



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

(11) PI 0000897-4 B1

(22) Data do Depósito: 21/02/2000

(45) Data de Concessão: 22/11/2016



(54) **Título:** PROCESSO PARA A PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE L-AMINOÁCIDOS USANDO-SE BACTÉRIA CORINEFORME

(51) **Int.Cl.:** C12P 13/04; C12N 15/67; C12N 1/21; C12R 1/15

(30) **Prioridade Unionista:** 03/06/1999 US 09/324,940, 20/02/1999 DE 199 07 347.3

(73) **Titular(es):** FORSCHUNGSZENTRUM JUELICH GMBH. EVONIK DEGUSSA GMBH

(72) **Inventor(es):** ACHIM MARX, Biólogo(a), BETTINA MOECKEL, Bióloga, WALTER PFEFFERLE, Biólogo(a), HERMANN SAHM, Biólogo(a), ALBERT DE GRAAF, Físico(a) Diplomado(a), LOTHAR EGGELING, Biólogo(a)

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PROCESSO PARA A PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE L-AMINOÁCIDOS USANDO-SE BACTÉRIA CORINEFORME**".

5 A presente invenção fornece um processo para a produção fermentativa de L-aminoácidos usando-se bactéria corineforme em que o gene de deidrogenase de glutamato é ampliado.

Técnica anterior

Os L-aminoácidos são usados em nutrição animal, medicina humana e na indústria farmacêutica.

10 Os L-aminoácidos são produzidos por fermentação usando-se cepas de bactéria corineforme que produzem L-aminoácidos, em particular pelo uso de Corynebacterium glutamicum. Devido à importância deste grupo de produtos, são feitos esforços constantes para melhorar o processo de produção. Melhorias ao processo podem citar as medidas relativas à tecnologia de fermentação, por exemplo, fornecimento de mistura e oxigênio, ou à
15 composição dos meios nutrientes como, por exemplo, concentração de açúcar durante a fermentação ou ao manuseio do produto, por exemplo, por cromatografia de troca de íon, ou às características do desempenho intrínseco do microorganismo em si.

20 As características do desempenho destes microorganismos são melhoradas usando-se métodos de mutagênese, seleção e seleção mutante. Deste modo, as cepas são obtidas com resistência aos antimetabolitos como, por exemplo, a S-(2-aminoetil)cisteína análoga à cisteína, ou são auxotróficas para aminoácidos reguladoramente significativos e produzem L-
25 aminoácidos.

Por alguns anos, os métodos de tecnologia de DNA recombinante têm sido usados para se melhorar as cepas de *Corynebacterium glutamicum* que produzem L-aminoácidos pela ampliação dos genes de biosíntese individual e pela investigação do efeito sobre a produção de amino-
30 ácido-L. Artigos de revista sobre este assunto podem ser encontrados, dentre outros, em Kinoshita ("Glutamic Acid Bacteria"), em: Biology of Industrial Microorganisms, Demain and Solomon (Eds.), Benjamin Cummings, Lon-

dres, UK, 1985, 115-142), Hilliger (Biotech 2, 40-44 (1991)), Jetten e Sinskey (Critical Reviews in Biotechnology 15, 73-103 (1995)) e Sahm e outros (Annals of the New York Academy of Science 782, 25-39 (1996)).

A deidrogenase de glutamato da enzima catalisa a aminação
 5 redutora de ácido α -cetoglutárico para proporcionar ácido glutâmico. A aplicação de patente francesa publicada 2 575 492 descreve um fragmento de DNA de *Corynebacterium melassecola* 801 que contém um gene de deidrogenase de glutamato. Este é possivelmente ali utilizado para aumentar a produção de ácido glutâmico na fermentação de *Corynebacterium melasse-*
 10 *cola*. A seqüência de nucleotídeo do gene de deidrogenase de glutamato de *Corynebacterium melassecola* ATCC13032 foi descrita por Börmann e outros (Molecular Microbiology 6, 317-326 (1992)). A seqüência de nucleotídeo do gene de deidrogenase de glutamato de *Peptostreptococcus asaccharolyticus* está descrita em Snedecor e outros (Journal of Bacteriology
 15 193, 6162-6167 (1991)).

Objetivo da Invenção

Os inventores se propuseram o objetivo de proporcionar novas medidas para a produção fermentativa melhorada de outros L-aminoácidos.

Descrição da Invenção

20 Os L-aminoácidos são usados em nutrição animal, medicina humana e na indústria farmacêutica. Há, portanto, interesse geral em proporcionar processos melhorados para a produção de L-aminoácidos.

Quando os L-aminoácidos forem mencionados abaixo, eles significarão os aminoácidos formadores de proteína L-lisina, L-treonina, L-
 25 isoleucina, L-valina, L-prolina, L-triptofânio, opcionalmente os seus sais e, também, L-homoserina, em particular, L-lisina, L-treonina e L-triptofânio.

A presente invenção proporciona um processo para a produção fermentativa de L-aminoácidos usando-se bactéria corineforme que, em particular, já produza os L-aminoácidos correspondentes e em que a codificação da seqüência de nucleotídeo para a deidrogenase de glutamato de en-
 30 zima é ampliada, em particular, sobreexpressada.

As execuções preferidas são citadas nas reivindicações.

Neste sentido, o termo "ampliação" descreve o aumento da atividade intracelular de uma ou mais enzimas em um microorganismo, cujas enzimas são codificadas pelo DNA correspondente, por exemplo, pelo aumento do número de cópia do gene ou genes, pelo uso de um promotor forte ou de um gene que codifica uma enzima correspondente tendo elevada atividade e, opcionalmente, pela combinação destas medidas.

Os microorganismos proporcionados pela presente invenção são capazes de produzir L-aminoácidos de glicose, sacarose, lactose, frutose, maltose, melaços, amido, celulose ou de glicerol e etanol. Os microorganismos podem compreender representantes da bactéria corineforme, em particular do gênero *Corynebacterium*, sendo particularmente mencionada a *Corynebacterium glutamicum*, que é conhecida nos círculos especializados por sua habilidade em produzir L-aminoácidos.

Cepas adequadas do gênero *Corynebacterium*, em particular da espécie *Corynebacterium glutamicum*, são as cepas naturais conhecidas.

Corynebacterium glutamicum ATCC13032

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870

Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539

Brevibacterium flavum ATCC14067

Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 e

Brevibacterium divaricatum ATCC14020 e mutantes ou cepas produzidas das mesmas como, por exemplo, as cepas produtoras de L-lisina

Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709

Brevibacterium flavum FERM-P 1708 e

Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712,

ou as cepas produtoras de L-treonina

Corynebacterium glutamicum FERM-P 5835

Brevibacterium flavum FERM-P 4164 e

Brevibacterium lactofermentum FERM-P 4180,

ou as cepas produtoras de L-isoleucina

Corynebacterium glutamicum FERM-P 756

Brevibacterium flavum FERM-P 759 e

Brevibacterium lactofermentum FERM-P 4192

ou as cepas produtoras de L-valina

Brevibacterium flavum FERM-P 512 e

5 *Brevibacterium lactofermentum* FERM-P 1845,

e as cepas produtoras de L-triptofânio

Corynebacterium glutamicum FERM-BP 478

Brevibacterium flavum FERM-BP 475 e

Brevibacterium lactofermentum FERM-P 7127.

10 Os inventores descobriram que, após a sobreexpressão da deidrogenase de L-glutamato, a bactéria corineforme produz L-aminoácidos de maneira melhorada, onde o ácido L-glutâmico não é aqui reivindicado.

O gene de deidrogenase de glutamato de *C. glutamicum* descrito por Börmann e outros (*Molecular Microbiology* 6, 317-326 (1992)) pode
 15 ser usado de acordo com a invenção. O gene de deidrogenase de glutamato de outros microorganismos como, por exemplo, o de *Peptostreptococcus asaccharolyticus*, que foi descrito por Snedecor e outros (*Journal of Bacteriology* 173, 6162-6167 (1991)), também é adequado. Alleles dos genes citados oriundos da degeneração do código genético ou de mutações de senti-
 20 do funcionalmente neutras podem também ser utilizadas.

A sobreexpressão pode ser alcançada pelo aumento do número de cópia dos genes correspondentes, ou o promotor e a região de regulação localizada fluxo acima do gene estrutural podem ser alterados. Os cas-
 25 setes de expressão incorporados fluxo acima do gene estrutural agem da mesma maneira. É possível adicionalmente aumentar a expressão durante a produção fermentativa de L-aminoácidos por meio de promotores indutíveis. A expressão também é melhorada por medidas de ampliação do tempo de vida do mRNA. A atividade da enzima é ainda mais ampliada ao se evitar a degradação da proteína da enzima. As estruturas do gene ou genes podem
 30 ou estar presentes nos plasmídeos em um número variável de cópias ou estar integradas no cromossomo e ampliadas. Alternativamente, a sobreexpressão dos genes em questão pode também ser alcançada pela modifica-

ção da composição dos meios nutrientes e condições de cultura.

Os versados na técnica encontrarão orientação neste sentido, dentre outros, em Martin e outros (*Bio/Technology* 5, 137-146 (1987)), em Guerrero e outros (*Gene* 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya e Morinaga
 5 (*Bio/Technology* 6, 428-430 (1988)), em Eikmanns e outros (*Gene* 102, 93-98 (1991)), na patente européia BPS 0 472 869, na patente US 4.601.893, em Schwarzer e Pühler (*Bio/Technology* 9, 84-87 (1991)), em Reinscheid e outros (*Applied and Environmental Microbiology* 60, 126-132 (1994)), em LaBarre e outros (*Journal of Bacteriology* 175, 1001-1007 (1993)), na apli-
 10 cação de patente WO 96/15246, em Jensen e Hammer (*Biotechnology and Bioengineering* 58, 191-195 (1998)), em Makrides (*Microbiological Reviews* 60:512-538 (1996)) e em compêndios de genética e biologia molecular.

Exemplos de plasmídeos por meio dos quais a deidrogenase de glutamato pode ser sobreexpressada são pEK1.9ghd-1 e pEKExpghd, que
 15 estão presentes nas cepas ATCC13032/pEK1.9gdh-1 e DH5 α /pEKExpghd. O plasmídeo pEK1.9gdh-1 é um vetor de lançamento, que contém o gene de deidrogenase de glutamato dependente de NADP de *C. glutamicum*. O plasmídeo pEKExpghd é um vetor de lançamento que contém a [gene] deidrogenase dependente de NADP de *Peptostreptococcus asaccharolyticus*.

20 Pode ser adicionalmente vantajoso para a produção dos L-aminoácidos correspondentes que sobreexpressem uma ou mais enzimas do caminho de biossíntese do aminoácido particular, bem como a deidrogenase de glutamato. Assim, por exemplo,

o gene dapA que codifica a sintase de diidrodipicolinato pode
 25 adicionalmente ser sobreexpressada de modo a melhorar a bactéria corineforme produtora de L-lisina (EP-B 0197335),

o gene que codifica para a sintase de ácido acetoidróxi pode adicionalmente ser sobreexpressada de modo a melhorar a bactéria corineforme produtora de L-valina (EP-B 0356739),

30 o gene que codifica para a transferase de fosforibosila de ácido antranílico pode adicionalmente ser sobreexpressada de modo a melhorar a bactéria corineforme produtora de L-triptofânio (EP-B 0124048),

o gene que codifica para a deidrogenase de homoserina pode adicionalmente ser sobreexpressado de modo a melhorar a bactéria cori-neforme que produz a L-homoserina ou a L-treonina ou a L-isoleucina (EP-A 0131171).

5 Pode ser ainda vantajoso para a produção do L-aminoácido cor-
respondente interromper reações secundárias indesejáveis em adição à so-
breexpressão da deidrogenase de glutamato (Nakayama: "*Breeding of Ami-
no Acid Producing Micro-organisms*", em: *Overproduction of Microbial Pro-
ducts*, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), *Academic Press*, Londres, UK,
10 1982).

Para os objetivos da produção de L-aminoácido, os microorga-
nismos de acordo com a invenção podem ser cultivados contínua ou des-
continuamente usando-se o processo de lotes ou o processo de lotes ali-
mentados ou o processo de lotes alimentados repetidos. Um sumário de
15 métodos de cultivo conhecidos é fornecido no compêndio de Chmiel
(*Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik* (Gustav Fis-
cher Verlag, Stuttgart, 1991)) ou no compêndio por Storhas (*Bioreaktoren
und periphere Einrichtungen* (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden,
1994)).

20 O meio de cultura a ser usado deve satisfazer adequadamente
as exigências das cepas particulares. Os meios de cultura para vários mi-
croorganismos estão descritos em "*Manual of Methods for General Bacteri-
ology*" da *American Society for Bacteriology* (Washington D.C., USA, 1981).
As fontes de carbono que podem ser usadas incluem os açúcares e carboi-
25 dratos como, por exemplo, glicose, sacarose, lactose, frutose, maltose, me-
laços, amido e celulose, óleos e gorduras como, por exemplo, óleo de soja,
óleo de girassol, óleo de amendoim e óleo de coco, ácidos graxos como, por
exemplo, ácido palmítico, ácido esteárico e ácido linoléico, álcoois como,
por exemplo, glicerol e etanol e ácidos orgânicos como, por exemplo, ácido
30 acético. Estas substâncias podem ser usadas individualmente ou como
mistura. As fontes de nitrogênio que podem ser usadas compreendem com-
postos orgânicos contendo nitrogênio como peptona, extrato de fermento,

extrato de carne, extrato de malte, licor de caldo de milho, farinha de soja e uréia ou compostos inorgânicos como sulfato de amônio, cloreto de amônio, fosfato de amônio, carbonato de amônio e nitrato de amônio. As fontes de nitrogênio podem ser usadas individualmente ou como mistura. As fontes de fósforo que podem ser usadas são fosfato de potássio dihidrogenado ou fosfato de hidrogênio de dipotássio ou os sais correspondentes contendo sódio. O meio de cultura deve, além disso, conter sais de metal como, por exemplo sulfato de magnésio ou sulfato de ferro, que são necessários para o crescimento. Finalmente, substâncias promotoras de crescimento essenciais como os aminoácidos e as vitaminas podem também ser usadas em adição às substâncias supramencionadas. Os precursores adequados podem, além disso, ser adicionados ao meio de cultura. As substâncias de alimentação citadas podem ser acrescentadas à cultura como um lote único ou ser alimentadas apropriadamente durante o cultivo.

Os compostos básicos como hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, amônia, ou compostos acídicos como ácido fosfórico ou ácido sulfúrico, são usados apropriadamente para controlar o pH da cultura. Agentes antiespumantes como, por exemplo, poliglicolésteres de ácido graxo, podem ser usados para controlar a espumação. Substâncias seletivamente ativas adequadas como, por exemplo, antibióticos, podem ser adicionadas ao meio de modo a manter a estabilidade do plasmídeo. As misturas de oxigênio ou de gás contendo oxigênio como, por exemplo, ar, são introduzidas na cultura de modo a manter as condições aeróbicas. A temperatura da cultura é normalmente de 20°C a 45°C e, preferivelmente, de 25°C a 40°C. A cultura é continuada até que uma quantidade máxima do L-aminoácido desejado tenha sido formada. Este objetivo é normalmente atingido dentro de 10 a 160 horas.

Os L-aminoácidos podem ser analisados automaticamente usando-se cromatografia de troca de íon com subsequente derivatização de ninidrina, conforme descrito por Spackman e outros (*Analytical Chemistry*, 30, 1190 (1958)).

Os seguintes microorganismos foram depositados junto ao

Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Alemanha) de acordo com o Tratado de Budapeste:

Cepa ATCC13032/pEK1.9ghd-1 como DSM 12614 de *Corynebacterium glutamicum*.

5 Cepa DH5 /pEKExpghd como DSM 12613 de *Escherichia coli* K12.

Exemplos

A presente invenção é ilustrada em maior detalhe pelos seguintes exemplos práticos.

Com esta finalidade, realizaram-se testes com cepas produtoras
10 de aminoácidos em que a superioridade do processo reivindicado é demonstrada:

a) a cepa produtora de L-lisina *Corynebacterium glutamicum* DSM5715, (EP-B 0435 132) e

b) a cepa produtora de L-treonina e L-isoleucina *Brevibacterium*
15 *flavum* DSM5399 (EP-B- 0385 940) e

c) a cepa produtora de L-valina necessitando de isoleucina ATCC13032Δi1vA, que foi depositada como DSM12455 junto ao *Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen* em Braunschweig (Alemanha) de acordo com o Tratado de Budapeste.

20 Exemplo 1

Produção de produtores de L-aminoácidos com deidrogenase de glutamato ampliada

O plasmídeo pEK1.9gdh-1 corresponde ao plasmídeo pEK1.9gdh descrito por Börmann e outros (*Molecular Microbiology* 6, 317-
25 326 (1992)). Ele foi isolado de ATCC13032/pEK1.9gdh-1. O conhecido plasmídeo pEKExpghd (Marx e outros, *Metabolic Engineering* 1, 35-48 (1999)), que porta o gene da deidrogenase de glutamato de *Peptostreptococcus asaccharolyticus* (Snedecor e outros, *Journal of Bacteriology* 173, 6162-6167 (1991)) foi isolado da mesma maneira de cepa de *E. coli* DH5α/
30 pEKExpghd.

As cepas DSM5715, DSM5399 e ATCC13032Δi1vA foram transformadas com o plasmídeo pEK1.9gdh-1 conforme descrito por Liebl e

outros (*FEMS Microbiology Letters* 65, 299-304 (1989)). Os transformantes foram selecionados de ágar de cérebro/coração da Merck (Darmstadt, Alemanha) que tinham sido suplementados com 50 mg/l de canamicina. Deste modo, as cepas DSM5715/pEK1.9gdh-1, DSM399/pEK1.9gdh-1 e ATCC 5 13032Δi1vA/pek1.9ghd-1 foram obtidas. A cepa DSM5715 foi transformada da mesma maneira com o plasmídeo pEKxpgdh e a cepa DM5715/pEKExpgdh foi obtida.

Exemplo 2

Produção de L-lisina

10 A cepa de DSM5715/pEK1.9gdh-1 foi pré-cultivada em meio complexo 2TY consistindo de 16g/l de triptona, 10g/l de extrato de fermento e 5g/l de NaCl. Com esta finalidade, 60 ml de meio 2TY, contido em um frasco Erlenmeyer de 500 ml com 2 neutralizadores de fluxo, foram inoculados com um *loop* de inoculação da cepa e a cultura incubada por 12 horas a 15 150 rpm e 30°C.

De modo a inocular 60 ml de meio de produção contido em um frasco Erlenmeyer de 500 ml com 2 neutralizadores de fluxo, a pré-cultura foi centrifugada por 10 minutos a 5000 rpm em uma centrífuga Sepatech Minifuge RF (Heraeus, Hanau, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e 20 o pélete resuspenso em 1 ml de meio de produção. Uma alíquota desta suspensão celular foi adicionada ao meio de produção de tal modo que um OD600 de aproximadamente 2,0 foi obtido. O meio de produção usado foi meio CGXII com um pH de 7,0 (Tabela 1) descrita por Keilhauer e outros (*Journal of Bacteriology* 175, 5595-5603 (1993)) suplementado com 20 g/l 25 de glicose, 350 mg/l de leucina e 50 mg/l de monossulfato de canamicina. As culturas foram incubadas por 72 horas a 30°C e 150 rpm.

Tabela 1

Componente	Concentração por Litro
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g
Urea	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g

Tabela 1 - continuação -

Componente	Concentração por Litro
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,25 g
Ácido 3-morfolinopropano-sulfônico	42 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	10 mg
MnSO ₄ . H ₂ O	10 mg
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	1 mg
CuSO ₄	0,2 mg
NiCl ₂ . 6H ₂ O	0,02 mg
CaCl ₂	10 mg
Ácido protocatéquico	0,03 mg
Biotina	200 µg

- A densidade ótica (OD) (Biochrom Novaspec 4049, LKB Instrument GmbH, Gräfelfing, Alemanha) foi então determinada a uma frequência de onda de medição de 600 nm, como foi a concentração de L-lisina formada usando-se um analisador de aminoácido de Eppendorf-BioTronik (Hamburgo, Alemanha) por cromatografia de troca de íon e reação de coluna posterior com detecção de ninidrina. A tabela 2 mostra o resultado do teste.

Tabela 2

Distensão	OD	L-lisina g/l
DSM5715	16,5	4,5
DSM5715/pEKI.9gdh-1	19,4	6,2

Exemplo 3

10 Produção de L-treonina e L-isoleucina

- Cepa DSM5399/pEKI.9gdh-1 foi pré-cultivado em meio CgIII completo (Kase & Nakayama, *Agricultural and Biological Chemistry* 36 (9) 1611-1621 (1972)) com 50µg/ml de canamicina. Com esta finalidade, 10 ml de meio CgIII, contidos em um frasco Erlenmeyer de 100 ml com 4 neutralizadores de fluxo, foram inoculados com um *loop* inoculador da cepa e a cultura incubada por 16 horas a 240 rpm e 30°C.

De modo a inocular 10 ml de meio de produção, contidos em um frasco Erlenmeyer com 4 neutralizadores de fluxo, o OD (660 nm) da pré-cultura foi determinada. A cultura principal foi inoculada a um OD de 0,1. O meio de produção usado foi o meio CgXII descrito por Keilhauer e outros (5) (*Journal of Bacteriology* 1993, 175: 5595-5603). A composição do meio é mostrada no Exemplo 2. 4% de glicose e 50 ml/l de sulfato de canamicina foram adicionados. As células foram incubadas por 48 horas a 33°C, 250 rpm e 80% de umidade atmosférica.

A densidade ótica a 660 nm foi então determinada, como foi a 10 concentração da L-treonina e da L-isoleucina formadas conforme citado no exemplo 2. A tabela 3 mostra o resultado do teste.

Tabela 3

Distensão	OD	L-treonina	L-isoleucina
DSM5399	10,5	1,77	1,05
DMS5399/pEKI,9gdh-1	11,0	2,26	1,44

Exemplo 4

Produção de L-valina

15 A cepa ATCC13032Δi1vA/pEK1.9gdh-1 foi pré-cultivada em meio completo CgIII (Kase & Nakayama, *Agricultural and Biological Chemistry* 36 (9) 1611-1621 (1972)) com 50μg/ml de canamicina. Com esta finalidade, 50 ml de meio CgIII, contido em um frasco Erlenmeyer de 500 ml com 4 neutralizadores de fluxo, foram inoculados com um *loop* inoculante da 20 cepa e a cultura incubada por 16 horas a 140 rpm e 30°C.

De modo a inocular 60 ml de meio de produção, contidos em um frasco Erlenmeyer de 500 ml com 4 neutralizadores de fluxo, o OD (660 nm) da pré-cultura foi determinado. A cultura principal foi centrifugada e o sobrenadante descartado. O pélete foi resuspenso em 5ml de meio de produ- 25 ção e a cultura principal inoculada a um OD de 0,3. O meio de produção usado foi o meio CgXII (Keilhauer e outros, *Journal of Bacteriology* 1993 175: 5595 - 5603) conforme descrito no exemplo 3 (com 4% de glicose). As células foram incubadas por 48 horas a 30°C, 150 rpm.

A densidade ótica a 600 nm foi então determinada, como foi a concentração de L-valina formada conforme descrito e citado no Exemplo 2. A tabela 4 mostra o resultado do teste.

Tabela 4

Distensão	OD	L-valina g/l
ATCC13032Δilva ?	18,5	0,29
ATCC13032Δilva °	17,6	0,45

5 Exemplo 5

Produção de L-lisina, L-valina e L-alanina

A cepa DSM5715/pEKExp_{gdh} foi pré-cultivada em meio complexo 2TY consistindo de 16g/l de triptona, 10 g/l de extrato de fermento e 5g/l de NaCl. Com esta finalidade, 60 ml de meio 2TY, contidos em um frasco Erlenmeyer de 500 ml com 2 neutralizadores de fluxo foram inoculados com um *loop* inoculador da cultura e a cultura incubada por 12 horas a 150 rpm e 30°C.

De modo a inocular 60 ml de meio de produção, contidos em um frasco Erlenmeyer de 500 ml com 2 neutralizadores de fluxo, a pré-cultura foi centrifugada por 10 minutos a 5000 rpm em uma centrífuga Sepatech Minifuge RF (Heraeus, Hanau, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e o pélete ressuspense em 1 ml de meio de produção. Uma alíquota desta suspensão celular foi adicionada ao meio de produção de tal modo que um OD₆₀₀ de aproximadamente 0,4 foi obtido. O meio de produção usado foi o meio CGC (tabela 5) descrito por Schrupf e outros (*Journal of Bacteriology* 173, 4510-4516 (1991)), suplementado com 25 g/l de glicose, 350 mg/l de leucina, 42 g/l de ácido 3-morfolinopropanossulfônico e 50 mg/l de monossulfato de canamicina em pH 7. As culturas foram incubadas por 30 horas a 30°C e 150 rpm.

Tabela 5

Componente	Concentração por Litro
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 g
Uréia	5 g
KH_2PO_4	0,5 g
K_2HPO_4	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mg
CuSO_4	0,2 mg
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,02 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10 mg
Biotina	200 μg

- A densidade ótica (OD) (Biochrom Novaspec 4049, LKB Instrument GmbH, Gräfelfing, Germany) foi então determinada a uma frequência de onda de medição de 600 nm, como foram as concentrações de L-alanina, L-lisina e L-valina formadas usando-se um analisador de aminoácido de Eppendorf-BioTronik (Hamburgo, Alemanha) por cromatografia de troca de íon e reação de coluna posterior com detecção de ninidrina. A tabela 6 mostra o resultado do teste.

Tabela 6

Distensão	OD	L-alanina	L-lisina g/l	L-valina g/l
DSM5715	29,4	Traços	1,6	0,1
DSM5715/pEKExp gdh	19,4	0,6	2,1	0,6

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para produção de um ou mais L-aminoácidos selecionados a partir do grupo consistindo em L-treonina, L-isoleucina, L-valina e L-triptofano por fermentação de bactérias corineformes, caracterizado pelo
5 fato de que são usadas bactérias transformadas com um gene glutamato desidrogenase originados de microorganismos, nas quais a atividade intracelular de glutamato desidrogenase é aumentada, particularmente a sequência de nucleotídeos que codifica um gene glutamato desidrogenase é superexpressa, em que a glutamato desidrogenase tem a sequência de SEQ
10 ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que são usadas bactérias nas quais os genes remanescentes na via metabólica para a formação dos L-aminoácidos desejados são adicionalmente amplificados.

15 3. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que são usadas bactérias nas quais as vias metabólicas que reduzem a formação do(s) L-aminoácido(s) desejado(s) são pelo menos parcialmente desligadas.

4. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a
20 3, caracterizado pelo fato de que é usada uma cepa transformada com um vetor plasmídeo e, o vetor plasmídeo compreende a sequência de nucleotídeos que codifica glutamato desidrogenase.

5. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é usada uma bactéria transformada com o vetor plasmídeo
25 pEK1.9gdh-1, depositado em *Corynebacterium glutamicum* sob o número DSM 12614.

6. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que são usadas bactérias transformadas com o vetor plasmídeo pE-
KExpgh, depositado em *E. coli* sob o número DSM 12613.

30 7. Processo para a produção fermentativa de um ou mais L-aminoácidos selecionados a partir do grupo consistindo em L-treonina, L-isoleucina, L-valina e L-triptofano por fermentação de bactérias corineformes

de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que são realizadas as seguintes etapas:

- 5 (a) fermentação da bactéria transformada com o gene glutamato desidrogenase, na qual a atividade intracelular de glutamato desidrogenase é aumentada, particularmente a sequência de nucleotídeos que codifica o gene glutamato desidrogenase é superexpressa,
- (b) acumulação do(s) L-aminoácido(s) desejados no meio ou nas células das bactérias, e
- (c) isolamento do(s) L-aminoácido(s).