



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

(11) PI 0807756-8 B1

(22) Data do Depósito: 22/02/2008

(45) Data de Concessão: 13/03/2018



(54) Título: MÉTODO PARA PRODUZIR L-LISINA E/OU L-TREONINA

(51) Int.Cl.: C12P 13/04; C12N 15/09; C12N 1/21

(30) Prioridade Unionista: 22/02/2007 JP 2007-041724

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

(72) Inventor(es): YURI NAGAI; KAZUYUKI HAYASHI; TAKUJI UEDA; YOSHIHIRO USUDA;
KAZUHIKO MATSUI

“MÉTODO PARA PRODUZIR L-LISINA E/OU L-TREONINA”

FUNDAMENTOS DA TÉCNICA

Os L-aminoácidos são industrialmente produzidos por fermentação com o uso de microorganismos pertencentes ao gênero *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, ou semelhante. Em tais métodos de produção cepas são usadas que são isoladas da natureza ou variantes artificiais de tais cepas. Além disso, cepas de microorganismo podem ser usadas modificados por uma técnica de DNA recombinante de modo que a atividade de uma enzima de biossíntese de L-aminoácido básico é aumentada, e assim por diante (Documentos de patentes 1 a 9).

Quando aminoácidos são produzidos usando microorganismos, açúcares são geralmente usados como um componente principal do substrato, mas o glicerol pode também ser usado como um substrato como os açúcares (Documentos de patentes 10 e 11).

É conhecido o fato de que o *Escherichia coli* tem uma pluralidade de genes que participam no metabolismo do glicerol. Entretanto, foi revelado que, tendo em vista que uma cepa mutante deficiente em *glpK*, que é um gene codificando para a glicerol quinase, ou *glpD*, que é um gene codificando para a glicerol-3-fosfato desidrogenase, não pode crescer em um meio quando glicerol é a única fonte de carbono, a via principal de assimilação do glicerol de *E. coli* consiste em glicerol quinase e glicerol-3-fosfato desidrogenase (Documento não patente 1).

Conhece-se o fato de que a glicerol desidrogenase de *E. coli* é também uma das enzimas que participam em metabolismo de glicerol, e ela recupera uma cepa mutante deficiente nos três genes de *glpK*, *glpD* e *glpR*, que é um gene do repressor do régulon *glp*, da sua letalidade em um meio contendo glicerol como uma fonte única de carbono na triagem com o uso dessa cepa (documento não patente 2).

O caminho através do glicerol-3-fosfato, incluindo a glicerol

contendo glicerol como uma fonte única de carbono na triagem com o uso dessa cepa (documento não patente 2).

O caminho através do glicerol-3-fosfato, incluindo a glicerol quinase e a glicerol-3-fosfato desidrogenase, é pensado ser o principal caminho de assimilação do glicerol dos microorganismos pertencentes à família da *Enterobacteriaceae* como descrito acima, e o caminho da assimilação do glicerol através da diidroxiacetona é um caminho desnecessário para a assimilação do glicerol dos microorganismos pertencentes à família da *Enterobacteriaceae*.

Documento de patente 1: EP 0643135 B

10 Documento de patente 2: EP 0733712 B

Documento de patente 3: EP 1477565 A

Documento de patente 4: EP 0796912 A

Documento de patente 5: EP 0837134 A

Documento de patente 6: WO01/53459

15 Documento de patente 7: EP 1170376 A

Documento de patente 8: WO2005/010175

Documento de patente 9: WO96/17930

Documento de patente 10: EP 1715055 A

Documento de patente 11: EP 1715056 A

20 Documento não patente 1: *J. Bacteriol.*, 23 (2006) 8259-8271

Documento não patente 2: *J. Bacteriol.*, 131 (1977) 1026-1028

EXPOSIÇÃO DA INVENÇÃO

OBJETO A SER ALCANÇADO PELA INVENÇÃO

25 Um aspecto da presente invenção é fornecer um método para produzir um L-aminoácido por fermentação, com o uso de um substrato contendo glicerol, o qual é melhorado em comparação com as técnicas convencionais.

MEIOS PARA SE ALCANÇAR O OBJETO

De modo a se alcançar o objeto acima mencionado, os inventores da presente invenção assiduamente conduziram várias pesquisas.

Como um resultado, foi verificado que intensifica tanto glicerol desidrogenase como diidroxiacetona quinase, que são enzimas do caminho de assimilação do glicerol através da diidroxiacetona, não foi eficaz para produção de L-aminoácidos do glicerol. Entretanto a intensificação tanto da glicerol desidrogenase quanto da diidroxiacetona quinase notadamente melhoraram a produção de L-aminoácidos do glicerol, e concluíram a presente invenção.

A presente invenção, assim, provê o seguinte:

(1) Um método para produzir um L-aminoácido, que compreende cultivar um microorganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, tendo uma capacidade de produzir L-aminoácido e modificado para aumentar as atividades da glicerol desidrogenase e da diidroxiacetona quinase em um meio contendo glicerol como uma fonte de carbono para produzir e acumular um L-aminoácido no meio ou nas células, e coletar o L-aminoácido do meio ou das células.

(2) O método de acordo com (1), em que as atividades da glicerol desidrogenase e da diidroxiacetona quinase são aumentadas pelo aumento dos números de cópias dos genes codificando para a glicerol desidrogenase e diidroxiacetona quinase, ou modificando as sequências de controle da expressão dos genes.

(3) O método de acordo com (1) ou (2), em que a diidroxiacetona quinase usa ATP como um doador de fosfato.

(4) O método de acordo com qualquer um dentre (1) a (3), em que o microorganismo é ainda modificado para aumentar a atividade de captação do glicerol.

(5) O método de acordo com qualquer um dentre (1) a (4), em que o microorganismo é ainda modificado para aumentar a atividade ou as atividades de uma ou mais enzimas selecionadas do grupo consistindo de triosefosfato isomerase, frutose bisfosfato aldolase, frutose-1,6-bisfosfatase e fructose-6-fosfato aldolase.

(6) O método de acordo com qualquer um dentre (1) a (5), em

que o microorganismo é ainda modificado para reduzir a atividade ou as atividades da glicerol quinase e/ou da glicerol-3-fosfato desidrogenase do tipo de ligação à membrana.

(7) O método de acordo com qualquer um dentre (1) a (6), em que o microorganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae* é uma bactérias *Escherichia*, ou uma bactéria *Pantoea*.

(8) O método de acordo com qualquer um dentre (1) a (7), em que o L-aminoácido é selecionado do grupo consistindo de ácido L-glutâmico, L-lisina, L-leucina, L-isoleucina, L-valina, L-triptofano, L-fenilalanina, L-tirosina, L-treonina, L-metionina, L-cisteína, L-arginina, L-serina, L-prolina, ácido L-aspártico, L-asparagina, L-glutamina e L-histidina.

MELHOR MODO DE REALIZAR A INVENÇÃO

Doravante, a presente invenção será explicada em detalhes.

<1> MICROORGANISMO DA PRESENTE INVENÇÃO

Microorganismos exemplares da presente invenção incluem um microorganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, a qual tem a capacidade de produzir um L-aminoácido, e é modificado para aumentar a glicerol desidrogenase e a diidroxiacetona quinase. A capacidade de produzir um L-aminoácido (capacidade de produzir L-aminoácido) pode significar uma capacidade dos microorganismos exemplares da presente invenção para produzir e acumular um L-aminoácido em um meio ou células quando cultivado no meio. Um microorganismo exemplar da presente invenção pode ter uma capacidade de produzir duas ou mais espécies de L-aminoácidos. Não obstante o microorganismo tendo a capacidade de produzir L-aminoácidos pode ter inerentemente capacidade de produzir L-aminoácido, o microorganismo pode ser obtido pela modificação de tais microorganismos, como mencionado abaixo, com o uso de uma técnica de DNA recombinante, de modo que eles tenham a capacidade de produzir L-aminoácidos.

Embora o tipo do L-aminoácido não seja particularmente

limitado, exemplos incluem aminoácidos básicos tais como a L-lisina, L-ornitina, L-arginina, L-histidina e L-citrulina, aminoácidos alifáticos tais como a L-isoleucina, L-alanina, L-valina, L-leucina L-glicina, aminoácido que são ácidos hidróxi-monoaminocarboxílicos tais como a L-treonina e a L-serina, aminoácidos cíclicos tais como a L-prolina, aminoácidos aromáticos tais como a L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano, aminoácidos contendo enxofre tais como a L-cisteína, L-cistina e L-metionina, aminoácidos ácidos tais como o ácido L-glutâmico e o ácido L-aspártico, e aminoácidos com o grupo amida na cadeia lateral, tais como a L-glutamina e a L-asparagina. Um microorganismo exemplar da presente invenção pode ter uma capacidade de produzir duas ou mais espécies de L-aminoácidos.

Microorganismos pertencentes às famílias *Enterobacteriaceae*, incluem bactérias *Escherichia* e bactérias *Pantoea*. Outros exemplos de microorganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* incluem os microorganismos pertencentes a γ -proteobactéria tais como aqueles do gênero *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Erwinia*, *Salmonella*, *Morganella* ou semelhante.

Na presente invenção, “glicerol desidrogenase” significa uma enzima que reversivelmente catalisa a seguinte reação de oxidação que transforma o glicerol em diidroxiacetona mediante o uso de NAD como uma coenzima (EC: 1.1.1.6). $\text{Glycerol} + \text{NAD} = \text{Diidroxiacetona} + \text{NADH} + \text{H}^+$

Na presente invenção, a frase “modificado para aumentar a atividade da glicerol desidrogenase” pode significar que o número das moléculas de glicerol desidrogenase por célula pode ser aumentado em comparação com aquele de uma cepa tipo selvagem ou cepa não modificada, ou que a atividade da glicerol desidrogenase por molécula pode ser melhorada em comparação com aquela de uma cepa de tipo selvagem ou cepa não modificada. Além disso, quando a atividade enzimática é não detectável em uma cepa do tipo selvagem, e é melhorada a um nível detectável, isso também

pode estar incluída na condição dos “aumentos da atividade”. Na presente invenção, a atividade da glicerol desidrogenase pode ser em qualquer nível, contanto que ela possa ser detectada, mas a modificação preferivelmente é realizada de modo que a atividade da glicerol desidrogenase seja de 0,05 U/mg ou mais elevada, preferivelmente 0,25 U/mg, ou mais elevada, mais preferível 0,5 U/mg ou mais elevada. Exemplos de cepas do tipo selvagem do microorganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, que podem servir como uma referência para comparação, incluem a cepa *Escherichia coli* MG1655 (ATCC nº 47076) e cepa W3110 (ATCC nº 27325), a cepa *Pantoea ananatis* AJ13335 (FERM BP-6615), e assim por diante. A atividade da glicerol desidrogenase pode ser medida por referência ao método de Ansis, R. E. *et al.* [*J. Biol. Chem.*, 2-3, 153-159 (1953)].

Na presente invenção, “diidroxiacetona quinase” é uma enzima que reversivelmente catalisa a seguinte reação, que converte diidroxiacetona em fosfato de diidroxiacetona, e uma usa ATP como um doador de fosfato (EC 2.7.1.29), e um usa PEP como um doador de fosfato (EC 2.7.1.29) [*Cell. Mol. Life Sci.*, 63 (2006) 890-900; *Biochemistry*, 43 (2004) 13037-13045]

ATP + diidroxiacetona = ADP + fosfato de diidroxiacetona (EC 2.7.1.29)

Fosfoenolpiruvato + Diidroxiacetona = Piruvato + Fosfato de diidroxiacetona (EC 2.7.1.29)

Na presente invenção, é particularmente preferível que diidroxiacetona quinase usa ATP como um doador de fosfato.

A frase “modificado para aumentar a atividade da diidroxiacetona quinase” significa que o número das moléculas de diidroxiacetona quinase por célula pode ser aumentado em comparação com aquele de uma cepa do tipo selvagem ou cepa não modificada, ou que a atividade da diidroxiacetona quinase por molécula pode ser melhorada em

comparação com aquela de uma cepa do tipo selvagem ou cepa não modificada. A modificação é preferivelmente realizada de modo que a atividade da diidroxiacetona quinase por célula seja melhorada em 150 % ou mais, mais preferível 200 % ou mais, ainda mais preferível 300 % ou mais, da atividade de uma cepa do tipo selvagem ou cepa não modificada. Exemplos de cepas do tipo selvagem do microorganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae* podem servir como uma referência para comparação, incluem a cepa *Escherichia coli* MG1655 (ATCC nº 47076) e a cepa W3110 (ATCC nº 27325), a cepa *Pantoea ananatis* AJ13335 (FERM BP-6615), e assim por diante. A atividade da diidroxiacetona quinase pode ser medida por referência ao método de Johnson, E. A. (*J. Bacteriol.*, outubro de 1984; 160(1): 55-60).

Exemplos do gene codificando para a glicerol desidrogenase incluem o gene *gldA*, e um exemplo preferido é o gene *gldA* derivado de um microorganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Exemplos dos microorganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* incluem *Escherichia coli*. Exemplos do gene de *Escherichia coli* incluem, por exemplo, o gene *gldA* da SEQ ID NO: 1 (filamento complementar dos números de nucleotídeos 4135955..4137058 do GenBank Acesso nº NC_000913).

Além disso, o homólogo do gene codificando para a glicerol desidrogenase pode ser aqueles clonados com base na homologia ao gene exemplificado acima, de uma bactéria do gênero *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Erwinia*, *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Citrobacter*, *Corynebacterium* ou semelhante. Exemplos do genes que apresentam alta homologia ao gene *gldA* de *Escherichia coli* e podem ser usados na presente invenção como o gene codificando para glicerol desidrogenase são mencionados na Tabela 1.

TABELA 1

Genes apresentando alta homologia ao gene *gldA* de *Escherichia coli* e codificando para a glicerol desidrogenase

Gene	Microorganismo	Descrição	Genbank Acesso nº	SEQ ID NO
<i>gldA</i>	<i>Shigella dysenteriae</i> Sd197	Glicerol desidrogenase (NAD)	YP_405216.1 GI:82778867	74, 75
<i>gldA</i>	<i>Salmonella typhimurium</i> LT2	Similar a glicerol desidrogenase de <i>E. coli</i> (NAD)	AE008892.1 GI:16422675	76, 77
<i>gldA</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	Glicerol desidrogenase	AF148496.1 GI:6552505	78, 79
<i>gldA</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	Glicerol desidrogenase e enzimas relacionadas	ZP_01697292.1 GI:124522908	80, 81

A homologia (identidade etc.) das sequências de aminoácidos e sequências de nucleotídeos pode ser determinada pelo uso, por exemplo, do algoritmo BLAST de Karlin e Altschul [*Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 5873 (1993)] ou FASTA de Pearson [*Methods Enzymol.*, 183, 63 (1990)]. Os programas denominados BLASTN e BLASTX foram desenvolvidos com base neste algoritmo BLAST (referir-se a www.ncbi.nlm.nih.gov).

Como o gene codificando para a diidroxiacetona quinase da presente invenção, os genes designados gene *dhaKLM*, gene *dak*, gene *dhaK* e gene *dhbK* podem ser usados. Exemplos do gene codificando para a enzima com o uso de PEP como um doador de fosfato, incluem aqueles genes derivados de *Escherichia coli*, tais como o gene *dhaK* de SEQ ID NO: 34 (filamento complementar dos nucleotídeos números 1248991..1250061 do GenBank Acesso NC_0913), o gene *dhaL* de SEQ ID NO: 36 (filamento complementar dos nucleotídeos números 1248348..1248980 do GenBank Acesso nº NC_000913), e o gene *dhaM* de SEQ ID NO: 38 (filamento complementar strand dp nucleotídeo números 1246919..1248337 do GenBank Acesso nº NC_000913).

Na presente invenção, o gene codificando para a diidroxiacetona quinase que usa ATP como um doador de fosfato pode ser preferivelmente usado, e inclui o gene *dak1* derivado da levedura, o gene *dhbK* derivado da bactéria *Agrobacterium*, e o gene *dhaK* derivado da

bactéria *Citrobacter*. Exemplos do gene *dak1* derivado da levedura incluem o gene *dak1* da SEQ ID NO: 3 derivada de *Saccharomyces cerevisiae* (GenBank Acesso nº NP_013641.1 GI: 6323570), exemplos do gene *dhbK* derivado da bactéria *Agrobacterium* incluem o gene *dhbK* da SEQ ID NO: 5 derivado da *Agrobacterium tumefaciens* (GenBank Acesso nº NP_357070.1 GI: 15891398), e exemplos do gene *dhaK* derivado da bactéria *Citrobacter* incluem o gene *dhaK* da SEQ ID NO: 7 derivado de *Citrobacter freundii* (GenBank Acesso nº U09771).

Além disso, o homólogo do gene codificando para a diidroxiacetona quinase pode ser aqueles clonados à base da homologia ao gene exemplificado acima de uma bactéria tal como aquelas dos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Erwinia*, *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Agrobacterium*, *Citrobacter* e *Mycobacterium*, leveduras tais como aquelas dos gêneros *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* ou *Pichia*, ou semelhante

Em particular, como o gene codificando para a diidroxiacetona quinase, que usa ATP como um doador de fosfato, as seguintes sequências podem ser usadas. Os genes codificando para a diidroxiacetona quinase e apresentando alta homologia ao gene *dak1* derivado de *Saccharomyces cerevisiae* são apresentados na Tabela 2, os genes da diidroxiacetona quinase apresentando alta homologia ao gene *dhbK* derivado da *Agrobacterium tumefaciens* são apresentados na Tabela 3, e os genes da diidroxiacetona quinase apresentando alta homologia ao gene *dhaK* derivado de *Citrobacter freundii* são apresentados na Tabela 4

TABELA 2.

Genes codificando para a diidroxiacetona quinase e apresentando alta homologia ao gene *dak1* derivado de *Saccharomyces cerevisiae*

Gene	Microorganismo	Descrição	Genbank Acesso nº	SEQ ID NO
T43702	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Diidroxiacetona quinase	gi 3493578 gb AAC78808.1	40, 41
AAC27705	<i>Pichia angusta</i>	Diidroxiacetona quinase	gi 3171001 gb AAC27705.1	42, 43
AAC39490.1	<i>Pichia pastoris</i>	Diidroxiacetona quinase	gi 3287486 gb AAC39490.1	44, 45
CAG88710.1	<i>Debaryomyces hansenii</i> CBS767	Diidroxiacetona quinase	gi 49656075 emb CAG88710.1	46, 47

TABELA 3

5 Genes codificando para a diidroxiacetona quinase e apresentando alta homologia ao gene *dhbK* derivado da *Agrobacterium tumefaciens*

Gene	Microorganismo	Descrição	Genbank Acesso nº	SEQ ID NO
ABF89849.1	<i>Myxococcus xanthus</i> DK 1622	Proteína da família da diidroxiacetona quinase	gi 108464664 gb ABF89849.1	58, 59
ABB06761.1	<i>Burkholderia</i> sp. 383	Glicerona quinase	gi 77965380 gb ABB06761.1 Glycerone kinase [<i>Burkholderia</i> sp. 383]	60 61
ABC38950.1	<i>Burkholderia thailandensis</i> E264	Diidroxiacetona quinase	gi 83654887 gb ABC38950.1	62, 63
EAV65448.1	<i>Burkholderia multivorans</i> ATCC 17616	Glicerona quinase	gi 118658702 gb EAV65448.1	64, 65

TABELA 4

Genes codificando para a diidroxiacetona quinase e apresentando alta homologia ao gene *dhaK* derivado de *Citrobacter freundii*

Gene	Microorganismo	Descrição	Genbank Acesso nº	SEQ ID NO
AAX12907.1	<i>Escherichia blattae</i>	Diidroxiacetona quinase	gi 60099603 gb AAX12907.1	48, 49
EAV82971.1	<i>Enterobacter</i> sp. 638	Diidroxiacetona quinase	gi 118676428 gb EAV82971.1	50, 51
EAS39398.1	<i>Psychromonas</i> sp. CNPT3	Diidroxiacetona quinase	gi 90311294 gb EAS39398.1	52, 53
EAV42339.1	<i>Stappia aggregata</i> IAM 12614	Proteína da Diidroxiacetona quinase	gi 118435694 gb EVA42339.1	54, 55
CAK08390.1	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 3841	Diidroxiacetona quinase putativa	gi 115257295 emb CAK08390.1	56, 57

mutantes derivados dos outros microorganismos, ou gene mutantes naturais ou artificiais, que apresentam elevada similaridade estrutural aos genes acima mencionados e são capazes de melhorar a atividade da glicerol desidrogenase e a atividade da diidroxiacetona quinase quando elas são introduzidas em um hospedeiro ou são amplificadas. Homólogos dos genes da glicerol desidrogenase e da diidroxiacetona quinase significam genes codificando para uma proteína apresentando uma homologia de 80 % ou mais, preferivelmente de 90 % ou mais, mais preferível de 95 % ou mais, particularmente preferível de 98 % ou mais, às sequências totais de aminoácidos das SEQ ID NOs: 2, 4, 6 ou 8, ou qualquer das sequências de aminoácidos codificadas pelas sequências mencionadas nas Tabelas 1 a 4, e tendo uma função de glicerol desidrogenase ou a diidroxiacetona quinase. Se um gene codifica para a proteína tendo atividade de glicerol desidrogenase ou atividade de diidroxiacetona quinase, pode ser confirmado pela expressão do gene em uma célula hospedeira e examinando-se se a atividade enzimática é aumentada em comparação com uma cepa não modificada de acordo com o método de medição da atividade enzimática acima mencionado. Além disso, se o gene é um homólogo ou não pode ser confirmado pela preparação de uma cepa rompida pelo gene, na qual o gene do tipo selvagem correspondente seja rompido, introduzindo-se o gene na cepa rompida, e examinando-se se o gene complementa a função do gene do tipo selvagem, por exemplo se a atividade enzimática reduzida pelo rompimento do gene é restaurada.

Além disso, os genes codificando para a glicerol desidrogenase e a diidroxiacetona quinase usadas na presente invenção não são limitados aos genes do tipo selvagem, e eles podem ser genes mutantes ou artificialmente modificados codificando para uma proteína tendo uma sequência de aminoácidos das SEQ ID NOs: 2, 4, 6 ou 8, ou qualquer das sequências de aminoácidos mencionadas nas Tabelas 1 a 4, que podem incluir substituição, deleção, inserção, adição ou semelhante, de um ou mais resíduos de

aminoácidos em uma ou mais posições, contanto que a função da glicerol desidrogenase ou da diidroxiacetona quinase não seja reduzida. Embora o número dos “um ou vários” resíduos de aminoácidos possam diferir dependendo das posições na estrutura tridimensional ou dos tipos dos resíduos de aminoácidos da proteína, ele pode ser especificamente de 1 a 20, preferivelmente de 1 a 10, mais preferível de 1 a 5, ainda mais preferível de 1 a 3. Estas substituições são preferivelmente substituições conservativas. A substituição conservativa é uma mutação em que a substituição tem lugar mutuamente entre Phe, Trp e Tyr, se o sítio de substituição for um aminoácido aromático; entre Leu, Ile e Val, se ele for um aminoácido hidrofóbico; entre Gln e Asn, se ele for um aminoácido polar; entre Lys, Arg e His, se ele for um aminoácido básico, entre Asp e Glu, se ele for um aminoácido ácido; e entre Ser e Thr, se ele for um aminoácido tendo um grupo hidroxila. Exemplos da substituição conservativa incluem a substituição de Ala em Ser ou Thr, a substituição do Arg em Gln, His ou Lys, a substituição de Asn por Glu, Gln, Lys, His ou Asp, a substituição de Asp por Asn, Glu ou Gln, a substituição de Cys por Ser ou Ala, a substituição de Gln por Asn, Glu, Lys, His, Asp ou Arg, a substituição de Glu por Gly, Asn, Gln, Lys ou Asp, a substituição de Gly por Pro, a substituição de His por Asn, Lys, Gln, Arg ou Tyr, a substituição de Ile por Leu, Met, Val ou Phe, a substituição de Leu por Ile, Met, Val ou Phe, a substituição de Lys por Asn, Glu, Gln, His ou Arg, a substituição de Met por Ile, Leu, Val ou Phe, a substituição de Phe por Trp, Tyr, Met, Ile ou Leu, a substituição de Ser por Thr ou Ala, a substituição de Thr por Ser ou Ala, a substituição de Trp por Phe ou Tyr, a substituição de Tyr por His, Phe ou Trp, e a substituição de Val por Met, Ile ou Leu. A substituição, deleção, inserção, adição, inversão ou semelhante, dos aminoácidos acima mencionados, podem ser o resultado de uma mutação de ocorrência natural devida a uma diferença individual ou diferença das espécies (mutante ou variante) de um microorganismo tendo os

genes codificando para a glicerol desidrogenase e a diidroxiacetona quinase.

Os genes codificando para a desidrogenase glicerol e a diidroxiacetona quinase podem também ser um DNA que seja capaz de hibridizar com uma sequência complementar à sequência de nucleotídeos das SEQ ID NOs: 2, 4, 6 ou 8 ou qualquer das sequências de nucleotídeos mencionadas nas Tabelas 1 a 4, ou uma sonda que possa ser preparada das sequências de nucleotídeos, sob uma condição estridente, e codifique para uma proteína tendo a atividade da glicerol desidrogenase ou a atividade da diidroxiacetona quinase. As “condições estridentes” são condições sob a qual um assim chamado híbrido específico é formado, e um híbrido não específico não é formado. Não obstante seja difícil definir claramente a condição com valores numéricos, exemplos da condição estridente incluem aqueles sob as quais os DNAs altamente homólogos hibridizam-se entre si, por exemplo os DNAs não menos do que 80 % homólogos, preferivelmente não menos do que 90 % homólogos, mais preferível não menos do que 95 % homólogos, particularmente não menos do que 98 % homólogos hibridizam-se entre si, e os DNAs menos homólogos do que os acima não hibridizam-se entre si, ou condições de lavagem da hibridização Southern típica, isto é, lavar uma vez, preferivelmente 2 ou 3 vezes, em uma concentração de sal e temperatura correspondentes a 1 x SSC, 0,1 % de SDS em 60 °C, preferivelmente 0,1 x SSC, 0,1 % de SDS em 60 °C, mais preferível 0,1 x SSC, 0,1 % de SDS em 68 °C.

Na presente invenção, a frase “atividade intracelular de uma enzima aumente” significa uma condição em que a atividade intracelular da enzima seja aumentada em comparação com uma cepa do tipo selvagem (por exemplo, as cepas de *Escherichia coli* W3110 e MG1655), ou uma cepa precursora (cepa em que as atividades intracelulares de todas as enzimas especificadas na presente invenção não sejam intensificadas), e também incluem quando as células têm atividade que uma cepa do tipo selvagem ou a

cepa precursora não tenham.

Exemplos dos meios para aumentar a atividade intracelular incluem os seguintes meios e suas combinações. Entretanto, os meios não ficam limitados a estes. Como os meios para aumentar as atividades da glicerol desidrogenase e da diidroxiacetona quinase, qualquer dentre (1) a (5) pode ser usado, e os mesmos ou diferentes meios podem ser usados.

(1) Aumentar no número de cópias de um gene codificando para cada proteína pela transformação com o uso de um vetor contendo o gene.

(2) Aumentar no número de cópias de um gene codificando para cada proteína pela integração do gene no cromossoma.

(3) Aumentar na quantidade de expressão de um gene codificando para cada proteína pela modificação de uma região de controle da expressão do gene.

(4) Aumentar na quantidade de expressão pela modificação de um fator que afete no controle da expressão.

(5) Aumentar na quantidade de expressão pela introdução de uma mutação em uma região codificadora de um gene codificando para cada proteína.

(6) Aumento na quantidade de proteína pelo melhoramento da eficiência da translação.

Daqui por diante os genes codificando para a glicerol desidrogenase e a diidroxiacetona quinase podem ser, cada, referidos como um gene objetivo.

(1) Aumento no número de cópias do gene codificando para cada proteína pela transformação com o uso de um vetor contendo o gene.

Por exemplo, um fragmento de DNA contendo um gene objetivo pode ser ligado a um vetor que funcione em um microorganismo hospedeiro, preferivelmente um vetor do tipo de múltiplas cópias para

preparar um DNA recombinante, e o DNA recombinante podendo ser introduzido em um microorganismo para transformá-lo. O gene objetivo pode ser obtido por PCR [reação em cadeia da polimerase, referir-se a White, T. J. *et al.*, *Trends Genet.*, 5, 185 (1989)] com o uso do DNA cromossômico de *Escherichia coli*, levedura, bactéria de *Citrobacter*, bactéria de *Agrobacterium* ou semelhante, como um padrão. Os genes objetivos derivados de outros microorganismos podem também ser obtidos do DNA cromossômico ou de uma biblioteca de DNA cromossômico de cada microorganismo mediante o uso de PCR, como iniciadores, oligonucleotídeos preparados com base em um gene objetivo conhecido do microorganismo do microorganismo ou informação de sequência do gene objetivo ou da proteína de um microorganismo de outra espécie, ou hibridização com o uso de um oligonucleotídeo preparado com base em tal informação de sequência como mencionado acima, como uma sonda. Um DNA cromossômico pode ser preparado de um microorganismo que sirva como um doador de DNA pelo método de Saito e Miura (referir-se Saito, H. e Miura, K., *Biochem. Biophys. Acta*, 72, 619 (1963); *Experimental Manual for Biotechnology*, editado por The Society for Biotechnology, Japão, pp. 97-98, Baifukan Co., Ltd., 1992) ou semelhante.

Posteriormente, o gene objetivo amplificado por PCR pode ser ligado a um DNA vetor que pode funcionar na célula de um microorganismo hospedeiro para preparar um DNA recombinante. Exemplos do vetor, que pode funcionar em uma célula de microorganismo hospedeiro, incluem vetores que são autonomamente replicáveis em células do microorganismo hospedeiro.

Exemplos de vetores que são autonomamente replicáveis em microorganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* incluem pUC19, pUC18, pHSG299, pHSG399, pHSG398, pACYC184, (vetores da série pHSG e pACYC acham-se disponíveis da Takara Bio), RSF1010 (Gene, vol.

75(2), p271-288, 1989), pBR322, pMW219, pMW119 (vetores da série pMW acham-se disponíveis da Nippon Gene), pSTV28, pSTV29 (Takara Bio) e assim por diante. Um vetor de fago de DNA pode também ser usado.

Para preparar DNA recombinante pela ligação de qualquer dos genes ao vetor acima mencionado, o vetor é digerido com uma enzima de restrição correspondente aos términos de um fragmento de DNA contendo o gene objetivo. A ligação é geralmente realizada pelo uso de uma ligase tal como a DNA T4 ligase. Como métodos para digerir e ligar DNA, a preparação do DNA cromossômico, PCR, a preparação do DNA plasmídeo, a transformação, o planejamento dos oligonucleotídeos a serem usados como iniciadores, e assim por diante, métodos bem conhecidos por uma pessoa habilitada na técnica podem ser empregados. Estes métodos são descritos em Sambrook, J., Fritsch, E. F. e Maniatis, T., “*Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Segunda Edição”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989), e assim por diante.

O DNA recombinante preparado como descrito acima pode ser introduzido em uma bactéria de acordo com um método de transformação conhecido convencional. Exemplos incluem a eletroporação [*Canadian Journal of Microbiology*, 43, 197 (1997)]. É igualmente possível usar um método de aumentar a permeabilidade do DNA mediante o tratamento das células receptoras com cloreto de cálcio, o que é relatado quanto a *Escherichia coli* K-12 (Mandel, M. e Higa, A., *J. Mol. Biol.*, 53, 159 (1970), ou um método de introduzir um DNA em uma célula competente preparada de uma célula no estágio de proliferação, o que é relatado quanto ao *Bacillus subtilis* [Duncan, C. H., Wilson, G. A e Young, F. E., *Gene*, 1, 153 (1977)].

(2) Aumento no número de cópias do gene codificando para cada proteína pela integração do gene no cromossoma.

O aumento da atividade intracelular de cada enzima pode ser obtido pelo aumento do número de cópias do gene objetivo mediante

introdução do gene objetivo no DNA cromossômico do microorganismo. A introdução do gene objetivo no DNA cromossômico do microorganismo pode ser obtido por recombinação homóloga com o uso de uma sequência alvo presente no DNA cromossômico em cópias múltiplas. Como uma tal

5 sequência presente em um DNA cromossômico em cópias múltiplas, um DNA repetitivo ou uma repetição invertida presente nos termos de um elemento de transposição, podem ser usados. Alternativamente, como apresentado na Patente Japonesa Aberta ao Público (Kokai) nº 2-109985, o gene objetivo pode ser introduzido no DNA cromossômico pela introdução do

10 gene em um transpóson, e transferindo-o de modo que o gene seja integrado no DNA cromossômico. Além disso, é também possível introduzir um gene objetivo em um cromossoma mediante o uso do método de integração conduzida Red (WO 2005/010175). Um gene objetivo pode também ser introduzido em um cromossoma por transdução usando-se um fago tal como o

15 fago P1, ou pelo uso de um vetor para transferência conjugativa. A transferência de um gene para um cromossoma pode ser confirmada pela realização da hibridização de Southern com o uso de uma parte do gene como uma sonda. A amplificação do número de cópias pode ser confirmada por hibridização de Southern com o uso de uma prova complementar do gene

20 objetivo. Embora o número de cópias possa ser amplificado até qualquer extensão contanto que ele seja amplificado por uma ou mais cópias, o gene codificando para a glicérol desidrogenase é preferivelmente amplificado por duas ou mais cópias, mais preferível três ou mais cópias, ainda mais preferível cinco ou mais cópias, e o gene codificando para a diidroxiacetona quinase é

25 preferivelmente amplificado por duas ou mais cópias, mais preferivelmente três ou mais cópias, ainda mais preferível cinco ou mais cópias. Quando o gene não seja nativo ao microorganismo hospedeiro escolhido, qualquer número de cópias pode ser introduzido, contanto que uma ou mais cópias sejam introduzidas.

(3) Aumento na quantidade de expressão do gene codificando para cada proteína pela modificação da região de controle da expressão do gene.

Outrossim, além do aumento do número de cópias do gene objetivo mencionado acima, aumento da atividade intracelular de cada enzima pode ser obtido pela substituição de uma sequência reguladora da expressão, tal como um promotor do gene em um DNA cromossômico ou em um plasmídeo com um promotor mais forte pelo método descrito na WO 00/18935. Como promotores fortes, por exemplo, são conhecidos o promotor lac, o promotor trp, o promotor trc, o promotor PR de fago lambda, o promotor, o promotor PL, o promotor lpp, o promotor T7, o promotor tet, e assim por diante. Na presente invenção, em particular, amplificar glicerol desidrogenase, o promotor tacM (SEQ ID NO: 10) é de preferência usado. *dhaK*, *dhaL* e *dhaM* codificando para a diidroxiacetona quinase de *Escherichia coli* toma uma estrutura de óperon, e as quantidades de expressão de todos os três genes são melhoradas pela intensificação do promotor localizando-se a montante de *dhaK*.

Além disso, é também possível introduzir a substituição de nucleotídeos ou semelhante em uma região promotora de um gene objetivo para modificá-lo em um promotor mais forte. Métodos para avaliar a potência dos promotores e exemplo de promotores potentes são descritos no documento de Goldstein *et al.* (*Prokaryotic promoters in biotechnology, Biotechnol. Annu. Rev.*, 1995, 1, 105-128), e assim por diante. Além disso, é conhecido o fato de que a substituição de vários nucleotídeos na região espaçadora entre o sítio de ligação ribossômica (RBS) e o códon de partida, em particular, na região imediatamente a montante do códon de partida, afeta significativamente a eficiência da translação do mRNA, e uma tal região pode também ser modificada. A expressão do gene objetivo é intensificada por tal substituição ou modificação do promotor.

Quanto à substituição de um promotor por um promotor mais forte em um cromossoma, um promotor localizado a montante do gene objetivo em um genoma pode ser substituído por um promotor mais forte pela transformação de um microorganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae* por um DNA contendo o promotor mais forte amplificado por PCR ou semelhante, para causar a recombinação do promotor mais forte com o promotor do tipo selvagem no genoma. Para uma tal substituição de genes com a utilização da recombinação homóloga, pode ser utilizado um método denominado de integração conduzida Red (Datsenko, K. A. e Wanner, B. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 6640-6645 (2000)), um método de usar um DNA linear tal como um método de utilizar a integração conduzida Red em combinação com um sistema excisivo derivado do fago λ [Cho, E. H., Gumport, R. I., Gardner, J. F., *J. Bacteriol.*, 184: 5200-5203 (2002)] (referir-se a WO 2005/010175), um método de uso de um plasmídeo contendo uma origem de replicação sensível à temperatura (Datsenko, K. A e Wanner, B. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 6640-6645 (2000), Patente U.S. nº 6.303.383, Patente Japonesa Aberta ao Público nº 05-007491), e assim por diante.

(4) Aumento na quantidade de expressão mediante modificação do fator que afeta no controle da expressão.

O aumento na quantidade de expressão mediante a modificação de um fator que afeta o controle da expressão pode ser obtido pela amplificação de um gene codificando para um ativador que aumenta a expressão dos genes codificando para a glicerol desidrogenase e da diidroxiacetona quinase, ou pela deleção ou atenuação de um gene codificando para um regulador que reduz a expressão dos genes. Exemplos do ativador do *dhaKLM* codificando para a diidroxiacetona quinase incluem, por exemplo, *dhaR* (SEQ ID NO: 66, os nucleotídeos números 1250289..1252208 do GenBank Acesso nº NC_000913), e a quantidade de expressão do

dhaKLM codificando para a diidroxiacetona quinase é aumentada por uma mutação do gene *dhaR* gene (1: *EMBO J.*, 26 de janeiro de 2005, 24(2): 283-293). A quantidade de expressão do *dhaKLM* codificando para a diidroxiacetona quinase é também aumentada pelo rompimento do gene *ptsI* (SEQ ID NO: 86, os nucleotídeos números 2532088..2533815 do GenBank Acesso nº NC_000913) (*Microbiology*, 147 (2001) 247-253).

(5) Aumento na atividade enzimática pela introdução da mutação na região codificadora do gene codificando para cada proteína.

Outrossim, o aumento das atividades da glicerol desidrogenase e da diidroxiacetona quinase pode também ser obtido pela introdução de uma mutação que aumente as atividades específicas das proteínas ou melhore as especificidades do substrato das enzimas nas regiões codificadoras dos genes objetivos.

Um tal gene codificando para cada enzima tendo uma mutação pode ser obtido, por exemplo, pela modificação da sequência de nucleotídeos das SEQ ID NOs: 1, 3, 5 ou 7, ou uma região codificadora em qualquer das sequências de nucleotídeos mencionadas nas Tabelas 1 a 4, de modo que os resíduos de aminoácidos de uma parte específica da proteína codificada incluam substituição, deleção, inserção, adição ou semelhante dos resíduos de aminoácidos. Além disso, pode ser obtido também pelos tratamentos de mutagenização convencionalmente conhecidos descritos abaixo. Quanto aos tratamentos de mutagenização, por um método de tratar a sequência de nucleotídeos das SEQ ID NOs: 1, 3, 5 ou 7, qualquer das sequências de nucleotídeos mencionadas nas Tabelas 1 a 4, ou uma sequência da região codificadora e qualquer delas com hidroxilamina ou semelhante *in vitro*, um método de tratar um microorganismo tal como microorganismos pertencentes à família de *Enterobacteriaceae* contendo o gene com radiação ultravioleta ou um agente de mutagenização usado para tratamento de mutagenização usual tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) ou metanossulfonato de

etila (EMS), PCR propenso a erro (Cadwell, R. C., *PCR Meth. Appl.*, 2, 28 (1992)], embaralhamento de DNA [Stemmer, W. P., *Nature*, 370, 389 (1994)], ou StEP-PCR [Zhao, H., *Nature Biotechnol.*, 16, 258 (1998)], uma mutação pode ser artificialmente introduzida nos genes codificando para a glicerol desidrogenase e a diidroxiacetona quinase por recombinação de genes para se obter genes codificando para a glicerol desidrogenase e a diidroxiacetona quinase altamente ativas. Se tais enzimas mutantes codificarem para a glicerol desidrogenase e a diidroxiacetona quinase, pode ser confirmado, por exemplo, pela introdução dos genes em um microorganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae* e tendo uma capacidade de produção de L-aminoácido, pelo seu cultivo em um meio contendo glicerol como uma fonte de carbono, e confirmando se a capacidade de produção do L-aminoácido é melhorada, ou medindo-se as atividades enzimáticas pelos métodos acima mencionados.

(6) Aumento na quantidade de proteína pelo melhoramento da eficiência de translação

Um aumento na quantidade de proteína pelo melhoramento da eficiência de translação pode ser alcançado pelo aumento do tRNA correspondente aos códons menos frequentemente usados no hospedeiro, ou pela modificação do gene objetivo de modo que ele tenha códons ótimos de acordo com a frequência de uso dos códons no hospedeiro [Gene 85, 109-114 (1989), *Biochemistry*, 31, 2598-2608 (1992), *J. Bacteriol.*, 175, 716-722 (1993), *Protein Expression and Purification*, 50, 49-57 (2006)]. Um aumento na quantidade da proteína objetivo em comparação com uma cepa não de modificação ou cepa do tipo selvagem pode ser confirmado, por exemplo, por detecção por Western blotting usando-se anticorpos [*Molecular Cloning* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 2001)].

Os microorganismo usado no método de produção da presente invenção pode ser um microorganismo modificado, para aumentar atividade

de captação de glicerol, além da intensificação da glicerol desidrogenase e da diidroxiacetona quinase. A atividade de captação do glicerol significa uma atividade para incorporar glicerol no citoplasma, e um facilitador de glicerol que é uma proteína de membrana é também envolvido. Exemplos do gene codificando para o facilitador de glicerol incluem, por exemplo, o gene *glpF* de *Escherichia coli* (SEQ ID NO: 16, filamento complementar dos números de nucleotídeos 4115268..4116113 do GenBank Acesso nº NC_000913).

O gene codificando para o facilitador de glicerol pode ser um DNA que hibridize com uma sequência complementar da sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 16 ou uma sonda que possa ser preparada da sequência complementar sob uma condição estridente, e codifique para uma proteína tendo a atividade de captação de glicerol. Exemplos também incluem um DNA codificando para a proteína da SEQ ID NO: 17. A proteína pode ser uma proteína apresentando uma homologia de 80 % ou mais, preferivelmente de 90 % ou mais, mais preferível de 95 % ou mais, particularmente preferível de 98 % ou mais, à sequência de aminoácidos totais de SEQ ID NO: 17, contanto que ela aumente a capacidade de captação do glicerol em um microorganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, quando ele é introduzido no microorganismo.

Além disso, o gene pode ser um DNA codificando para uma proteína tendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 17, mas que pode incluir substituição, deleção, inserção, adição ou semelhante de um ou vários resíduos de aminoácidos, contanto que a atividade da captação do glicerol não seja reduzida. A atividade pode ser aumentada por um método similar aos métodos acima mencionados para intensificar a glicerol desidrogenase e a diidroxiacetona quinase.

A atividade da captação do glicerol pode ser medida pelo uso do método de ensaio de transporte com o uso de uma proteína de membrana [Voegelé, R. T., Sweet, G. D. e Boos, W. J., *Bacteriol.*, 175: 1087-1094

(1993)].

O microorganismo usado para o método de produção da presente invenção pode ser modificado para aumentar atividades de uma ou mais enzimas selecionadas do grupo consistindo de triosefosfato isomerase, frutosefosfato aldolase, frutose-1,6-bisfosfatase e frutose-6-fosfato aldolase, além da intensificação da glicerol desidrogenase e da diidroxiacetona quinase e da intensificação da atividade da captação do glicerol.

A triosefosfato isomerase é uma enzima que catalisa uma reação que reversivelmente converte o fosfato de diidroxiacetona em gliceraldeído-3-fosfato (EC: 5.3.1.1).

Fosfato de diidroxiacetona = D-gliceraldeído-3-fosfato

A frase de “modificado para aumentar a atividade da triosefosfato isomerase” pode significar que o número das moléculas de triosefosfato isomerase por célula pode ser aumentada em comparação com aquela de uma cepa do tipo selvagem ou cepa não modificada, ou que a atividade da triosefosfato isomerase por molécula pode ser melhorada em comparação com aquela de uma cepa do tipo selvagem ou cepa não modificada. A modificação é preferivelmente realizada de modo que a atividade da triosefosfato isomerase por célula seja melhorada até 150 % ou mais, mais preferível 200 % ou mais, ainda mais preferível 300 % ou mais, da atividade de uma cepa do tipo selvagem ou cepa não modificada. Exemplos de cepas do tipo selvagem do microorganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae* pode servir como uma referência para comparação, incluem a cepa *Escherichia coli* MG1655 (ATCC nº 47076) e a cepa W3110 (ATCC nº 27325), a cepa *Pantoea ananatis* AJ13335 (FERM BP-6615), e assim por diante.

Exemplos do gene codificando para a triosefosfato isomerase incluem o gene *tpiA* derivado de *Escherichia coli* (SEQ ID NO: 18, filamento complementar dos números de nucleotídeos 4108763..4109530 do GenBank

Acesso nº NC_000913).

O gene codificando para a triosefosfato isomerase pode ser um DNA que hibridize com uma sequência complementar da sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 18 ou uma sonda que possa ser preparada da sequência complementar sob uma condição estrigente, e codifique para uma proteína tendo a atividade de triosefosfato isomerase. Exemplos também incluem um DNA codificando para a proteína de SEQ ID NO: 19. A proteína pode ser uma proteína apresentando uma homologia de 80 % ou mais, preferivelmente de 90 % ou mais, mais preferível de 95 % ou mais, em particular preferivelmente de 98 % ou mais, à sequência de aminoácidos totais de SEQ ID NO: 19, contanto que ela apresente atividade aumentada da triosefosfato isomerase em um microorganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, quando ela é introduzida no microorganismo.

Além disso, o gene pode ser um DNA codificando para uma proteína tendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 19, mas que pode incluir substituição, deleção, inserção, adição ou semelhante, de um ou vários resíduos de aminoácidos, contanto que a atividade da triosefosfato isomerase não seja reduzida.

A atividade da triosefosfato isomerase pode ser medida pelo uso do método de Andersen e Cooper [*FEBS Lett.*, 4, 19-20 (1969)]. A atividade da triosefosfato isomerase pode ser medida pelo uso do método de Andersen e Cooper [*FEBS Lett.*, 4, 19-20 (1969)]. A atividade pode ser aumentada por métodos semelhantes aos métodos mencionados acima para intensificar a glicerol desidrogenase e a diidroxiacetona quinase.

Na presente invenção, a Frutose bisfosfato aldolase” é uma enzima que catalisa reversivelmente a seguinte reação, que converte o fosfato de diidroxiacetona e o gliceroaldeído-3-fosfato em D-frutose-1,6-bisfosfato (EC: 4.1.2.13).

Fosfato de diidroxiacetona (fosfato de glicerona) + D-

gliceraldeído-3-fosfato = D-frutose-1,6-bisfosfato

A frase “modificado para aumentar a atividade do bisfosfato de frutose aldolase seja aumentada” significa que o número de moléculas da bisfosfato de frutose aldolase por célula pode ser aumentado em comparação com aquele de uma cepa do tipo selvagem ou cepa não modificada, ou que a atividade da bisfosfato de frutose aldolase por molécula pode ser melhorado em comparação com aquela de uma cepa do tipo selvagem ou cepa não modificada. A modificação é preferivelmente realizada de modo que a atividade da bisfosfato de frutose aldolase por célula seja melhorada até 150 % ou mais, preferivelmente 200 % ou mais, ainda mais preferível 300 % ou mais, da atividade de uma cepa do tipo selvagem ou cepa não modificada. Exemplos de cepas do tipo selvagem do microorganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, podem servir como uma referência para comparação, incluem a cepa de *Escherichia coli* MG1655 (ATCC nº 47076) e a cepa W3110 (ATCC nº 27325), a cepa de *Pantoea ananatis* AJ13335 (FERM BP-6615), e assim por diante.

Exemplos do gene codificando para a bisfosfato de frutose aldolase incluem o gene *fbaA* derivado de *Escherichia coli* (SEQ ID NO: 20, filamento complementar dos nucleotídeos números 3068187..3069266 do GenBank Acesso nº NC_000913) e o gene *fbaB* derivado de *Escherichia coli* (SEQ ID NO: 72, filamento complementar dos números de nucleotídeos 2175534..2176586 do GenBank Acesso nº NC_000913).

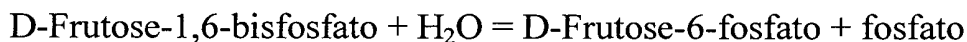
O gene codificando para a bisfosfato frutose aldolase pode ser um DNA que hibridize com uma sequência complementar da sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 20 ou 72 ou uma sonda que possa ser preparada da sequência complementar sob uma condição estridente, e codifique para uma proteína tendo a bisfosfato de frutose aldolase. Exemplos também incluem um DNA codificando para a proteína de SEQ ID NO: 21 ou 73. A proteína pode ser uma proteína apresentado uma homologia de 80 % ou mais,

preferivelmente de 90 % ou mais, mais preferível de 95 % ou mais, ainda mais preferível de 98 % ou mais, à sequência de aminoácidos totais da SEQ ID NO: 21, contanto que ela apresente atividade aumentada da bisfosfato frutose aldolase em um microorganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, quando ela é introduzida no microorganismo.

Além disso, o gene pode ser um DNA codificando para uma proteína tendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 ou 73, mas que pode incluir substituição, deleção, inserção, adição ou semelhante de um ou vários resíduos de aminoácidos, contanto que a atividade da bifosfato de frutose aldolase não seja reduzida.

A atividade da bisfosfato de frutose aldolase pode ser medida pelo uso do método de Richard & Rutter (*J. Biol. Chem.*, 236, 3177-3184). A atividade pode ser aumentada por métodos semelhantes aos métodos acima mencionados para intensificar a glicerol desidrogenase e a diidroxiacetona quinase.

A frutose-1,6-bisfosfatase é uma enzima que reversivelmente catalisa a seguinte reação que converte D-frutose-1,6-bisfosfato em D-frutose-6-fosfato (EC: 3.1.3.11).



A frase “ser modificado para aumentar atividade da frutose-1,6-bisfosfatase” significa que o número das moléculas de frutose-1,6-bisfosfatase por célula pode ser aumentada em comparação com aquele de uma cepa do tipo selvagem ou cepa não modificada, ou que a atividade da frutose-1,6-bisfosfatase por molécula seja melhorada com aquela de uma cepa do tipo selvagem ou cepa não modificada. A modificação é preferivelmente realizada de modo que a atividade da frutose-1,6-bisfosfatase por célula seja melhorada a 150 % ou mais, mais preferível 200 % ou mais, ainda mais preferível 300 % ou mais, da atividade de uma cepa do tipo selvagem ou cepa não modificada. Exemplos de cepas do tipo selvagem do microorganismo

pertencente à família de *Enterobacteriaceae* podem servir como uma referência para a comparação, incluem a cepa de *Escherichia coli* MG1655 (ATCC nº 47076) a cepa W3110 (ATCC nº 27325), a cepa de *Pantoea ananatis* AJ13335 (FERM BP-6615), e assim por diante.

5 Exemplos do gene codificando para frutose-1,6-bifosfatase incluem o gene *glpX* (SEQ ID NO: 22, filamento complementar dos nucleotídeos números 4112592..4113602 do GenBank Acesso nº NC_000913), o gene *fbp* (SEQ ID NO: 82, os nucleotídeos números 4452634..4453632 do GenBank Acesso nº NC_000913), e o gene *ybhA* (SEQ
10 ID NO: 84, os nucleotídeos números 796836..7976554 do GenBank Acesso nº NC_000913), que são derivados do *Escherichia coli*. O gene codificando para a frutose-1,6-bisfosfatase pode ser um DNA que hibridize com uma sequência complementar da sequência de nucleotídeos das SEQ ID NOs: 22, 82 ou 84 ou uma sonda que possa ser preparada da sequência complementar
15 sob uma condição estrigente, e codifique para uma proteína tendo a atividade da frutose-1,6-bisfosfatase. Exemplos também incluem um DNA codificando para a proteína de SEQ ID NOs: 23, 83 ou 85. A proteína pode ser uma proteína apresentando uma homologia de 80 % ou mais, preferivelmente 90 % ou mais, mais preferível 95 % ou mais, ainda mais preferível 98 % ou mais, à
20 sequência de aminoácidos totais das SEQ ID NOs: 23, 83 ou 85, contanto que ela apresente atividade aumentada da frutose-1,6-bisfosfatase em um microorganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, quando ela seja introduzida no microorganismo.

Além disso, o gene pode ser um DNA codificado para uma
25 proteína tendo uma sequência de aminoácidos das SEQ ID NOs: 23, 83 ou 85, mas que pode incluir substituição, deleção, inserção, adição ou semelhante de um ou vários resíduos de aminoácidos, contanto que a atividade da frutose-1,6-bisfosfatase não seja reduzida.

A atividade da frutose-1,6-bisfosfatase pode ser medida pelo

uso do método de Nakajima *et al.* (*Protein Nucleic Enzyme*, 22, 1585-1589). A atividade pode ser aumentada por métodos semelhantes aos métodos acima mencionados para intensificar a glicerol desidrogenase e a diidroxiacetona quinase.

Na presente invenção, “frutose-6-fosfato aldolase” é uma enzima que reversivelmente catalisa a seguinte reação que converte a diidroxiacetona em frutose-6-fosfato.



A frase “modificado para aumentar a atividade de frutose-6-fosfato aldolase” significa que o número das moléculas da frutose-6-fosfato aldolase por célula pode ser aumentado em comparação com aquele de uma cepa do tipo selvagem ou cepa não modificada, ou uma condição em que a atividade da frutose-6-fosfato aldolase por molécula pode ser melhorada em comparação com aquela de uma cepa do tipo selvagem ou cepa não modificada. A modificação é preferivelmente realizada de modo que a atividade da frutose-6-fosfato aldolase por célula seja melhorada até 150 % ou mais, mais preferível 200 % ou mais, ainda mais preferível 300 % ou mais, da atividade observada em uma cepa do tipo selvagem ou cepa não modificada. Exemplos de cepas do tipo selvagem do microorganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae* pode servir como uma referência para a comparação, incluem a cepa de *Escherichia coli* MG1655 (ATCC nº 47076) e a cepa W3110 (ATCC nº 27325), a cepa *Pantoea ananatis* AJ13335 (FERM BP-6615), e assim por diante.

Exemplos do gene codificando para a frutose-6-fosfato aldolase incluem o gene *fsaA* codificando para a aldolase tipo I (SEQ ID NO: 68, os nucleotídeos números 862865..863527 do GenBank Acesso nº NC_000913), e o gene *fsaB* (gene *talC*) (SEQ ID NO: 70, filamento complementar dos nucleotídeos números 4137069..4137731 do GenBank Acesso nº NC_000913) codificando para a aldolase do tipo II, os quais são

derivados do *Escherichia coli*.

O gene codificado para a frutose-6-fosfato aldolase pode ser um DNA que hibridize com uma sequência complementar de sequência de nucleotídeos SEQ ID NO: 68 ou 70 ou uma sonda que possa ser preparada da sequência complementar sob uma condição estrigente, e codifique para uma proteína tendo a atividade da frutose-6-fosfato aldolase. Exemplos também incluem um DNA codificando para a proteína de SEQ ID NO: 69 ou 71. A proteína pode ser uma proteína apresentando uma homologia de 80 % ou mais, preferivelmente 90 % ou mais, mais preferível 95 % ou mais, ainda mais preferível 98 % ou mais, à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 69 ou 71, contanto que apresente atividade aumentada da frutose-6-fosfato aldolase em um microorganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, quando ela é introduzida no microorganismo.

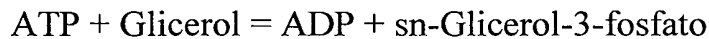
Além disso, o gene pode ser um DNA codificado para uma proteína tendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 69 ou 71, mas que pode incluir substituição, deleção, inserção, adição ou semelhante, de um ou vários resíduos de aminoácidos, contanto que a atividade da frutose-6-fosfato aldolase não seja reduzida.

A atividade da frutose-6-fosfato aldolase pode ser medida pelo uso do método de Schurmann, M., Sprenger, G. A. *et al.* (*J. Biol. Chem.*, 6 de abril de 2001, 276 (14): 11055-11061). A atividade pode ser aumentada por métodos semelhantes aos métodos acima mencionados para intensificar a glicerol desidrogenase e a diidroxiacetona quinase.

O microorganismo usado para o método de produção da presente invenção é preferivelmente modificado para reduzir a atividade da glicerol quinase e/ou da glicerol-3-fosfato desidrogenase do tipo de ligação a membrana, além da intensificação da glicerol desidrogenase e diidroxiacetona quinase, a intensificação da atividade de captação do glicerol, e a intensificação das atividades de uma ou mais espécies de enzimas

selecionadas do grupo consistindo de triosefosfato isomerase, frutose bisfosfato aldolase, frutose-1,6-bisfosfatase e frutose-6-fosfato aldolase.

Na presente invenção, “glicerol quinase” significa uma enzima que catalisa reversivelmente a seguinte reação que gera glicerol-3-fosfato e ADP de glicerol e ATP (EC 2.7.1.30).

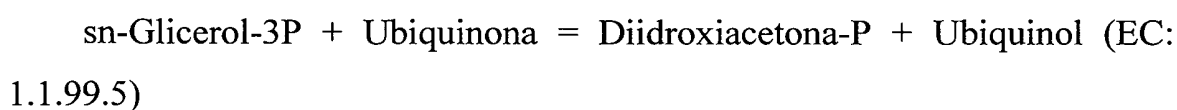


A frase “modificado para reduzir a atividade da glicerol quinase” pode significar que o número das moléculas de glicerol quinase por célula seja reduzida, em comparação com aquele de uma cepa do tipo selvagem ou cepa não modificada, ou que a atividade da glicerol quinase por molécula seja reduzida em comparação com aquela de uma cepa do tipo selvagem ou cepa não modificada. A modificação é preferivelmente realizada de modo que a atividade da glicerol quinase por célula seja reduzida a 70 % ou menos, mais preferível a 50 % ou menos, ainda mais preferível a 30 % ou menos, o mais preferível 20 % ou menos, da atividade de uma cepa do tipo selvagem ou cepa não modificada, e a atividade enzimática possa ser deletada. A atividade enzimática pode ser reduzida pela redução da quantidade de expressão do gene codificando para a enzima. A redução da quantidade de expressão do gene inclui a redução da quantidade de transcrição do mRNA transcrito do gene e redução da quantidade de translação deste mRNA.

A eliminação completa da produção da molécula protéica da enzima ou a redução ou deleção da atividade por molécula protéica da enzima são obtidas pelo rompimento do gene codificando para a enzima. Exemplos de cepas do tipo selvagem do microorganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae* que podem servir como uma referência para a comparação, incluem a cepa de *Escherichia coli* MG1655 (ATCC nº 47076) e a cepa W3110 (ATCC nº 27325), a cepa *Pantoea ananatis* AJ13335 (FERM BP-6615), e assim por diante.

Exemplos do gene codificando para a glicerol quinase incluem o gene *glpK* (SEQ ID NO: 24, filamento complementar dos nucleotídeos números 4113737..4115245 do GenBank Acesso nº NC_000913) derivado de *Escherichia coli*. A atividade enzimática da glicerol quinase pode ser medida pelo método de Thorner & Paulus (*The Enzymes*, 3ª edição, 8, 487-508).

Na presente invenção, a “glicerol-3-fosfato desidrogenase do tipo de ligação de membrana” é uma enzima que catalisa a reação de oxidação convertendo o glicerol-3-fosfato em fosfato de diidroxiacetona, e é uma enzima que reversivelmente catalisa a seguinte reação:



A frase “modificado para reduzir a atividade da glicerol-3-fosfato desidrogenase” significa que o número das moléculas da glicerol-3-fosfato desidrogenase do tipo de ligação à membrana por célula seja reduzido em comparação com aquela de uma cepa do tipo selvagem ou cepa não modificada, ou a uma condição em que a atividade da glicerol-3-fosfato desidrogenase do tipo de ligação à membrana por molécula seja reduzida em comparação com aquela de uma cepa do tipo selvagem ou cepa não modificada. A modificação é preferivelmente realizada de modo que a atividade da glicerol-3-fosfato desidrogenase do tipo de ligação à membrana por célula seja reduzida a 70 % ou menos mais preferível a 50 % ou menos, ainda mais preferível 30 % ou menos, da atividade de uma cepa do tipo selvagem ou cepa não modificada, e a atividade enzimática possa ser deletada. A atividade enzimática pode ser reduzida pela redução da quantidade de expressão do gene codificando para a enzima. Exemplos de cepas do tipo selvagem do microorganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae* que podem servir como uma referência para a comparação, incluem a cepa MG1655 de *Escherichia coli* MG1655 (ATCC nº 47076) e a cepa W3110 (ATCC nº 27325), *Pantoea ananatis* AJ13335

(FERM BP-6615), e assim por diante.

A glicerol-3-fosfato desidrogenase do tipo de ligação à membrana é codificada pelo óperon *glpABC* e pelo gene *glpD*, e exemplos do gene *glpA* de *Escherichia coli* incluem a sequência de SEQ ID NO: 26 (os nucleotídeos números 2350669..2352297 do GenBank Acesso nº NC_000913), exemplos do gene *glpB* de *Escherichia coli* incluem a sequência de SEQ ID NO: 28 (os nucleotídeos números 2352287..2353546 do GenBank Acesso nº NC_000913), exemplos do gene *glpC* gene de *Escherichia coli* incluem a sequência de SEQ ID NO: 30 (os nucleotídeos números 2353543..2354733 do GenBank Acesso nº NC_000913), e exemplos do gene *glpD* de *Escherichia coli* incluem a sequência de SEQ ID NO: 32 (os nucleotídeos números 3560036..3561541 do GenBank Acesso nº NC_000913).

A redução da atividade de uma enzima objetivo, tal como a glicerol quinase e a glicerol-3-fosfato desidrogenase mencionadas acima, podem ser obtida por

(1) redução ou deleção da atividade enzimática pela introdução de uma mutação em uma região codificadora de um gene codificando para a enzima objetiva, ou

(2) redução ou deleção da atividade enzimática pela modificação de uma sequência de controle da expressão de um gene codificando para a enzima objetivo.

(1) Redução ou deleção da atividade enzimática pela introdução de mutação na região codificadora do gene codificando para a enzima objetiva

A introdução de uma mutação em uma região codificadora de um gene codificando para uma enzima objetiva pode ser obtida pela introdução de uma mutação para uma substituição de aminoácido (mutação sem sentido), um códon de parada (mutação sem sentido), ou uma mutação de

deslocamento que adiciona ou deleta um ou dois nucleotídeos em uma região do gene objetivo codificando para a enzima em um cromossoma por recombinação genética [*Journal of Biological Chemistry*, 272: 8611-8617 (1997); *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 95 5511-5515 (1998); *Journal of Biological Chemistry*, 266, 20833-20839 (1991)].
Pode também ser obtida pela deleção de uma parte do gene ou de todo o gene na região codificadora. Especificamente, ela pode ser obtida pela introdução de uma mutação e uma parte do DNA das SEQ ID NOs: 24, 26, 28, 30 ou 32, ou deletando-se uma parte ou a totalidade de tal DNA.

Com relação à introdução da mutação, a atividade enzimática também pode ser reduzida ou deletada pela construção de um gene codificando para uma enzima mutante da qual a região codificadora é deletada ou introduzida com uma mutação, e substituindo-se o gene normal pelo gene construído em um cromossoma mediante recombinação homóloga ou semelhante, ou mediante a introdução de um transpóson ou fator IS no gene.

Para a introdução de tais mutações para reduzir ou deletar a atividade de uma enzima como descrito acima, em um gene por recombinação genética, por exemplo, os seguintes métodos são usados. Por modificação de uma sequência parcial de um gene objetivo para preparar um gene mutante planejado de modo que ele não produza uma enzima que funcione normalmente, e transformação de um microorganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae* com um DNA contendo o gene para causar a recombinação do gene mutante e o correspondente gene em um cromossoma, o gene objetivo em um cromossoma pode ser substituído pelo gene mutante. Para tal substituição de genes utilizando recombinação homóloga, pode ser utilizado um método denominado de integração conduzida Red [Datsenko, K. A e Wanner, B. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 6640-6645 (2000)], um método de uso de um DNA linear tal como um método utilizando a integração

conduzida Red em combinação com um sistema excisivo derivado do fago λ [Cho, E. H., Gumpert, R. I., Gardner, J. F., *J. Bacteriol.*, 184: 5200-5203 (2002)], um método de uso de um plasmídeo contendo uma origem de replicação sensível à temperatura [Datsenko, K. A. e Wanner, B. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 6640-6645 (2000), Patente U.S. nº 6.303.383, Patente Japonesa Aberta ao Público nº 05-007491], e assim por diante. Além disso, tal mutagênese específica do sítio com base na substituição de genes utilizando recombinação homóloga como descrito acima, pode também ser realizada pelo uso de um plasmídeo que não é capaz de replicação em um hospedeiro. Além disso, a redução ou deleção da atividade enzimática também pode ser obtida pela modificação para introduzir uma mutação em uma região codificadora de um gene objetivo causada por um tratamento usual de mutação com base na irradiação de raios-X ou ultravioleta, ou o uso de um agente de mutação tal como a N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina.

(2) Redução ou deleção da atividade enzimática pela modificação da sequência de controle da expressão do gene codificando para a enzima objetiva

A redução ou deleção de uma atividade enzimática pela modificação de uma sequência de controle da expressão de um gene codificando para uma enzima objetiva, podem também ser obtidas pela redução da quantidade de expressão mediante introdução de uma mutação em uma sequência de controle da expressão, tal como uma sequência promotora e SD em um DNA cromossômico, mediante amplificação de um gene codificando para um regulador que reduza a expressão do gene, ou mediante a deleção ou atenuação de um gene codificando para um ativador que melhore a expressão do gene. Métodos para avaliar a potência dos promotores e exemplos de promotores potentes são descritos no documento de Goldstein *et al.* (*Prokaryotic promoters in biotechnology, Biotechnol. Annu. Rev.*, 1995, 1, 105-128), e assim por diante. Além disso, é conhecido o fato de que, mediante

substituição de vários nucleotídeos na região espaçadora entre o sítio de ligação ribossômica (RBS) e o códon de partida, em particular na região imediatamente a montante do códon de partida, a eficiência da translação do mRNA pode ser significativamente afetada, e uma tal região pode também ser modificada. Em particular, os genes *glpA*, *B* e *C* adquirem uma estrutura de óperon e, portanto, a sua quantidade de expressão pode ser reduzida pela introdução de uma mutação em uma região de controle da expressão, tal como uma região promotora localizando-se a montante de *glpA*.

<2> MÉTODO DE PRODUÇÃO DA PRESENTE

10 INVENÇÃO

O método de produção da presente invenção é um método para produzir um L-aminoácido, o qual compreende cultivar um microorganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, tendo uma capacidade de produzir L-aminoácido, e modificado para aumentar as atividades das glicerol desidrogenase e da diidroxiacetona quinase sejam aumentadas em um meio contendo glicerol como uma fonte de carbono para produzir e acumular um L-aminoácido no meio ou as células, e coletar o L-aminoácido do meio ou das células. Para o método da presente invenção, qualquer uma dentre a cultura de bateladas, a cultura de bateladas alimentadas ou a cultura contínua pode ser usada. O glicerol contido no meio pode estar contido no meio de partida, no meio de alimentação ou em ambos.

Na presente invenção, a cultura de batelada alimentada refere-se a um método de cultura em que o meio é contínua ou intermitentemente alimentado no vaso de cultura, e o meio não é extraído até o final da cultura. A cultura contínua significa um método em que o meio é contínua ou intermitentemente alimentado no vaso de cultura, e o meio é extraído do vaso (usualmente em um volume igual ao volume do meio alimentado) ao mesmo tempo. O meio de partida significa um meio usado na cultura de batelada antes da alimentação do meio de alimentação na cultura de batelada

alimentada ou na cultura contínua (meio usado no início da cultura). O meio de alimentação significa um meio que é suprido ao tanque de fermentação na cultura de batelada alimentada ou cultura contínua. A cultura de bateladas significa um método em que o meio fresco é preparado para cada cultura, uma cepa é inoculada no meio fresco, e o meio não é adicionado depois disso até a colheita.

O glicerol presente no meio usado na presente invenção pode ser a única fonte de carbono, ou um meio misto pode ser usado que contém outras fontes de carbono além do glicerol. Preferidos são os sacarídeos tais como a glicose, frutose, sacarose, lactose, galactose, melaços e solução de açúcar obtida pela hidrólise de hidrolisato de amido ou biomassa, álcoois tais como o etanol, e ácidos orgânicos tais como o ácido fumárico, o ácido cítrico e o ácido succínico. Quando um meio misto é usado, o glicerol presente preferivelmente no meio em uma relação de 50 % ou mais, preferivelmente 60 % ou mais, mais preferível 70 % ou mais, ainda mais preferível 80 % ou mais, especialmente preferível 90 % ou mais. É especialmente preferível usar o glicerol obtido como um subproduto da produção de combustível biodiesel [Mu, Y. *et al*, *Biotechnol. Lett.*, 28, 1755-91759 (2006); Haas, M. J. *et al.*, *Bioresour. Technol.*, 97, 4, 671-8678 (2006)].

Quanto aos outros componentes que podem ser adicionados ao meio, um meio típico contendo, além da fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio, íons inorgânicos e outros componentes orgânicos conforme necessários, podem ser usados. Como a fonte de nitrogênio contida no meio usado para a presente invenção, amônia, sais de amônio tais como o sulfato de amônio, o carbonato de amônio, cloreto de amônio, fosfato de amônio, acetato de amônio e uréia, nitratos, e assim por diante, podem ser usados. A amônia gasosa e a amônia aquosa usadas para ajustar o pH podem também ser utilizadas como a fonte de nitrogênio. Além disso, a peptona, o extrato de levedura, o extrato de carne, extrato de malte, licor de infusão de milho,

hidrolisado de soja, e assim por diante, podem também ser utilizados. O meio pode conter uma ou mais destas fontes de nitrogênio. Estas fontes de nitrogênio podem também ser usadas tanto para o meio de partida quanto para o meio de alimentação. Além disso, a mesma fonte de nitrogênio pode ser usada tanto para o meio de partida quanto para o meio de alimentação, ou a fonte de nitrogênio do meio de alimentação pode ser diferente daquela do meio de partida.

O meio usado para a presente invenção preferivelmente contém uma fonte de ácido fosfórico e uma fonte de enxofre além da fonte de carbono, a fonte de nitrogênio e enxofre. Como a fonte de ácido fosfórico, diidrogenfosfato de potássio, hidrogenfosfato dipotássico, polímeros de fosfato tais como o ácido pirofosfórico e assim por diante, podem ser utilizados. A fonte de enxofre pode ser qualquer fonte de enxofre contanto que o átomo de enxofre esteja contido, e sais de ácido sulfúrico tais como sulfatos, tiosulfatos e sulfitos, e aminoácidos contendo enxofre, tais como a cisteína, a cistina e a glutatona, são desejáveis preferíveis. Entre estes, o sulfato de amônio é particularmente preferível.

Além disso, o meio pode conter um fator de promoção do crescimento (nutriente tendo um efeito de promoção do crescimento) além da fonte de carbono, da fonte de nitrogênio e enxofre. Como o fator de promoção do crescimento, metais de traço, aminoácidos, vitaminas, ácidos nucléico, bem como peptona, ácido casamino, extrato de levedura, produto da degradação da proteína de soja, e assim por diante, contendo as substâncias acima citadas, podem ser usados. Exemplos dos metais de traço incluem o ferro, o manganês, magnésio, cálcio, e assim por diante. Exemplos das vitaminas incluem a vitamina B₁, a vitamina B₂, a vitamina B₆, o ácido nicotínico, a amida de ácido nicotínico, a vitamina B₁₂, e assim por diante. Estes fatores de promoção do crescimento podem estar contidos no meio de partida ou no meio de alimentação.

Além disso, quando um mutante auxotrófico que requeira um aminoácido ou semelhante para o seu crescimento seja usado, ele é de preferência para suplementar um nutriente requerido ao meio. Em particular, uma vez que a via biossintética da L-lisina seja intensificada e a capacidade de degradação da L-lisina seja atenuada em muitas das bactérias produtoras da L-lisina que seja usada para a presente invenção como descrito abaixo, um ou mais tipos de substâncias selecionadas da L-treonina, L-homosserina, L-isoleucina e L-metionina são preferivelmente adicionados.

O meio de partida e o meio de alimentação podem ter as mesmas ou diferentes composições. Além disso, o meio de partida e o meio de alimentação podem ter as mesmas ou diferentes concentrações de enxofre. Além disso, quando o meio de alimentação é fornecido em estágios múltiplos, as composições dos meios de alimentação podem ser as mesmas ou diferentes.

A cultura é preferivelmente realizada como uma cultura de aeração em uma temperatura de fermentação de 20 a 45 °C, particularmente preferível em 30 a 42 °C. A concentração de oxigênio é ajustada em 5 a 50 %, preferivelmente em cerca de 10 %. Além disso, a cultura de aeração é preferivelmente realizada com pH ajustado em 5 a 9. Se o pH cair durante a cultura, por exemplo, carbonato de cálcio ou um álcali tal como amônia gasosa e amônia aquosa podem ser adicionados para neutralizar a cultura. Quando a cultura é realizada sob tais condições preferivelmente por cerca de 10 a 120 horas, uma quantidade marcante de L-aminoácidos se acumula no meio de cultura. Não obstante a concentração de L-aminoácidos que se acumula não seja limitada contanto que ela seja mais elevada do que aquela observada com as cepas do tipo selvagem, e o L-aminoácido possa ser isolado e coletado do meio, ela pode ser de 50 g/litro ou mais elevada, preferivelmente de 75 g/litro ou mais elevada, mais preferivelmente de 100 g/litro ou mais elevada.

O L-aminoácido pode ser coletado, por um método de coleta conhecido, do meio de cultura após a cultura. Por exemplo, pela remoção das células do meio de cultura mediante centrifugação ou semelhante, e depois, cristalizando-se o L-aminoácido por concentração, este pode ser coletado.

5 Na presente invenção, a cultura do microorganismo pode ser realizada como cultura de semente e cultura principal de modo a assegurar o acúmulo do L-aminoácido mais elevado do que um certo nível. A cultura de semente pode ser realizada como uma cultura de agitação com o uso de um frasco ou semelhante, ou cultura de batelada, e a cultura principal pode ser realizada como cultura de batelada alimentada ou cultura contínua. Alternativamente, tanto a cultura de semente quanto a cultura principal podem ser realizadas como cultura de batelada.

Quando a cultura de batelada alimentada ou cultura contínua seja realizada de acordo com a presente invenção, o meio de alimentação pode ser intermitentemente alimentado de modo que o suprimento do glicerol e de outra fonte de carbono seja temporariamente interrompido. O suprimento do meio de alimentação é preferivelmente interrompido por, no máximo, 30 % ou menos, preferivelmente 20 % ou menos, particularmente preferivelmente 10 % ou menos, do tempo de alimentação. Quando o meio de alimentação é intermitentemente alimentado, o meio de alimentação pode ser inicialmente adicionado através de um período predeterminado, e a segunda adição e as adições seguintes podem ser controladas de modo que elas sejam iniciadas quando a elevação do pH ou a concentração de oxigênio dissolvido sejam detectados por um computador após a depleção da fonte de carbono no meio de fermentação. Isso geralmente ocorre durante o período quando nenhum meio está sendo alimentado, e antes de quando o meio é alimentado, e assim a concentração do substrato no tanque de cultura é sempre automaticamente mantida em um nível baixo (Patente U.S. nº 5.912.113).

O meio de alimentação usado para a cultura de batelada

alimentada é preferivelmente um meio contendo glicerol ou outra fonte de carbono e um nutriente tendo um efeito de promoção do crescimento (fator de promoção do crescimento), e a concentração do glicerol e a concentração da outra fonte de carbono no meio de fermentação podem ser controladas de modo a estarem nas concentrações predeterminadas ou mais baixas. Como a outra fonte de carbono, a glicose, a sacarose e a frutose são preferidas. Como o fator de promoção do crescimento, a fonte de nitrogênio, o ácido fosfórico, os aminoácidos e assim por diante são preferidos. Como a fonte de nitrogênio, a amônia, os sais de amônio tais como o sulfato de amônio, o carbonato de amônio, o cloreto de amônio, o fosfato de amônio, o acetato de amônio e a uréia, os nitratos, e assim por diante, podem ser usados. Além disso, como a fonte de ácido fosfórico, o diidrogenfosfato de potássio e o hidrogenfosfato dipotássico podem ser usados. Quanto aos aminoácidos, quando uma cepa mutante auxotrófica seja usada, é preferível adicionar os nutrientes requeridos. Além disso, o meio de alimentação pode incluir um tipo de meio, ou uma mistura de dois ou mais tipos de meios. Quando dois ou mais tipos de meios de alimentação sejam usados, os meios podem ser misturados e alimentados mediante o uso de uma lata de alimentação ou alimentados pelo uso de duas ou mais latas de alimentação.

Quando o método de cultura contínua for usado para a presente invenção, o meio pode ser extraído e alimentado simultaneamente, ou uma parte do meio pode ser extraída, e depois o meio pode ser alimentado. Além disso, o método pode também ser um método de cultura contínua que inclui extrair o meio de cultura contendo o L-aminoácido e células bacterianas, e devolvendo-se apenas as células ao fermentador para reutilização das células (Patente Francesa nº 2669935). Como o método de se alimentar contínua ou intermitentemente uma fonte de nutriente, o mesmo método usado na cultura de batelada alimentada é usado.

O método de cultura contínua de reutilizar as células

bacterianas é um método de extrair intermitente ou continuamente o meio de fermentação quando a concentração do aminoácidos alcança um nível predeterminado, extraindo-se apenas o L-aminoácido e recirculando-se os resíduos de filtração contendo células bacterianas para o fermentador, e isso pode ser realizado mediante referência, por exemplo, à Patente Francesa nº 2669935.

Quando o meio de cultura é intermitentemente extraído, é preferível que uma porção da quantidade de L-aminoácido possa ser extraída quando a concentração do L-aminoácido alcance um nível predeterminado, e um meio fresco seja alimentado de modo a continuar a cultura. Além disso, no que diz respeito ao volume do meio a ser adicionado, a cultura é preferivelmente realizada de modo que o volume final do meio, após a adição do meio, seja igual ao volume do meio de cultura antes da extração. O termo “igual” pode significar que o volume corresponde a cerca de 93 a 107 % do volume do meio de cultura antes da extração.

Quando o meio de cultura é continuamente extraído, a extração é preferivelmente iniciada ao mesmo tempo da alimentação ou após a alimentação do meio nutriente. Por exemplo, o tempo de início da extração é, no máximo de 5 horas, preferivelmente de 3 horas, mais preferivelmente de 1 hora, após o início da alimentação. Além disso, o volume de extração do meio de cultura é preferivelmente igual ao volume do meio alimentado.

<3> MICROORGANISMOS QUE PODEM SER USADOS COMO CEPAS PRECURSORAS PARA DERIVAR MICROORGANISMOS EXEMPLARES DA PRESENTE INVENÇÃO

Na presente invenção, uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae* e tendo uma capacidade de produzir L-aminoácido, que possa metabolizar glicerol como uma fonte de carbono, pode ser usada como uma cepa precursora, e a propriedade desejada na presente invenção pode ser comunicada pelos métodos acima mencionados.

A família *Enterobacteriaceae* inclui bactérias pertencentes aos gêneros de *Escherichia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Photorhabdus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Morganella*, *Yersinia*, e assim por diante. Em particular, as bactérias classificadas na família *Enterobacteriaceae* de acordo com a taxonomia usada pela base de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=91347>) são preferidas.

A expressão “uma bactéria pertencente ao gênero *Escherichia*” significa que a bactéria é classificada dentro do gênero *Escherichia* de acordo com a classificação conhecida de uma pessoa versada na técnica de microbiologia, embora a bactéria não seja particularmente limitada. Exemplos da bactéria pertencente ao gênero *Escherichia* usada na presente invenção incluem, porém sem limitar, a *Escherichia coli* (*E. coli*).

A bactéria pertencente ao gênero *Escherichia* que pode ser usada na presente invenção não é particularmente limitada. Entretanto, os exemplos incluem, por exemplo, as bactérias dos grupos filéticos descritos no trabalho de Bachmann *et al.*, Tabela 1 (Bachmann, B. J., 1996, pp. 2460-2488, em F. D. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*/Segunda Edição, American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.). Exemplos específicos incluem *Escherichia coli* W3110 (ATCC 27325), *Escherichia coli* MG1655 (ATCC 47076) e assim por diante, derivados da cepa do tipo selvagem do protótipo, a cepa K12.

Estas cepas acham-se disponíveis, por exemplo, da American Type Culture Collection (Endereço: 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, Estados Unidos da América). Em outras palavras, os números de acesso são fornecidos a cada uma das cepas, e as cepas podem ser ordenadas pelo uso destes números. Os números de acesso das cepas são listados no catálogo da American Type Culture Collection.

A expressão de uma bactéria pertencente ao gênero *Pantoea* significa que a bactéria é classificada no gênero *Pantoea* de acordo com a classificação conhecida de uma pessoa habilitada na técnica da microbiologia. Algumas cepas da *Enterobacter agglomerans* foram recentemente reclassificadas nas *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea stewartii* ou semelhante, com base na análise da sequência de nucleotídeos de 16S rRNA etc. [*Int. J. Syst. Bacteriol.*, 43, 162-173 (1993)]. Na presente invenção, as bactérias pertencentes ao gênero *Pantoea* podem incluir essas bactérias reclassificadas dentro do gênero *Pantoea* como descrito acima.

Na presente invenção, uma bactéria tendo uma capacidade de produzir o L-aminoácido (uma capacidade de produzir um L-aminoácido) significa uma bactéria que pode produzir e secretar um L-aminoácido em um meio quando ele é cultivado no meio. Preferivelmente significa uma bactéria que pode acumular um L-aminoácido objetivo no meio em uma quantidade não menor do que 0,5 g/litro,, mais preferível não menor do que 1,0 g/litro. O “L-aminoácido” encerra L-alanina, L-arginina, L-asparagina, ácido L-aspartico, L-cisteína, ácido L-glutâmico, L-glutamina, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L-tirosina e L-valina. A L-treonina e a L-lisina são particularmente preferidas.

Como uma cepa precursora usada na presente invenção, qualquer das bactérias produtoras de L-aminoácido relatadas até aqui podem ser usadas, contanto que uma cepa que possa assimilar glicerol seja escolhida. Doravante, as bactérias produtoras de L-aminoácidos utilizáveis no método da presente invenção são descritas.

BACTÉRIAS PRODUTORAS DE L-TREONINA

Exemplos de bactérias produtoras de L-treonina e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar tais bactérias incluem, porém sem limitar, as cepas pertencentes ao gênero *Escherichia*, tais como *E. coli*

TDH-6/pVIC40 (VKPM B-3996) (Patente U.S. nº 5.175.107, Patente U.S. nº 5.705.371), *E. coli* 472T23/pYN7 (ATCC 98081) (Patente U.S. nº 5.631.157), *E. coli* NRRL-21593 (Patente U.S. nº 5.939.307), *E. coli* FERM BP-3756 (Patente U.S. nº 5.474.918), *E. coli* FERM BP-3519 e FERM BP-3520 (Patente U.S. 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 assim por diante.

A cepa TDH-6 é deficiente no gene *thrC*, bem como sendo sacarose assimilativa, e o seu gene *ilvA* tem uma mutação avariada. Esta cepa também tem uma mutação no gene *rhtA*, que comunica resistência à alta concentração de treonina ou homoserina. A cepa B-3996 abriga o plasmídeo pVIC40 obtido pela inserção de um óperon *thrA*BC* contendo um gene *thrA* mutante em um vetor derivado de RSF1010. Este gene *thrA* mutante codifica a homoserina desidrogenase I de aspartoquinase que é substancialmente dessensibilizada à inibição da realimentação pela treonina. A cepa B-3996 foi depositada em 19 de novembro de 1987 na All-Union Scientific Center of Antibiotics (Nagatinskaya Street 3-A, 117105 Moscou, Rússia) sob o número de acesso RIA 1867. A cepa foi também depositada na Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) em 7 de abril de 1987 sob o número de acesso VKPM B-3996.

O *E. coli* VKPM B-5318 (EP 0593792 B) pode também ser usado como uma bactéria produtora da L-treonina ou uma cepa precursora para originá-la. A cepa B-5318 é prototrófica com respeito à isoleucina, e nesta cepa, um repressor C1 de fago lambda sensível à temperatura e o promotor PR substituem a região reguladora do óperon da treonina no plasma pVIC40. A cepa VKPM B-5318 foi depositada na Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Rússia) em 3 de maio de 1990, sob o número de acesso de VKPM B-5318.

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

- o gene mutante *thrA* que codifica para a homoserina desidrogenase I de aspartoquinase resistente à inibição da realimentação pela treonina;
- o gene *thrB* que codifica para a homoserina quinase;
- o gene *thrC* que codifica para a treonina sintase;
- o gene *rhtA* que codifica para uma proteína putativa da transmembrana;
- o gene *asd* que codifica para a aspartato- β -semialdeído desidrogenase; e
- o gene *aspC* que codifica para aspartato aminotransferase (aspartato transaminase).

O gene *thrA* que codifica a homoserina desidrogenase I de aspartoquinase de *Escherichia coli* foi esclarecido (nucleotídeos números 337 a 2799, GenBank acesso NC_000913.2, gi: 49175990). O gene *thrA* é localizado entre os genes *thrL* e *thrB* no cromossoma de *E. coli* K-12. O gene *thrB* que codifica a homoserina quinase de *Escherichia coli* foi esclarecido (nucleotídeos números 2801 a 3733, GenBank acesso NC_000913.2, gi: 49175990). O gene *thrB* localiza-se entre os genes *thrA* e *thrC* no cromossoma de *E. coli* K-12. O gene *thrC* que codifica a treonina sintase de *Escherichia coli* foi esclarecido (nucleotídeos números 3734 a 5020, GenBank acesso NC_000913.2, gi: 49175990). O gene *thrC* é localizado entre o gene *thrB* e a matriz de leitura aberta *yaaX* no cromossoma de *E. coli* K-12. Todos três desses genes funcionam como um óperon de treonina único. Para aumentar a expressão do óperon de treonina, a região do atenuador que afeta a transcrição é preferivelmente removida do óperon (WO 2005/049808, WO2003/097839).

O gene mutante *thrA* que codifica para a homoserina desidrogenase I de aspartoquinase resistente à inibição da realimentação pela treonina, bem como os genes *thrB* e *thrC* podem ser obtidos como um óperon do bem conhecido pVIC40 que se acha presente na cepa VKPM B-3996 produtora da treonina. O plasmídeo pVIC-40 é descrito em detalhes na Patente U.S. nº 5.705.371.

O gene *rhtA* está presente em 18 minutos sobre o cromossoma de *E. coli* próximo ao óperon *glnHPQ*, o qual codifica componentes do sistema de transporte da glutamina. O gene *rhtA* é idêntico a ORF1 (gene *ybiF*, nucleotídeos números 764 a 1651, GenBank acesso número AAA218541, gi:440181) e está localizado entre os genes *pexB* e *ompX*. A unidade expressando uma proteína codificada pelo ORF1 foi designada gene *rhtA* (*rht*: resistência a homoserina e à treonina). Foi também revelado que a mutação de *rhtA23* é uma substituição de G-por-A na posição -1 em relação ao códon de partida ATG (*ABSTRACTS of the 17th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology* em combinação com o *Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, São Francisco, Califórnia 24 a 29 de agosto de 1997, resumo nº 457, EP 1013765 A).

O gene *asd* de *E. coli* já foi esclarecido [nucleotídeos números 3572511 a 3571408, GenBank Acesso NC_000913.1, gi:16131307), e pode ser obtido por PCR (referir-se a White, T. J., Arnheim, N. e Erlich, H. A., *Trends Genet.*, 5, 185-189 (1989)] utilizando-se iniciadores preparados com base na sequência de nucleotídeos do gene. Os genes *asd* dos outros microorganismos podem ser obtidos de uma maneira semelhante.

O gene *aspC* de *E. coli* já foi também esclarecido (nucleotídeos números 983742 a 984932, GenBank Acesso NC_000913.1, gi:16128895), e pode ser obtido por PCR. Os genes *aspC* de outros microorganismos podem ser obtidos de uma maneira semelhante.

BACTÉRIAS PRODUTORAS DA L-LISINA

Exemplos de bactérias produtoras da L-lisina pertencentes ao gênero *Escherichia* incluem mutantes tendo resistência a um análogo da L-lisina. Os análogos da L-lisina inibem o crescimento de bactérias pertencentes ao gênero *Escherichia*, mas esta inibição é completa ou parcialmente dessensibilizada quando a L-lisina está presente em um meio. Exemplos do análogo da L-lisina incluem, porém sem limitar, a oxalisina, hidroxamato de lisina, S-(2-aminoetil)-L-cisteína (AEC), γ -metil-lisina, α -clorocaprolactama e assim por diante. Os mutantes tendo resistência a estes análogos de lisina podem ser obtidos submetendo-se as bactérias pertencentes ao gênero *Escherichia* a um tratamento de mutagênese artificial convencional. Exemplos específicos de cepas bacterianas úteis para produzir L-lisina incluem *Escherichia coli* AJ11442 (FERM BP-1543, NRRL B-12185; ver a Patente U.S. nº 4.346.170) e *Escherichia coli* VL611. Nestes microorganismos, a inibição da realimentação da aspartoquinase pela L-lisina é dessensibilizada.

A cepa WC196 pode ser usada como uma bactéria de *Escherichia coli* produtora da L-lisina. Esta cepa bacteriana foi criada conferindo-se resistência AEC à cepa W3110, que foi derivada de *Escherichia coli* K-12. Esta cepa foi designada *Escherichia coli* AJ13069 e foi depositada no National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology (presentemente National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary, Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japão) em 6 de dezembro de 1994, e lhe foi atribuído um número de acesso de FERM P-14690. Depois, ela foi transmudada para um depósito internacional sob as disposições do Tratado de Budapeste em 29 de setembro de 1995, e lhe foi atribuído o número de acesso FERM BP-5252 (Patente U.S. nº 5.827.698).

Exemplos de bactérias produtoras da L-lisina e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar tais bactérias também incluem cepas em que a expressão de um ou mais genes codificando uma enzima biossintética de L-lisina é aumentada. Exemplos de tais genes incluem, porém sem limitar, o gene da diidro-dipicolinato sintase (*dapA*), o gene da aspartoquinase (*lysC*), o gene da diidro-dipicolinato redutase (*dapB*), o gene da diaminopimelato descarboxilase (*lysA*), o gene da diaminopimelato desidrogenase (*ddh*) (Patente U.S. nº 6.040.160), o gene da fosfoenolpiruvato carboxilase (*ppc*), o gene da aspartato semialdeído desidrogenase (*asd*), e o gene da aspartase (*aspA*) (EP 1253195 A). Além disso, as cepas precursoras podem ter um nível aumentado de expressão do gene envolvido na eficiência de energia (*cyo*) (EP 1170376 A), o gene codificando a nicotinamida nucleotídeo transidrogenase (*pntAB*) (Patente U.S. nº 5.830.716), o gene *ybjE* (WO 2005/073390), o gene codificando para a glutamato desidrogenase [*gdhA*, *Gene*, 23: 199-209 (1983)], ou combinações destes. As abreviaturas dos genes são indicadas entre parênteses.

É conhecido o fato de que a diidro-dipicolinato sintetase do tipo selvagem, derivada de *Escherichia coli*, sofre da inibição da realimentação pela L-lisina, enquanto a aspartoquinase do tipo selvagem de *Escherichia coli* sofre da supressão e inibição da realimentação pela L-lisina. Portanto, quando os genes *dapA* e *lysC* são usados, estes genes são preferivelmente genes mutantes codificando as enzimas que não sofram da inibição da realimentação pela L-lisina.

Exemplos de DNA codificando uma diidro-dipicolinato sintetase mutante dessensibilizada para inibição de realimentação pela L-lisina incluem um DNA codificando uma proteína que tem a sequência de aminoácidos da enzima em que a histidina na posição 118 é substituída pela tirosina. Exemplos de DNA codificando uma aspartoquinase mutante dessensibilizada para a inibição da realimentação pela L-lisina, incluem um

DNA codificando um AKIII tendo a sequência de aminoácidos na qual a treonina na posição 352 a glicina na posição 323, e a metionina na posição 318, são substituídas pelas isoleucina, asparagina e isoleucina, respectivamente (Patente U.S. nº 5.661.012 e Patente U.S. nº 6.040.160). Tais

5 DNAs mutantes podem ser obtidos pela mutagênese específica do sítio com o uso da PCR ou semelhante.

Os plasmídeos RSFD80, pCAB1 e pCABD2 de faixa de hospedeiros ampla, são conhecidos como plasmídeos contendo um gene mutante *dapA* codificando uma diidrodipicolinato sintetase e um gene

10 mutante *lysC* codificando uma aspartoquinase mutante (Patente U.S. nº 6.040.160). A cepa de *Escherichia coli* JM109 transformada com RSFD80 foi denominada AJ12396 (Patente U.S. nº 6.040.160), e a cepa foi depositada no National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and

15 Industry (presentemente International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) em 28 de outubro de 1993 e lhe foi atribuído um número de acesso de FERM P-13936, e o depósito foi depois trasladado para um depósito internacional sob as disposições do Tratado de Budapeste em 1 de novembro de 1994 e lhe foi

20 atribuído o número de acesso de FERM BP-4859. RSFD80 pode ser obtido da cepa AJ12396 por um método conhecido.

Exemplos de bactérias produtoras da L-lisina e as cepas precursoras que podem ser usadas para derivar tais bactérias também incluem cepas tendo atividade reduzida ou eliminada de uma enzima que catalisa uma

25 reação para gerar um composto outro que não a L-lisina mediante ramificação da via biossintética da L-lisina. Exemplos das enzimas que catalisam uma reação para gerar um composto outro que não a L-lisina incluem a homoserina desidrogenase, a lisina descarboxilase (Patente U.S. nº 5.827.698), e a enzima málica (WO 2005/010175). De modo a reduzir ou

deletar a atividade da lisina descarboxilase, é preferível reduzir a expressão tanto do gene *cadA* quanto do gene *ldcC* codificando para a lisina descarboxilase (Publicação Internacional WO 2006/038695).

BACTÉRIAS PRODUTORAS DA L-CISTEÍNA

Exemplos de bactérias produtoras da L-cisteína e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar tais bactérias, incluem, porém sem limitar, as cepas pertencentes ao gênero *Escherichia*, tal como a *E. coli* JM15 que é transformada com diferentes alelos de *cysE* codificando para as serinas acetiltransferases resistentes à realimentação (Patente U.S. nº 6.218.168, Pedido de Patente Russa nº 2003121601); *E. coli* W3110 tendo genes superexpressos que codificam proteínas adequadas para secretar substâncias tóxicas para as células (Patente U.S. nº 5.972.663); cepas de *E. coli* tendo atividade reduzida de cisteína dessulfidrase (Patente Japonesa Aberta ao Público nº 11-155571); e *E. coli* W3110 com atividade aumentada de um regulador transcricional positivo para o régulon de cisteína codificado pelo gene *cysB* (WO 01/27307).

BACTÉRIAS PRODUTORAS DA L-LEUCINA

Exemplos de bactérias produtoras da L-leucina e de cepas precursoras que podem ser usadas para derivar tais bactérias, incluem, porém sem limitar, as cepas pertencentes ao gênero *Escherichia*, tais como as cepas de *E. coli* resistentes à leucina [por exemplo a cepa 57 (VKPM B-7386, Patente U.S. nº 6.124.121)] ou os análogos da leucina incluindo a β -2-tienilalanina, 3-hidroxileucina, 4-azaleucina e 5,5,5-trifluoroleucina (Publicação da Patente Japonesa (Kokoku) nº 62-34397 a Patente Japonesa Aberta ao Público nº 8-70879); as cepas de *E. coli* obtidas por um método de engenharia genética descrito na WO 96/06926; e *E. coli* H-9068 (Patente Japonesa Aberta ao Público nº 8-70879).

A bactéria usada para a presente invenção pode ser melhorada pela intensificação da expressão de um ou mais genes envolvidos na

biossíntese da L-leucina. Exemplos preferidos de tais genes incluem os genes do óperon *leuABCD*, do qual um exemplo típico é um gene *leuA* mutante codificando para a malato de isopropila sintase dessensibilizada para a inibição da realimentação pela L-leucina (Patente U.S. nº 6.403.342). Além disso, a bactéria usada para a presente invenção pode ser melhorada pelo aumento da expressão de um ou mais genes codificando para proteínas que excretam L-aminoácidos das células bacterianas. Exemplos de tais genes incluem os genes *b2682* e *b2683* genes (genes *ygaZH*) (EP 1239041 A2).

BACTÉRIAS PRODUTORAS DA L-HISTIDINA

Exemplos de bactérias produtoras da L-histidina e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar tais bactérias incluem, sem limitar, as cepas pertencentes ao gênero *Escherichia*, tais como a cepa de *E. coli* 24 (VKPM B-5945, RU 2003677); a cepa de *E. coli* 80 (VKPM B-7270, RU 2119536); *E. coli* NRRL B-12116 a B12121 (Patente U.S. nº 4.388.405); *E. coli* H-9342 (FERM BP-6675) e H-9343 (FERM BP-6676) (Patente U.S. nº 6.344.347); *E. coli* H-9341 (FERM BP-6674) (EP 1085087); e *E. coli* AI80/pFM201 (Patente U.S. nº 6.258.554).

Exemplos de bactérias produtoras da L-histidina e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar tais bactérias, também incluem as cepas em que a expressão de um ou mais genes codificando uma enzima biossintética de L-histidina é aumentada. Exemplos de tais genes incluem o gene da ATP fosforibosila transferase (*hisG*), o gene da fosforibosila AMP cicloidrolase (*hisI*), o gene da fosforibosila-ATP pirofosfoidrolase (*hisI*), o gene da fosforibosilformimino-5-aminoimidazol carboxamida ribotídeo isomerase (*hisA*), o gene da amidotransferase (*hisH*), o gene da histidinol fosfato aminotransferase (*hisC*), o gene de histidinol fosfatase (*hisB*), o gene da histidinol desidrogenase (*hisD*), e assim por diante.

É conhecido o fato de que as enzimas biossintéticas da L-histidina codificadas por *hisG* e *hisBHAFI* são inibidas pela L-histidina e,

portanto, a capacidade de produção da L-histidina pode também ser eficientemente intensificada pela introdução de uma mutação que confira resistência à inibição da realimentação dentro do gene da ATP fosforibosil transferase (*hisG*) (Patentes Russas nºs 2003677 e 2119536).

Exemplos específicos de cepas que têm a capacidade de produzir L-histidina incluem *E. coli* FERM-P 5038 e 5048, que são introduzidas com um vetor carregando um DNA codificando uma enzima biossintética de L-histidina (Patente Japonesa Aberta ao Público nº 56-005099), cepas de *E. coli* introduzidas com um gene para exportação de aminoácidos (EP 1016710 A), cepa de *E. coli* 80 conferida com resistência à sulfaguanidina, DL-1,2,4-triazol-3-alanina, e estreptomicina (VKPM B-7270, Patente Russa nº 2119536), e assim por diante.

BACTÉRIAS PRODUTORAS DO ÁCIDO L-GLUTÂMICO

Exemplos de bactérias produtoras do ácido L-glutâmico e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar tais bactérias incluem, porém sem limitar, as cepas pertencentes ao gênero *Escherichia*, tais como *E. coli* VL334thrC⁺ (EP 1172433). *E. coli* VL334 (VKPM B-1641) é uma cepa auxotrófica de L-isoleucina e L-treonina tendo mutações nos genes *thrC* e *ilvA* (Patente U.S. nº 4.278.765). Um alelo do tipo selvagem do gene *thrC* foi transferido pelo método de transdução geral com o uso de um bacteriófago P1 crescido nas células da cepa de *E. coli* K12 do tipo selvagem (VKPM B-7). Como um resultado, uma cepa VL334thrC⁺ (VKPM B-8961) produtora de ácido L-glutâmico auxotrófico de L-isoleucina foi obtida.

Exemplos de bactérias produtoras do ácido L-glutâmico e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar tais bactérias, incluem, porém sem limitar, as cepas em que a expressão de um ou mais genes codificando uma enzima biossintética de ácido L-glutâmico é aumentada. Exemplos de tais genes incluem genes codificando a glutamato desidrogenase (*gdhA*), a glutamina sintetase (*glnA*), a glutamato sintetase (*gltAB*), a

isocitrato desidrogenase (*icdA*), aconitato hidratase (*acnA*, *acnB*), citrato sintase (*gltA*), fosfoenolpiruvato carboxilase (*ppc*), piruvato desidrogenase (*aceEF*, *lpdA*), piruvato quinase (*pykA*, *pykF*), fosfoenolpiruvato sintase (*ppsA*), enolase (*eno*), fosfogliceromutase (*pgmA*, *pgmI*), fosfoglicerato quinase (*pgk*), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gapA*), triosefosfato isomerase (*tpiA*), frutose bisfosfato aldolase (*fbp*), fosfofrutoquinase (*pfkA*, *pfkB*), fosfato de glicose isomerase (*pgi*), e assim por diante.

Exemplos de cepas modificadas para aumentar a expressão do gene da citrato sintetase, do gene da fosfoenolpiruvato carboxilase, e/ou do gene da glutamato desidrogenase, incluem aquelas apresentadas nas EP 1078989 A, EP 955368 A e EP 952221 A.

Exemplos de bactérias produtoras do ácido L-glutâmico e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar tais bactérias também incluem cepas tendo atividade reduzida ou eliminada de uma enzima que catalise a síntese de um composto outro que não o ácido L-glutâmico mediante ramificação de uma via da biossíntese do ácido L-glutâmico. Exemplos de tais enzimas incluem a isocitrato liase (*aceA*), α -cetoglutarato desidrogenase (*sucA*), fosfotransacetilase (*pta*), acetato quinase (*ack*), ácido acetoidróxi sintase (*ilvG*), acetolactato sintase (*ilvI*), formiato acetiltransferase (*pfl*), lactato desidrogenase (*ldh*), glutamato descarboxilase (*gadAB*), e assim por diante. Bactérias pertencentes ao gênero *Escherichia* deficiente da atividade de α -cetoglutarato desidrogenase ou tendo atividade reduzida da α -cetoglutarato, e métodos para obtê-las, são descritos nas Patentes U.S. n^{os} 5.378.616 e 5.573.945.

Exemplos específicos de tais cepas incluem as seguintes:

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

E. coli AJ12624 (FERM BP-3853)

E. coli AJ12628 (FERM BP-3854)

E. coli AJ12949 (FERM BP-4881)

A *E. coli* W3110sucA::Km^r é uma cepa obtida pelo rompimento do gene da α -cetoglutarato desidrogenase (daqui por diante também referido como “gene *sucA*”) de *E. coli* W3110. Esta cepa é completamente deficiente em α -cetoglutarato desidrogenase.

Outros exemplos de bactérias produtoras do ácido L-glutâmico incluem aquelas que pertencem ao gênero *Escherichia* e têm resistência a um antimetabólito de ácido aspártico. Estas cepas podem também ser deficientes em α -cetoglutarato desidrogenase, e exemplos incluem, por exemplo, *E. coli* AJ13199 (FERM BP-5807) (Patente U.S. nº 5.908.768), FFRM P-12379) que adicionalmente tem uma capacidade de decomposição do ácido L-glutâmico reduzida (Patente U.S. nº 5.393.671); AJ13138 (FERM BP-5565) (Patente U.S. nº 6.110.714), e assim por diante.

Exemplos de bactérias produtoras do ácido L-glutâmico incluem as cepas mutantes pertencentes ao gênero *Pantoea*, as quais são deficientes na atividade da α -cetoglutarato desidrogenase ou têm uma atividade reduzida da α -cetoglutarato desidrogenase, e elas podem ser obtidas como descrito acima. Tais cepas incluem a *Pantoea ananatis* AJ13356 (Patente U.S. nº 6.331.419). A *Pantoea ananatis* AJ13356 foi depositada no National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology (presentemente National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary, Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japão) em 19 de fevereiro de 1998 sob um número de acesso de FERM P-16645. Foi depois transformado em um depósito internacional sob as disposições do Tratado de Budapeste em 11 de janeiro de 1999 e lhe foi atribuído um número de acesso de FERM BP-6616. *Pantoea ananatis* AJ13356 é deficiente na atividade da α -cetoglutarato desidrogenase como um resultado do rompimento do gene da subunidade α KGDH-E1 (*sucA*). Esta cepa foi identificada como *Enterobacter agglomerans* quando ela foi isolada e

depositada como a *Enterobacter agglomerans* AJ13356. Entretanto, ela foi recentemente reclassificada como *Pantoea ananatis* com base na sequenciação de nucleotídeos de 16S rRNA e assim por diante. Embora a AJ13356 tenha sido depositada no depósito acima mencionado como

5 *Enterobacter agglomerans*, ela é descrita como *Pantoea ananatis* neste relatório descritivo.

BACTÉRIAS PRODUTORAS DA L-FENILALANINA

Exemplos de bactérias produtoras da L-fenilalanina e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar tais bactérias, incluem, porém

10 sem limitar, cepas pertencentes ao gênero *Escherichia*, tais como *E. coli* AJ12739 (tyrA::Tn10, tyrR) (VKPM B-8197); *E. coli* HW1089 (ATCC 55371) abrigando o gene mutante *pheA34* (Patente U.S. nº 5.354.672); *E. coli* MWEC101-b (KR 8903681); *E. coli* NRRL B-12141, NRRL B-12145, NRRL B-12146 e NRRL B-12147 (Patente U.S. nº 4.407.952). Como cepas

15 precursoras, *E. coli* K-12 [W3110 (tyrA)/pPHAB] (FERM BP-3566), *E. coli* K-12 [W3110 (tyrA)/pPHAD] (FERM BP-12659), *E. coli* K-12 [W3110 (tyrA)/pPHATerm] (FERM BP-12662) e *E. coli* K-12 [W3110 (tyrA)/pBR-aroG4, pACMAB] denominada AJ12604 (FERM BP-3579) podem também ser usadas (EP 488424 B1). Além disso, as bactérias produtoras da L-

20 fenilalanina pertencentes ao gênero *Escherichia* com uma atividade intensificada da proteína codificada pelo gene *yedA* ou o gene *yddG* podem também ser usadas (Pedidos de Patente U.S. Publicados 2003/0148473 A1 e 2003/0157667 A1).

BACTÉRIAS PRODUTORAS DO L-TRIPTOFANO

25 Exemplos de bactérias produtoras do triptofano e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar tais bactérias, incluem, porém se limitar, as cepas pertencentes ao gênero *Escherichia*, tais como *E. coli* JP4735/pMU3028 (DSM10122) e JP6015/pMU91 (DSM10123) que são deficientes na triptofanil-tRNA sintetase codificada pelo gene mutante *trpS*

(Patente U.S. nº 5.756.345); *E. coli* SV164 (pGH5) tendo um alelo de *serA* codificando a fosfoglicerato desidrogenase livre da inibição da realimentação pela serina e um alelo de *trpE* codificando a antranilato sintase livre da inibição de realimentação pelo triptofano (Patente U.S. nº 6.180.373); *E. coli* AGX17 (pGX44) (NRRL B-12263) e AGX6 (pGX50)aroP (NRRL B-12264) deficiente na triptofanase (Patente U.S. nº 4.371.614); e *E. coli* AGX17/pGX50, pACKG4-pps em que a capacidade de produzir fosfoenolpiruvato é intensificada (WO 97/08333, Patente U.S. nº 6.319.696). As bactérias produtoras de L-triptofano pertencentes ao gênero *Escherichia* com uma atividade intensificada da proteína codificada pelo gene *yedA* ou o gene *yddG* podem também ser usadas (Pedidos Publicados das Patentes U.S. nºs 2003/0148473 A1 e 2003/0157667 A1).

Exemplos de bactérias produtoras do L-triptofano e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar tais bactérias também incluem as cepas em que uma ou mais atividades das enzimas selecionadas da antranilato sintase (*trpE*), da fosfoglicerato desidrogenase (*serA*), e da triptofano sintase (*trpAB*) são aumentadas. A antranilato sintase e a fosfoglicerato desidrogenase sofrem, ambas, da inibição da realimentação pelo L-triptofano e a L-serina, e portanto uma mutação dessensibilizando-as à inibição da realimentação pode ser introduzida nestas enzimas. Exemplos específicos das cepas tendo uma tal mutação incluem *E. coli* SV164 que abriga a antranilato sintase dessensibilizada e uma cepa transformadora obtida pela introdução do plasmídeo pGH5 (WO 94/08031), que contém um gene *serA* mutante codificando a fosfoglicerato desidrogenase dessensibilizada da inibição da realimentação, no *E. coli* SV164.

Exemplos de bactérias produtoras do L-triptofano e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar tais bactérias também incluem as cepas dentro das quais o óperon de triptofano contendo um gene codificando a antranilato sintase dessensibilizada pela inibição é introduzido

Patentes Japonesas Abertas ao Público n^{os} 57-71397 e 62-244382, Patente U.S. n^o 4.371.614). Além disso, a capacidade de produzir L-triptofano pode ser comunicada pelo aumento da expressão de um gene que codifique a triptofano sintase no óperon do triptofano (*trpBA*). A triptofano sintase consiste das subunidades α e β que são codificadas pelos genes *trpA* e *trpB*, respectivamente. Além disso, a capacidade de produzir L-triptofano também pode ser melhorada pelo aumento da expressão do óperon da isocitrato liase-malato sintase (WO 2005/103275).

BACTÉRIAS PRODUTORAS DA L-PROLINA

Exemplos de bactérias produtoras da L-prolina e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar tais bactérias incluem, porém seu limitar, as cepas pertencentes ao gênero *Escherichia*, tais como a *E. coli* 702ilvA (VKPM B-8012), a qual é deficiente no gene *ilvA* e é capaz de produzir a L-prolina (EP 1172433).

A bactéria usada para a presente invenção pode ser melhorada pelo aumento da expressão de um ou mais genes envolvidos na biossíntese da L-prolina. Exemplos preferidos de tais genes incluem o gene *proB* codificando para a glutamato quinase dessensibilizada para a inibição da realimentação pela L-prolina (DE 3127361). Além disso, a bactéria usada para a presente invenção pode ser melhorada pelo aumento da expressão de um ou mais genes codificando para as proteínas que excretam o L-aminoácido das células bacterianas. Exemplos de tais genes incluem os genes *b2682* e *b2683* (genes *ygaZH*) (EP 1239041 A2).

Exemplos de bactérias pertencentes ao gênero *Escherichia* e tendo a capacidade de produzir L-prolina, incluem as seguintes cepas de *E. coli*: NRRL B-12403 e NRRL B-12404 (Patente Britânica n^o 2075056), VKPM B-8012 (Pedido de Patente Russa n^o 2000124295), os mutantes de plasmídeos descritos na Patente Alemã n^o 3127361, mutantes de plasmídeos descritos por Bloom, F. R. *et al.* (15^o simpósio de inverno de Miami, 1983, p.

34), e assim por diante.

BACTÉRIAS PRODUTORAS DA L-ARGININA

Exemplos de bactérias produtoras da L-arginina e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar tais bactérias, incluem, porém sem limitar, cepas pertencentes ao gênero *Escherichia*, tais como a cepa de *E. coli* 237 (VKPM B-7925) (Pedido de Patente U.S. Publicado 2002/058315 A1) e suas cepas derivadas abrigando a N-acetilglutamato sintase mutante (Pedido de Patente Russa nº 2001112869), a cepa de *E. coli* 382 (VKPM B-7926) (EP 1170358 A1), e uma cepa produtora da arginina na qual o gene *argA* codificando a N-acetilglutamato sintetase é introduzido (EP 1170361 A1).

Exemplos de bactérias produtoras da L-arginina e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar tais bactérias também incluem cepas em que a expressão de um ou mais genes codificando uma enzima biossintética da L-arginina é aumentada. Exemplos de tais genes incluem o gene da fosfato de N-acetilglutamato redutase (*argC*), o gene da ornitina acetil transferase (*argJ*), o gene da N-acetilglutamato quinase (*argB*), o gene da acetilornitina transaminase (*argD*), o gene da ornitina carbamoila transferase (*argF*), o gene da ácido argininossuccínico sintetase (*argG*), o gene da ácido argininossuccínico liase (*argH*), e o gene da fosfato de carbamoila sintetase (*carAB*).

BACTÉRIAS PRODUTORAS DA L-VALINA

Exemplo das bactérias produtoras da L-valina e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar tais bactérias incluem, porém sem limitar, as cepas que tenham sido modificadas para superexpressar o óperon *ilvGMEDA* (Patente U.S. nº 5.998.178). É desejável remover a região do óperon *ilvGMEDA* que é necessário para a atenuação de modo que a expressão do óperon não seja atenuada pela L-valina produzida. Além disso, o gene *ilvA* no operon é preferivelmente rompido de modo que a atividade da

treonina desaminase seja reduzida.

Exemplos de bactérias produtoras da L-valina e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar tais bactérias também incluem mutantes tendo uma mutação de t-RNA de amino-acila sintetase (Patente U.S. nº 5.658.766). Por exemplo, *E. coli* VL1970, que tem uma mutação no gene *ileS* codificando a tRNA de isoleucina sintetase, pode ser usado. *E. coli* VL1970 foi depositado na Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (1 Dorozhny Proezd, 1 Moscow 117545, Rússia) em 24 de junho de 1988 sob o número de acesso de VKPM B-4411.

Além disso, os mutantes que requeiram ácido lipóico para o crescimento e/ou que careçam de H^+ -ATPase (WO 96/06926) também podem ser usados como as cepas precursoras.

BACTÉRIAS PRODUTORAS DA L-ISOLEUCINA

Exemplos de bactérias produtoras da L-isoleucina e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar tais bactérias, incluem, porém sem limitar, mutantes tendo resistência à dimetilaminopurina (Patente Japonesa Aberta ao Público nº 5-304969 A), mutantes tendo resistência a um análogo da isoleucina tal como a tiaisoleucina e o hidroxamato de isoleucina, e tais mutantes ainda têm resistência à DL-etionina e/ou à hidroxamato de arginina (Patente Japonesa Aberta ao Público nº 5-130882). Além disso, as cepas recombinantes transformadas com os genes codificando proteínas envolvidas na biossíntese da L-isoleucina, tais como a treonina desaminase e a acetoidroxato sintase, podem também usadas como cepas precursoras (Patente Japonesa Aberta ao Público nº 2-458, FR 0356739, e Patente U.S. nº 5.998.178).

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

CONSTRUÇÃO DA BACTÉRIA PRODUTORA DA L-LISINA COM ATIVIDADES DA FRUTOSE-6-FOSFATO ALDOLASE,

GLICEROL DESIDROGENASE E DIIDROXIACETONA QUINASE

<1-1> CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO PARA EXPRESSÃO DO GENE *dak1*

A sequência de nucleotídeos totais do cromossoma de *Saccharomyces cerevisiae* já foi determinada [Science, 25 (1996)]. Com base na sequência de nucleotídeos do gene *dak1* relatado nesta literatura, o oligonucleotídeo sintético de SEQ ID NO: 14 foi preparado como um iniciador de 5', e o oligonucleotídeo sintético de SEQ ID NO: 15 foi preparado como um iniciador de 3'. A PCR foi realizada pelo uso destes oligonucleotídeos sintéticos e o DNA cromossômico da cepa de *Saccharomyces cerevisiae* JCM7255 como um padrão. O produto da PCR foi purificado e ligado com o vetor pMW119 (Takara Bio) digerido com *HindIII* e *SalI* para construir um plasmídeo de expressão *dak1* pMW-dak1. A cepa JCM7255 é uma cepa armazenada na agência administrativa independente, RIKEN, "Japan Collection of Microorganisms", 2-1, Hirosawa, Wako-shi, Saitama-ken.

<1-2> CONSTRUÇÃO DA CEPA MELHORADA NA ATIVIDADE DA GLICEROL DESIDROGENASE

Uma cepa WC196 Δ cadA Δ ldcC modificada para ter a estrutura mostrada a SEQ ID NO: 11 foi construída. Para a construção da cepa tendo esta estrutura, a sequência de SEQ ID NO: 9 (produto da PCR) foi usada. Na sequência de SEQ ID NO: 9, a sequência dos nucleotídeos números 1 a 172 é a sequência *attR* de um fago λ , a sequência dos nucleotídeos 324 a 983 é um gene de resistência ao cloranfenicol (*cat*), a sequência dos nucleotídeos números 1540 a 1653 é a sequência *attL* de um fago λ , e a sequência dos nucleotídeos números 1654 a 1733 é o promotor *tacM*.

O promotor *tacM* (SEQ ID NO: 10) pode ser construído pela substituição da sequência TTGACA do promotor *tac* [Gene, 25 (2-3), 167-178 (1983)] na região -35 pela TTCACA. A sequência da SEQ ID NO: 9 pode ser

construída mediante referência à construção de pMW118-attL-Cm-attR (WO 2005/010175).

A sequência de SEQ ID NO: 9, como um padrão, foi amplificada por PCR com o uso dos iniciadores das SEQ ID NOS: 12 e 13, e este produto da amplificação foi introduzido no cromossoma da cepa WC196 Δ cadA Δ ldcC (referir-se à Publicação Internacional WO 2006/038695) pelo método λ -RED (WO 2005/010175) para construir uma cepa na qual a sequência promotora a montante de *gldA* tenha sido substituída. Deste modo, uma cepa com atividade de glicerol desidrogenase melhorada, a cepa WC196 Δ cadA Δ ldcC*P*tacM*gldA*::Cm, foi obtida.

<1-3> CONSTRUÇÃO DA BACTÉRIA PRODUTORA DA L-LISINA COM ATIVIDADES INTENSIFICADAS DA FRUTOSE-6-FOSFATO ALDOLASE E DA GLICEROL DESIDROGENASE

Uma cepa WC196 Δ cadA Δ ldcC modificada para ter a estrutura mostrada na SEQ ID NO: 92 foi construída. Para a construção da cepa tendo esta estrutura, a sequência de SEQ ID NO:9 (produto da PCR) foi usada. Na sequência de SEQ ID NO: 9, a sequência dos nucleotídeos números 1 a 172 é a sequência *attR* do fago λ , a sequência dos nucleotídeos números 324 a 983 é um gene de resistência ao cloranfenicol (*cat*), a sequência dos nucleotídeos números 1540 a 1653 é a sequência *attL* de fago λ , e a sequência dos nucleotídeos 1654 a 1733 é o promotor *tacM*.

O promotor *tacM* (SEQ ID NO: 10) pode ser construído pela substituição da sequência TTGACA do promotor *tac* [*Gene*, 25 (2-3), 167-178 (1983)] na região -35 por TTCACA. A sequência da SEQ ID NO: 9 pode ser construída mediante referência à construção de pMW118-attL-Cm-attR (WO 2005/010175).

A sequência da SEQ ID NO: 9 como um padrão foi amplificada por PCR com o uso dos iniciadores das SEQ ID NOS: 93 e 94, e este produto da amplificação foi introduzido no cromossoma da cepa

WC196 Δ cadA Δ ldcC (referência à Publicação Internacional WO 2006/038695) pelo método λ -RED (WO 2005/010175) para construir uma cepa em que a sequência promotora a montante do óperon *fsaB-gldA* tenha sido substituída. Desta maneira, uma cepa com atividades melhoradas da frutose-6-fosfato aldolase e glicerol desidrogenase, cepa WC196 Δ cadA Δ ldcCptacM *fsaB-gldA::Cm*, foi obtida.

<1-4> CONSTRUÇÃO DAS BACTÉRIAS PRODUTORAS DA L-LISINA COM ATIVIDADES DAS FRUTOSE-6-FOSFATO ALDOLASE, GLICEROL DESIDROGENASE E DIIDROXIACETONA QUINASE INTENSIFICADAS

A cepa WC196 Δ cadA Δ ldcC (referência à Publicação Internacional WO 2006/038695), a cepa WC196 Δ cadA Δ ldcCptacMgldA::Cm e a cepa WC196 Δ cadA Δ ldcCptacM *fsaB-gldA::Cm* foram transformadas com o plasmídeo pCABD2 para a produção de Lys carregando os genes *dapA*, *dapB* e *lysC* (Publicação Internacional WO 01/53459) de uma maneira convencional para se obter a cepa WC196 Δ cadA Δ ldcC/pCABD2, a cepa WC196 Δ cadA Δ ldcCptacMgldA::Cm/pCABD2 e a cepa WC196 Δ cadA Δ ldcCptacM *fsaB-gldA::Cm*/pCABD2. Além disso, a cepa WC196 Δ cadA Δ ldcC/pCABD2, a cepa WC196 Δ cadA Δ ldcCptacMgldA::Cm/pCABD2 e a cepa WC196 Δ cadA Δ ldcCptacM *fsaB-gldA::Cm*/pCABD2 foram transformadas com o plasmídeo de expressão *dak1* pMW-dak1 de uma maneira convencional para se obter a cepa WC196 Δ cadA Δ ldcC/pCABD2,pMW-dak1, a cepa WC196 Δ cadA Δ ldcCptacMgldA::Cm/pCABD2,pMW-dak1 e a cepa WC196 Δ cadA Δ ldcCptacM *fsaB-gldA::Cm*/pCABD2,pMW-dak1.

Estas cepas foram cultivadas, cada uma, em meio L contendo 20 mg/litro de estreptomicina ou 20 mg/litro de estreptomicina com 50 mg/litro de ampicilina em 37 °C até a OD600 final tornar-se de cerca de 0,6, depois uma solução de glicerol a 40 % em um volume igual ao meio de

cultura foi acrescentada a cada meio de cultura, e a mistura foi agitada, depois dividida em volumes apropriados, e armazenada em -80°C . Estes são denominados de estoques de glicerol.

EXEMPLO 2

5 AVALIAÇÃO DAS BACTÉRIAS PRODUTORAS DA L-LISINA COM ATIVIDADES INTENSIFICADAS DA FRUTOSE-6-FOSFATO ALDOLASE, DA GLICEROL DESIDROGENASE E DA DIIDROXIACETONA QUINASE

Os estoques de glicerol acima mencionados das cepas foram
 10 descongelados, 100 μl de cada estoque foram uniformemente aplicados a uma placa L contendo 20 mg/litro de estreptomicina ou 20 mg/litro de estreptomicina e 50 mg/litro de ampicilina, e a cultura foi realizada em 37°C por 24 horas. As células obtidas sobre a placa foram colocadas em suspensão em 1 ml de solução salina fisiológica, a suspensão foi inoculada em um
 15 volume V obtido pela divisão de uma constante de 50 com absorbância em 600 nm (n) da suspensão diluída 101 vezes ($V = 50/n$) em 20 ml de um meio de fermentação contendo 20 mg/litro de estreptomicina ou 20 mg/litro de estreptomicina e 50 mg/litro de ampicilina contidas em um frasco de Sakaguchi de 500 ml, e a cultura foi realizada em 37°C por 48 horas em uma
 20 máquina de cultura de agitação recíproca. Após a cultura, a quantidade de lisina acumulada no meio foi medida por um método conhecido (*Biotec Analyzer AS210*, SAKURA SEIKI).

A composição do meio de fermentação é apresentada abaixo (unidade: g/litro).

25	Glicerol	40
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	24
	K_2HPO_4	1,0
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,01

MnSO ₄ ·5H ₂ O	0,01
Extrato de levedura	2,0

Para um volume final 1 litro

O meio foi ajustado em pH 7,0 com KOH, e autoclavado em 115 °C por 10 minutos, contanto que o glicerol e o MgSO₄·7H₂O fossem separadamente esterilizados, e 30 g/litro de CaCO₃ da Farmacopéia Japonesa submetidos a esterilização em ar quente em 180 °C por 2 horas, foram adicionados.

Como antibióticos, 20 mg/litro de estreptomicina ou 20 mg/litro de estreptomicina e 50 mg/litro de ampicilina, foram adicionados. A cultura foi realizada sob as condições de uma temperatura de 37 °C e agitação em 115 rpm por 48 horas.

Os resultados são mostrados na Tabela 5 (OD significa a absorbância em 600 nm representando a quantidade de células, Lys (g/litro) significa a quantidade de L-lisina acumulada o frasco, e rendimento (%) significa o rendimento de L-lisina com base no substrato). Considerando a cepa em que apenas glicerol desidrogenase foi intensificada, a cepa em que apenas a diidroxiacetona quinase foi intensificada, e a cepa em que a frutose-6-fosfato aldolase e glicerol desidrogenase foram intensificadas não mudaram de rendimento e de produtividade em comparação com a cepa não modificada, a cepa WC196ΔcadAΔldcCPtacMgldA::Cm/pCABD2,pMW-dak1 em que tanto a glicerol desidrogenase quanto a diidroxiacetona quinase usando ATP como um doador de fosfato foram intensificadas, acumularam uma maior quantidade de L-lisina em comparação com as outras cepas. Além disso, a cepa WC196ΔcadAΔldcCPtacM fsaB-gldA::Cm/pCABD2,pMW-dak1 na qual a frutose-6-fosfato aldolase, a glicerol desidrogenase e a diidroxiacetona quinase usando ATP como um doador de fosfato foram intensificadas, acumularam uma quantidade ainda maior de L-lisina.

TABELA 5

Tabela 5: Acúmulo De L-Lisina das cepas com atividades de frutose-6-fosfato aldolase (*fsaB*), de glicerol desidrogenase (*gldA*) e de diidroxiacetona quinase (*dak1*)

			OD	Lys (g/l)	Rendimento (%)
WC196LC	pCABD2	-	16,7	14,7	36,8
WC196LC	pCABD2	pMW-dak1	14,3	14,8	36,9
WC196LCPtacMgldA	pCABD2	-	18,1	14,7	36,8
WC196LCPtacMfsaB-gldA	pCABD2	-	18,5	14,3	35,8
WC196LCPtacMgldA	pCABD2	pMW-dak1	15,3	15,3	38,1
WC196LCPtacMfsaB-gldA	pCABD2	pMW-dak1	14,0	16,9	42,1

5 Nos nomes das cepas mencionados na Tabela, “LC” é uma abreviatura de “ Δ cadA Δ ldcC”, e “::Cm” é omitido.

EXEMPLO 3

CONSTRUÇÃO DAS BACTÉRIAS PRODUTORAS DA L-TREONINA COM ATIVIDADES DA GLICEROL DESIDROGENASE E
10 DA DIIDROXIACETONA QUINASE INTENSIFICADAS

<3-1> CONSTRUÇÃO DA CEPA MELHORADA DE ATIVIDADE DA GLICEROL DESIDROGENASE

Cepas B5318, modificadas para ter as estruturas apresentadas nas SEQ ID NOS: 90 e 91, foram construídas. Para a construção das cepas
15 tendo estas estruturas, as sequências de SEQ ID NOS: 88 e 89 (produtos da PCR) foram usadas. Nas sequências de SEQ ID NOS: 88 e 89, as sequências dos nucleotídeos números 1 a 72 são as sequências *attR* de fago λ , as sequências dos nucleotídeos números 324 a 983 são os genes de resistência ao cloranfenicol (*cat*), as sequências de nucleotídeos números 1540 a 1653 são as
20 sequências *attL* de fago λ , e as sequências dos nucleotídeos números 1654 a 1733 são os promotores tacM2 e tacM3.

Os promotores tacM2 e tacM3 são promotores constitutivos que podem ser construídos pela substituição da sequência TTGACA do promotor tac [Gene, 25 (2-3), 167-178 (1983)] na região -35 com TGTACA e
25 TTGGCA [Molecular Biology 39 (5) 719-726 (2005)]. As sequências de SEQ

ID NOS: 88 e 89 podem ser construídas com referência à construção de pMW118-attL-Cm-attR (WO 2005/010175).

As sequências de SEQ ID NOS: 88 e 89 como padrões foram amplificadas por PCR com o uso dos iniciadores das SEQ ID NOS: 12 e 13, e estes produtos da amplificação foram, cada qual, introduzidos no cromossoma da cepa B5318 (VKPM B-5318) pelo método λ -RED (WO 2005/010175) para se obter cepas em que a sequência promotora a montante do tenha sido substituída. Desta maneira, as cepas com atividade melhorada da glicerol desidrogenase, a cepa B5318PtacM2gldA::Cm e a B5318PtacM3gldA::Cm, foram obtidas.

<1-3> CONSTRUÇÃO DAS BACTÉRIAS PRODUTORAS DA L-TREONINA COM ATIVIDADES INTENSIFICADAS AS GLICEROL DESIDROGENASE E DA DIIDROXIACETONA QUINASE

A cepa B5318PtacM2gldA::Cm e a cepa B5318PtacM3gldA::Cm foram transformadas com o plasmídeo de expressão *dak1* pMW-dak1 de uma maneira convencional para se obter a cepa B5318PtacM2gldA::Cm/pMW-dak1 e a cepa B5318PtacM3gldA::Cm/pMW-dak1.

Estas cepas foram, cada qual, cultivadas em meio L contendo 20 mg/litro de estreptomicina ou 20 mg/litro de estreptomicina com 500 mg/litro de ampicilina em 37 °C até a OD600 final tornar-se de cerca de 0,6, depois uma solução de glicerol a 40 % em um volume igual ao meio de cultura foi acrescentada a cada meio de cultura, e a mistura foi agitada, depois dividida em volumes apropriados, e armazenada em -80 °C. Estes são denominados de estoques de glicerol.

EXEMPLO 4

AVALIAÇÃO DAS BACTÉRIAS PRODUTORAS DA L-TREONINA COM ATIVIDADES INTENSIFICADAS DA GLICEROL DESIDROGENASE E DA DIIDROXIACETONA QUINASE

Os estoques de glicerol acima mencionados das cepas foram descongelados, 100 µl de cada estoque foram uniformemente aplicados a uma placa L contendo 20 mg/litro de estreptomicina ou 20 mg/litro de estreptomicina com 50 mg/litro de ampicilina, e a cultura foi realizada em 37 °C por 24 horas. As células obtidas sobre a placa foram colocadas em suspensão em 1 ml de solução salina fisiológica, a suspensão foi inoculada em um volume (V) obtido pela divisão de uma constante 50 com absorbância em 600 nm (n) da suspensão diluída 101 vezes ($V = 50/n$) em 20 ml de um meio de fermentação contendo 20 mg/litro de estreptomicina ou 20 mg/litro de estreptomicina com 50 mg/litro de ampicilina contida e um frasco cônico de 500 ml com abafador, e a cultura foi realizada em 40 °C por 24 horas em uma máquina de cultura rotativa. Após a cultura, a quantidade de treonina acumulada no meio foi medida por um método conhecido (Coluna ODS-2 de Cromatografia Líquida Hitachi).

A composição do meio de fermentação é apresentada abaixo (unidade: g/litro).

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

Para o volume final de 1 litro

O meio foi ajustado a pH 7,0 com KOH, e autoclavado em 115 °C por 10 minutos, contanto que o glicerol e o MgSO₄·7H₂O fossem separadamente esterilizados, e 30 g/litro de CaCO₃ da Farmacopéia Japonesa submetidos a esterilização de ar quente em 180 °C por 2 horas foram adicionados.

Como antibióticos, 20 mg/litro de estreptomicina ou 20 mg/litro de estreptomicina e 50 mg/litro de ampicilina foram adicionados. A cultura foi realizada sob as condições de uma temperatura de 40 °C e agitação em 144 rpm por 24 horas.

Os resultados são apresentados na Tabela 6 (OD significa a absorbância em 600 nm representando a quantidade de células, Thr (g/litro) significa a quantidade de L-treonina acumulada no frasco, e rendimento (%) significa o rendimento de L-treonina com base no substrato). Considerando a cepa em que apenas glicerol desidrogenase foi intensificada e não apresentou mudança de rendimento e produtividade em comparação com a cepa não modificada, a cepa B5318PtacM2gldA::Cm/pMW-dak1 e a cepa B5318PtacM3gldA::Cm/pMW-dak1 em que tanto a glicerol desidrogenase e a diidroxiacetona quinase usando ATP como um doador de fosfato foram intensificadas, acumularam uma quantidade mais elevada de L-treonina em comparação com as outras cepas.

TABELA 6

Tabela 6: Acúmulo de L-treonina das cepas com atividades de glicerol desidrogenase (*gldA*) e de diidroxiacetona quinase (*dak1*) intensificadas

			OD600	Thr (g/l)	Rendimento (%)
B5318	-	-	22,5	12,5	30,9
B5318	Ptac M2 gldA	-	21,5	11,9	29,4
B5318	Ptac M2 gldA	pMW-dak	21,1	13,2	32,6
B5318	Ptac M3 gldA	-	23,1	12,3	30,4
B5318	Ptac M3 gldA	pMW-dak	22,3	13,3	32,9

Nos nomes das cepas mencionadas na tabela, “pMW-dak1” é abreviado como “pMW-dak”, e “::Cm” é omitido.

EXPLANAÇÃO DA LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

SEQ ID NO: 1: Sequência de genes de *gldA* de *Escherichia coli* (1104 pares de base)

SEQ ID NO: 2: Sequência de aminoácidos GldA de *Escherichia coli* (367 AA)

SEQ ID NO: 3: sequência de genes *dakA1* de *Saccharomyces*

cerevisiae (1755 pares de base)

SEQ ID NO: 4: Sequência de aminoácidos de *Saccharomyces cerevisiae* (584 AA)

5 SEQ ID NO: 5: Sequência de genes *dhbK1* de *Agrobacterium tumefaciens* (1695 pares de base)

SEQ ID NO: 6: Sequência de aminoácido *dhbK1* de *Agrobacterium tumefaciens* (564 AA)

SEQ ID NO: 7: sequência de genes *dhaK* de *Citrobacter freundii* (1659 pares de base)

10 SEQ ID NO: 8: sequência de aminoácidos *dhaK* de *Citrobacter freundii* (552 AA)

SEQ ID NO: 9: sequência de espaçador attR-cat-attL-ptacM-SD (1740 pares de base)

SEQ ID NO: 10: promotor tacM (80 pares de base)

15 SEQ ID NO: 11: sequência PtacMgldA::Cm

SEQ ID NO: 12: iniciador atL-Ptac-gldA (iniciador de PCR para intensificar *gldA* no cromossoma)

SEQ ID NO: 13: atR-Ptac-fsaB1 (iniciador de PCR para intensificar *gldA* no cromossoma)

20 SEQ ID NO: 14: pMW-dak1F (iniciador para clonagem de *dakA*)

SEQ ID NO: 15: pMW-dak1R (iniciador para clonagem de *dakA*)

25 SEQ ID NO: 16: sequência de genes *glpF* de *Escherichia coli* (846 pares de base)

SEQ ID NO: 17: sequência de aminoácidos GlpF de *Escherichia coli* (281 AA)

SEQ ID NO: 18: sequência de genes *tpiA* de *Escherichia coli* (768 pares de base)

SEQ ID NO: 19: sequência de aminoácidos TpiA de *Escherichia coli* (255 AA)

SEQ ID NO: 20: sequência de genes *fbaA* de *Escherichia coli* (1080 pares de base)

5 SEQ ID NO: 21: sequência de aminoácidos FbaA de *Escherichia coli* (359 AA)

SEQ ID NO: 22: sequência de genes *glpX* *Escherichia coli* (1011 pares de base)

10 SEQ ID NO: 23: sequência de aminoácidos glpX de *Escherichia coli* (336 AA)

SEQ ID NO: 24: sequência de genes *glpK* de *Escherichia coli* (1509 pares de base)

SEQ ID NO: 25: sequência de aminoácidos de glpK *Escherichia coli* (502 AA)

15 SEQ ID NO: 26: sequência de genes *glpA* de *Escherichia coli* (1629 pares de base)

SEQ ID NO: 27 : sequência de aminoácidos *glpA* de *Escherichia coli* (542 AA)

20 SEQ ID NO: 28: sequência de genes *glpB* de *Escherichia coli* (1260 pares de base)

SEQ ID NO: 29: sequência de aminoácidos *glpB* de *Escherichia coli* (419 AA)

SEQ ID NO: 30: sequência de genes *glpC* de *Escherichia coli* (1191 pares de base)

25 SEQ ID NO: 31: sequência de aminoácidos *glpC* de *Escherichia coli* (396 AA)

SEQ ID NO: 32: sequência de genes *glpD* de *Escherichia coli* (1506 pares de base)

SEQ ID NO: 33: sequência de aminoácidos *glpD* de

Escherichia coli (501 AA)

SEQ ID NO: 34: sequência de genes *dhaK* de *Escherichia coli*
(1071 pares de base)

5 SEQ ID NO: 35: sequência de aminoácidos *dhaK* de
Escherichia coli (356 AA)

SEQ ID NO: 36: sequência de genes *dhaL* de *Escherichia coli*
(633 pares de base)

SEQ ID NO: 37: sequência de aminoácidos *dhaL* de
Escherichia coli (210 AA)

10 SEQ ID NO: 38: sequência de genes *dhaM* de *Escherichia coli*
(1419 pares de base)

SEQ ID NO: 39: sequência de aminoácidos de *Escherichia coli* (472 AA)

15 SEQ ID NO: 40: gene de diidroxiacetona quinase de
Schizosaccharomyces pombe (1776 pares de base)

SEQ ID NO: 41: Diidroxiacetona quinase de
Schizosaccharomyces pombe (591 AA)

SEQ ID NO: 42: gene de diidroxiacetona quinase de *Pichia angusta* (1830 pares de base)

20 SEQ ID NO: 43: Diidroxiacetona quinase de *Pichia angusta*
(609 AA)

SEQ ID NO: 44: gene de diidroxiacetona quinase de *Pichia pastoris* (1827 pares de base)

25 SEQ ID NO: 45: Diidroxiacetona quinase de *Pichia pastoris*
(608 AA)

SEQ ID NO: 46: Gene de diidroxiacetona quinase de
Debaryomyces hansenii (1824 pares de base)

SEQ ID NO: 47: Diidroxiacetona quinase de *Debaryomyces hansenii* (607 AA)

SEQ ID NO: 48: Gene de diidroxiacetona quinase de *Escherichia blattae* (1752 pares de base)

SEQ ID NO: 49: Diidroxiacetona quinase de *Escherichia blattae* (583 AA)

5 SEQ ID NO: 50: gene de diidroxiacetona quinase de *Enterobacter* sp. 638 (1647 pares de base)

SEQ ID NO: 51: Diidroxiacetona quinase de *Enterobacter* sp. 638 (548 AA)

10 SEQ ID NO: 52: Gene de diidroxiacetona quinase de *Psychromonas* sp. CNPT3 (1695 pares de base)

SEQ ID NO: 53: Diidroxiacetona quinase de *Psychromonas* sp. CNPT3 (564 AA)

SEQ ID NO: 54: Gene de diidroxiacetona quinase de *Stappia aggregata* (1647 pares de base)

15 SEQ ID NO: 55: Diidroxiacetona quinase de *Stappia aggregata* (548 AA)

SEQ ID NO: 56: gene de diidroxiacetona quinase de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (1641 pares de base)

20 SEQ ID NO: 57: Diidroxiacetona quinase de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 (546 AA)

SEQ ID NO: 58: Gene de diidroxiacetona quinase de *Myxococcus xanthus* DK 1622 (1701 pares de base)

SEQ ID NO: 59: Diidroxiacetona quinase de *Myxococcus xanthus* DK 1622 (566 AA)

25 SEQ ID NO: 60: Gene de diidroxiacetona quinase de *Burkholderia* sp. 383 (1701 pares de base)

SEQ ID NO: 61: Diidroxiacetona quinase de *Burkholderia* sp. 383 (566 AA)

SEQ ID NO: 62: Gene de diidroxiacetona quinase de

Burkholderia thailandensis E264 (1704 pares de base)

SEQ ID NO: 63: Diidroxiacetona quinase de *Burkholderia thailandensis* E264 (567 AA)

5 SEQ ID NO: 64: Gene de diidroxiacetona quinase de *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 (1851 pares de base)

SEQ ID NO: 65: Diidroxiacetona quinase de *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 (616 AA)

SEQ ID NO: 66: gene *dhaR* de *Escherichia coli* (1920 pares de base)

10 SEQ ID NO: 67: Sequência de aminoácidos DhaR de *Escherichia coli* (639 AA)

SEQ ID NO: 68: gene *fsaA* de *Escherichia coli* (663 pares de base)

15 SEQ ID NO: 69: sequência de aminoácidos *fsaA* de *Escherichia coli* (220 AA)

SEQ ID NO: 70: gene *fsaB* de *Escherichia coli* (663 pares de base)

SEQ ID NO: 71: Sequência de aminoácidos *fsaB* de *Escherichia coli* (220 AA)

20 SEQ ID NO: 72: Gene *fbaB* de *Escherichia coli* (1053 pares de base)

SEQ ID NO: 73 : Sequência de aminoácidos *fbaB* de *Escherichia coli* (350 AA)

25 SEQ ID NO: 74: gene *gldA* de *Shigella dysenteriae* Sd197 (1143 pares de base)

SEQ ID NO: 75: Sequência de aminoácidos *gldA* de *Shigella dysenteriae* Sd197 (380 AA)

SEQ ID NO: 76: Gene *gldA* de *Salmonella typhimurium* LT2 (1104 pares de base)

SEQ ID NO: 77: Sequência de aminoácidos *gldA* de *Salmonella typhimurium* LT2 (367 AA)

SEQ ID NO: 78: Gene *gldA* de *Pseudomonas putida* (1098 pares de base)

5 SEQ ID NO: 79: Sequência de aminoácidos *gldA* de *Pseudomonas putida* (365 AA)

SEQ ID NO: 80: Gene *gldA* de *Bacillus coagulans* 36D1 (1104 pares de base)

10 SEQ ID NO: 81: Sequência de aminoácidos *gldA* de *Bacillus coagulans* 36D1 (367 AA)

SEQ ID NO: 82: Gene *fbp* de *Escherichia coli* (999 pares de base)

SEQ ID NO: 83: Sequência de aminoácidos *fbp* de *Escherichia coli* (322 AA)

15 SEQ ID NO: 84: Gene *ybhA* de *Escherichia coli* (819 pares de base)

SEQ ID NO: 85: Sequência de aminoácidos *ybhA* de *Escherichia coli* (272 AA)

20 SEQ ID NO: 86: Gene *ptsI* de *Escherichia coli* (1782 pares de base)

SEQ ID NO: 87: Sequência de aminoácidos *ptsI* de *Escherichia coli* (575 AA)

SEQ ID NO: 88: Sequência de espaçador attR-cat-attL-PtacM2-SD

25 SEQ ID NO: 89: Sequência de espaçador attR-cat-attL-PtacM3-SD

SEQ ID NO: 90: Sequência PtacM2gldA::Cm

SEQ ID NO: 91: Sequência PtacM3gldA::Cm

SEQ ID NO: 92: Sequência PtacM fsaB-gldA::Cm

SEQ ID NO: 93: atL-Ptac-fsaB (Iniciador de PCR para intensificar *fsaB* + *gldA* no cromossoma)

SEQ ID NO: 94: atR-Ptac-fsaB (Iniciador de PCR para intensificar *fsaB* + *gldA* no cromossoma)

5

APLICABILIDADE INDUSTRIAL

Mediante o uso do microorganismo da presente invenção, a produção eficiente de um L-aminoácido de glicerol mediante fermentação é possível.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir L-lisina e/ou L-treonina, caracterizado pelo fato de que compreende:

5 cultivar um microrganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, tendo uma capacidade de produzir L-lisina e/ou L-treonina, e modificado para aumentar atividades de glicerol desidrogenase e da diidroxiacetona quinase em comparação com uma cepa selvagem ou cepa não modificada, em um meio contendo glicerol como uma fonte de carbono para produzir e acumular L-lisina e/ou L-treonina no meio ou nas células, e

10 coletar L-lisina e/ou L-treonina do meio ou das células, em que as atividades da glicerol desidrogenase e da diidroxiacetona quinase são aumentadas pelo aumento do número de cópias dos genes que codificam a glicerol desidrogenase e a diidroxiacetona quinase, ou modificação de um promotor dos genes por um promotor mais forte, e

15 em que o gene que codifica a glicerol desidrogenase é um DNA tendo a sequência nucleotídica da SEQ ID NO: 1, em que o gene que codifica a diidroxiacetona quinase é um DNA tendo a sequência nucleotídica da SEQ ID NO: 3, 5 ou 7, e em que a diidroxiacetona quinase usa ATP como um doador

20 de fosfato.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os números de cópias do gene que codifica a glicerol desidrogenase e a diidroxiacetona quinase são aumentados pela transformação do microrganismo com um vetor multicópias contendo os genes e/ou

25 introdução dos genes no cromossomo do microrganismo.

3. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o microrganismo é ainda modificado para aumentar a atividade do facilitador de glicerol em comparação com uma cepa selvagem ou cepa não modificada,

em que a atividade do facilitador de glicerol é aumentada pelo aumento do número de cópias do gene que codifica o facilitador de glicerol ou modificação de um promotor do gene por um promotor mais forte, e

em que o gene que codifica o facilitador de glicerol é um DNA tendo a sequência nucleotídica da SEQ ID NO: 16.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o microrganismo é ainda modificado para aumentar a atividade ou as atividades de uma enzima selecionada do grupo consistindo de triosefosfato isomerase, frutose bisfosfato aldolase, frutose-1,6-bisfosfatase e frutose-6-fosfato aldolase e combinação das mesmas em comparação com uma cepa selvagem ou cepa não modificada,

em que a atividade ou atividade da(s) enzima(s) são aumentadas pelo aumento do número de cópias de genes que codificam a(s) enzima(s) ou modificação de um promotor do(s) gene(s) por um promotor mais forte,

em que o gene que codifica a triosefosfato isomerase é um DNA tendo a sequência nucleotídica da SEQ ID NO: 18,

em que o gene que codifica a frutose bisfosfato aldolase é um DNA tendo a sequência nucleotídica da SEQ ID NO: 20 ou 72,

em que o gene que codifica a frutose-1,6-bisfosfatase é um DNA tendo a sequência nucleotídica da SEQ ID NO: 22, 82 ou 84, e

em que o gene que codifica a frutose-6-fosfato aldolase é um DNA tendo a sequência nucleotídica da SEQ ID NO: 68 ou 70.

5. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o microrganismo é ainda modificado para reduzir a atividade ou atividades da glicerol quinase e/ou da glicerol-3-fosfato desidrogenase do tipo de ligação à membrana em comparação com uma cepa selvagem ou cepa não modificada,

em que a atividade ou atividades da glicerol quinase e/ou da

glicerol-3-fosfato desidrogenase do tipo de ligação à membrana são reduzidas pela modificação de sequências de controle de expressão de um gene que codifica a enzima,

5 em que o gene que codifica a glicerol quinase é um DNA tendo a sequência nucleotídica da SEQ ID NO: 24, e

 em que o gene que codifica a glicerol-3-fosfato desidrogenase do tipo de ligação à membrana é um DNA tendo a sequência nucleotídica da SEQ ID NO: 26, 28, 30 ou 32.

10 6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o microrganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae* é uma bactéria de *Escherichia*, ou uma bactéria de *Pantoea*.