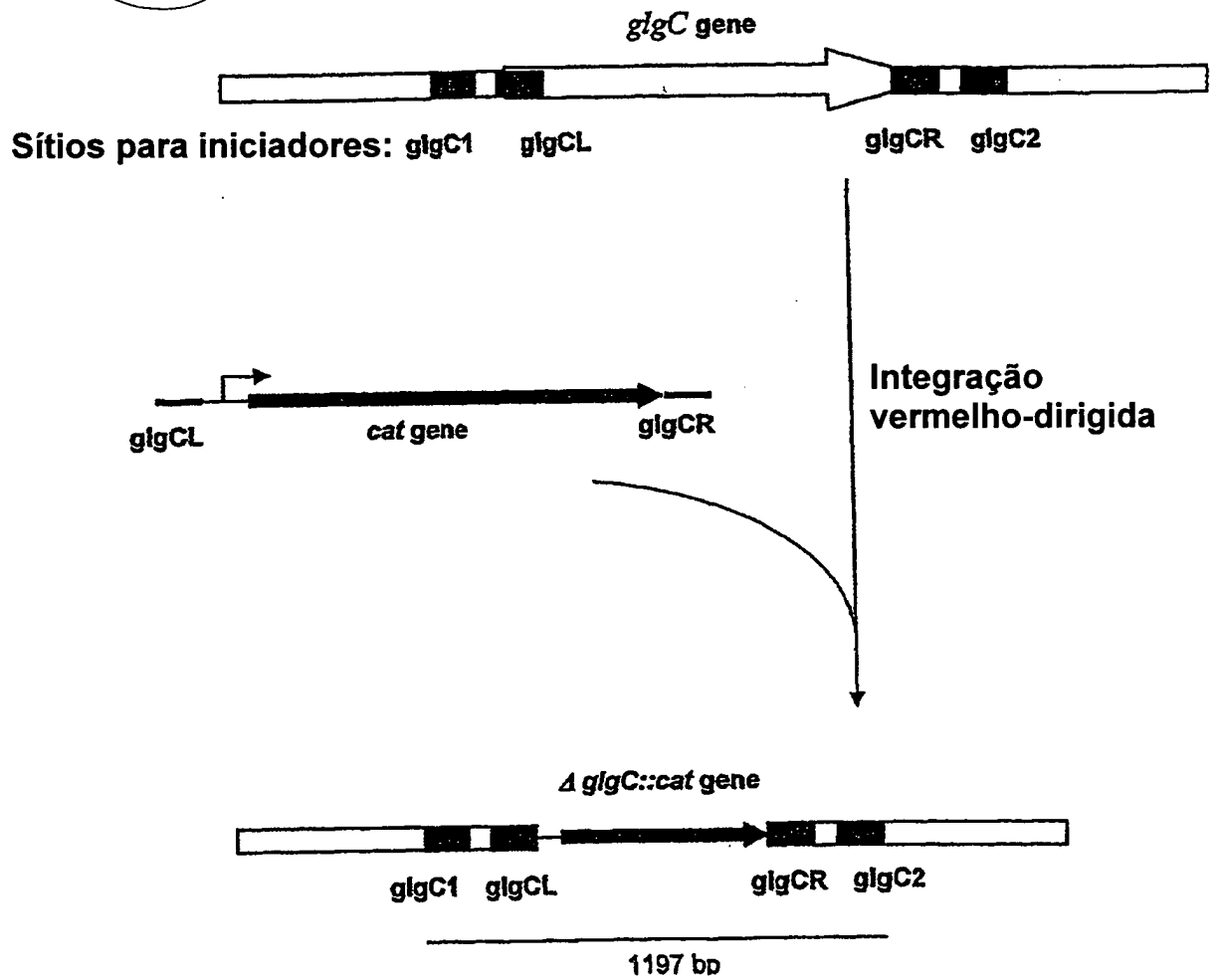
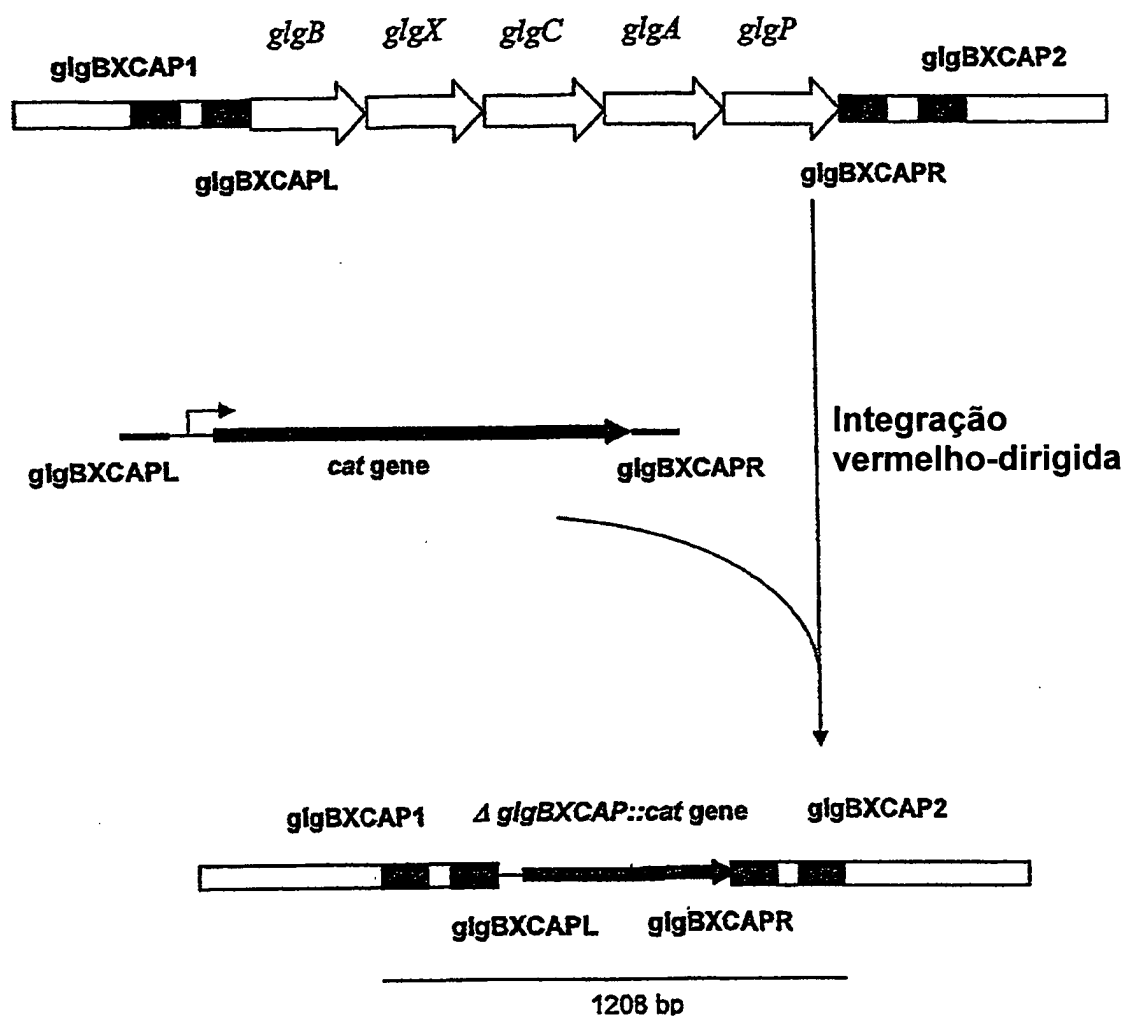
FIG.2

FIG.3



RESUMO

“BACTÉRIA PRODUTORA DE L-AMINOÁCIDO DA FAMÍLIA *ENTEROBACTERIACEAE*, E, MÉTODO PARA PRODUZIR L-AMINOÁCIDO”

- 5 É fornecido um método para produzir um L-aminoácido usando uma bactéria da família *Enterobacteriaceae*, particularmente uma bactéria pertencendo ao gênero *Escherichia* ou *Pantoea*, tendo a via de biossíntese do glicogênio interrompida.

A requerente apresenta novas vias das páginas 18 e 30 do relatório descritivo para melhor esclarecer e definir o presente pedido.

proteínas adequadas para secretar substância tóxicas para células (US No. 5.972.663); cepas de *E. coli* tendo diminuída atividade de cisteína dessulfidrase (JP11155571A2); *E. coli* W3110 com aumentada atividade de um regulador transcricional positivo para regulador de cisteína codificado pelo gene *cysB* (WO0127307A1), e os semelhantes.

Bactérias produtoras de L-leucina

Exemplos de cepas parentais derivando bactérias produtoras de L-leucina da presente invenção incluem, mas não são limitados a, cepas pertencendo ao gênero *Escherichia*, tal como cepas de *E. coli* resistentes a leucina (por exemplo, a cepa 57 (VKPM B-7386, US 6.124.121)) ou análogos de leucina incluindo como β -2-tienilalanina, 3-hidroxileucina, 4-azaleucina, 5,5,5-trifluorleucina (JP 62-34397 B e JP 8-70879 A); cepas *E. coli* obtidas pelo método de engenharia de gene descrito em WO96/06926; *E. coli* H-9068 (JP 8-70879 A), e os semelhantes.

A bactéria da presente invenção pode ser melhorada realçando a expressão de um ou mais genes envolvidos em biossíntese de L-leucina. Exemplos incluem genes do operon *leuABCD*, que são preferivelmente representados por um gene *leuA* mutante codificando para isopropilmalato sintase livre de inibição por retroalimentação por L-leucina (US 6.403.342). Em adição, a bactéria da presente invenção pode ser melhorada realçando a expressão de um ou mais genes codificando para proteínas que excretam L-aminoácido de uma célula bacteriana. Exemplos de tais genes incluem os genes b2682 e b2683 (genes *ygaZH*) (EP 1239041 A2).

Bactérias produtoras de L-histidina

Exemplos de cepas parentais para derivar bactérias produtoras de L-histidina da presente invenção incluem, mas não são limitados a, cepas pertencendo ao gênero *Escherichia*, tal como cepa 24 de *E. coli* (VKPM B-5945, RU2003677); cepa 80 de *E. coli* (VKPM B-7270, RU2119536); *E. coli* NRRL B-12116 – B12121 (US No. 4.388.405); *E. coli* H-9342 (FERM BP-

2000124295, EP1172433) pode ser realizada por um método habitual bem conhecido como descrito acima para obter a cepa 702ilvA- Δ glgC. A cepa 702ilvA foi depositada na Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (Russia, 117545 Moscow, 1 Dorozhny proezd, 1) em 18 de Julho de 2000 sob o número de acesso VKPM B-8012.

Ambas cepas de *E. coli*, 702ilvA e 702ilvA- Δ glgC, podem ser crescidas por 18-24 horas a 37°C em placas de L-ágar. Então estas cepas podem ser cultivadas sob as mesmas condições que descrito acima.

Exemplo 4. Produção de L-arginina por *E. coli* 237- Δ glgC

A deleção do gene *glgC* no cromossomo da cepa 237 de *E. coli* produtora de L-arginina (VKPM B-7925) pode ser realizada por um método habitual bem conhecido como descrito acima para obter a cepa 237- Δ glgC. A cepa 237 foi depositada na Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (Russia, 117545 Moscow, 1 Dorozhny proezd, 1) em 10 de Abril de 2000 sob número de acesso VKPM B-7925 e então convertida para um depósito sob o Tratado de Budapeste em 18 de Maio de 2001.

Ambas cepas de *E. coli*, 237 e 237- Δ glgC, podem ser crescidas por 18-24 horas a 37°C em placas de L-ágar. Então estas cepas podem ser cultivadas sob as mesmas condições que descrito acima.

Exemplo 5. Produção de L-leucina por *E. coli* 57- Δ glgC

A deleção do gene *glgC* no cromossomo da cepa 57 de *E. coli* produtora de L-leucina (VKPM B-7386, US 6,124,121) pode ser realizada por um método habitual bem conhecido como descrito acima para obter o 57- Δ glgC. A cepa 57 foi depositada na Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (Russia, 117545 Moscow, 1 Dorozhny proezd, 1) em 19 de Maio de 1997 sob o número de acesso VKPM B-7386.

Ambas cepas de *E. coli*, 57 e 57- Δ glgC, podem ser crescidas por 18-24 horas a 37°C em placas de L-ágar. Então estas cepas podem ser