



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

(21) PI 0807598-0 A2



(22) Data de Depósito: 09/01/2008
(43) Data da Publicação: 22/07/2014
(RPI 2272)

(51) Int.Cl.:
C12P 13/04
C12P 19/28
C12P 19/30
C12P 19/38

(54) Título: MÉTODO PARA PRODUZIR UM L-AMINOÁCIDO OU EM ÁCIDO NUCLEÍCO

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 20/02/2007 JP 2007-039843

(73) Titular(es): Ajinomoto Co., Inc.

(72) Inventor(es): Akihiro Watanabe, Fumito Ohnishi, Kazuya Kondo, Masayuki Araki, Satoshi Okutani, Shintaro Iwatani, Takahiro Asano, Wataru Hibino, Yusuke Takahashi

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

(86) Pedido Internacional: PCT JP2008050135 de 09/01/2008

(87) Publicação Internacional: WO 2008/102572de
28/08/2008

“MÉTODO PARA PRODUZIR UM L-AMINOÁCIDO OU UM ÁCIDO NUCLEÍCO”

Campo Técnico

A presente invenção se refere a técnicas usadas na indústria de fermentação, mais especificamente, um método para produzir um L-aminoácido ou ácido nucleico por fermentação usando um microorganismo, nas quais cultura é realizada precipitando o L-aminoácido ou ácido nucleico.

Estado da Técnica Anterior

L-Aminoácidos são produzidos industrialmente por fermentação usando bactérias produtoras de aminoácidos pertencendo às bactérias corineformes ou à família *Enterobacteriaceae* e tendo uma capacidade de produzir L-aminoácido. Como estas bactérias produtoras de aminoácidos, cepas isoladas da natureza assim como mutantes artificiais de tais cepas e cepas recombinantes nas quais enzima de biossíntese de L-aminoácido é aumentada por recombinação genética são usadas a fim de melhorar a produtividade.

Exemplos de tais bactérias incluem, por exemplo, para fermentação de L-triptofano, uma bactéria cuja atividade de antranilato sintetase, atividade de fosfoglicerato desidrogenase e atividade de triptofano sintase são aumentadas (documento de Patente 1), e bactérias cujo operon de triptofano é amplificado (documentos de Patente 2 a 4).

Exemplos das técnicas para fermentação de ácido L-glutâmico incluem uma técnica de aumentar capacidade de produzir ácido L-glutâmico aumentando o gene de glutamato desidrogenase (*gdh*), gene de isocitrato desidrogenase (*icdA*), gene de aconitato hidratase (*acnA*, *acnB*) e gene de citrato sintase (*gltA*) (documento de Patente 5).

Exemplos de bactérias para fermentação de L-treonina incluem um microorganismo cujo gene de aspartoquinase III (*lysC*) e gene de aspartato semialdeído desidrogenase (*asd*) assim como o gene de

aspartoquinase I (*thrA*), gene de homoserina quinase (*thrB*) e gene de treonina sintase (*thrC*) codificados pelo operon *thr* são aumentados (documento de Patente 6), e assim por diante.

Embora capacidades de produzir L-aminoácidos sejam consideravelmente aumentadas pelo melhoramento mencionado acima de microorganismos e melhora de métodos de produção, ainda é desejado desenvolver métodos mais econômicos e eficientes para produzir L-aminoácidos a fim de responder a aumento de demanda no futuro.

Métodos de realizar fermentação enquanto precipitando L-aminoácido se acumulando em um meio de cultura também são conhecidos (documentos de Patente 7 e 8). Como para ácido L-glutâmico, um método para produzir ácido L-glutâmico usando um microorganismo que pode acumular ácido L-glutâmico com sua precipitação foi descrito (documento de Patente 9). Além disso, um método de fermentação utilizando cristalização no qual cristais de aminoácidos tendo um diâmetro de partícula médio de 1 a 120 µm são adicionados ao meio também é conhecido (documento de Patente 10).

Entretanto, produtividades dos métodos mencionados acima são insuficientes se comparadas com aquelas que podem ser obtidas em métodos comuns de fermentação nos quais cristais não são precipitados, e melhoras adicionais foram descritas.

documento de Patente 1: Patente Internacional 94/08031

documento de Patente 2: Patente Japonesa Não-examinada (Kokai) No. 57-71397

documento de Patente 3: Patente Japonesa Não-examinada No. 62-244382

documento de Patente 4: Patente U.S. No. 4.371.614

documento de Patente 5: Patente Japonesa Não-examinada No. 63-214189

documento de Patente 6: Patente Japonesa Não-examinada No.

2001-346578

documento de Patente 7: Patente Japonesa Não-examinada No.
62-288

documento de Patente 8: Patente Européia No. 1078989

5 documento de Patente 9: Patente U.S. No. 6.905.819

documento de Patente 10: Patente Internacional 06/109830

Descrição da invenção

Objetivo a ser atingido pela invenção

Um objetivo da presente invenção é melhorar produtividade
10 em produção de L-aminoácido ou ácido nucleico por fermentação usando um
microorganismo no qual o L-aminoácido ou ácido nucleico é acumulado em
um meio precipitando cristais deste.

Meios para atingir o objetivo

Normalmente é assumido que redução de densidade de
15 potência de impulsor de agitação usada em um processo de fermentação afeta
adversamente a fermentação. Entretanto, como resultado de várias pesquisas
do requerente da presente invenção, foi encontrado que produtividade de L-
aminoácido foi melhorada controlando densidade de potência de impulsor de
agitação para ser menor do que um certo nível depois de precipitação de
20 cristais ou adição de cristais de semente, e a presente invenção foi realizada.

A presente invenção assim fornece os seguintes.

(1) Um método para produzir um L-aminoácido ou um ácido
nucleico cultivando um microorganismo tendo uma capacidade de produzir o
L-aminoácido ou ácido nucleico em um meio líquido contido em um tanque
25 de fermentação abastecido com um impulsor de agitação opcionalmente
adicionando cristais de semente ao meio se requerido para produzir e
acumular cristais do L-aminoácido ou ácido nucleico no meio, e coletando
cristais do L-aminoácido ou ácido nucleico de cultura, em que densidade de
potência do impulsor de agitação é controlada para ser $2,4 \text{ kW/m}^3$ ou menor

depois de precipitação dos cristais ou adição dos cristais de semente.

(2) O método mencionado acima, em que densidade de potência do impulsor de agitação é controlada para ser $0,5 \text{ kW/m}^3$ ou maior depois de precipitação dos cristais ou adição dos cristais de semente.

5 (3) O método mencionado acima, em que cultura é realizada com densidade de potência do impulsor de agitação é controlada para ser $3,0 \text{ kW/m}^3$ ou maior antes de precipitação dos cristais ou adição dos cristais de semente.

10 (4) O método mencionado acima, em que o microorganismo é um microorganismo pertencendo à família *Enterobacteriaceae*.

(5) O método mencionado acima, em que o microorganismo é uma bactéria corineforme ou uma bactéria *Bacillus*.

15 (6) O método mencionado acima, em que o L-aminoácido consiste de um ou mais tipos de L-aminoácidos selecionados a partir de L-triptofano, L-fenilalanina, L-tirosina, L-isoleucina, L-valina, L-leucina, ácido L-glutâmico, L-glutamina, L-treonina, L-cisteína, L-cistina e derivados destes.

20 (7) O método mencionado acima, em que o ácido nucleico consiste de um ou mais tipos de ácidos nucleicos selecionados a partir de inosina, adenosina, guanosina, xantosina, ácido inosínico, ácido adenílico, ácido guanílico, ácido xantílico e derivados destes.

Breve Descrição das Ilustrações

25 Fig. 1 mostra visão esquemática de equipamento de fermentação, que mostra coleção de substâncias alvo de tanque de fermentação.

Fig. 2 mostra relação de densidade de potência de agitação do impulsor de agitação e taxa de produção de L-triptofano.

Fig. 3 mostra relação de densidade de potência de agitação do impulsor de agitação e taxa de produção de ácido L-glutâmico.

Fig. 4 mostra relação de densidade de potência de agitação do impulsor de agitação e taxa de produção de L-treonina.

Melhor Modo para Realizar a Invenção

<1> Método de produção da presente invenção

5 O método da presente invenção é um método para produzir um L-aminoácido ou um ácido nucleico cultivando um microorganismo tendo uma capacidade de produzir o L-aminoácido ou ácido nucleico em um meio líquido contido em um tanque de fermentação abastecido com um impulsor de agitação opcionalmente adicionando cristais de semente ao meio se requerido
10 para produzir e acumular cristais do L-aminoácido ou ácido nucleico no meio, e coletando cristais do L-aminoácido ou ácido nucleico de cultura, caracterizado pelo fato de que densidade de potência do impulsor de agitação (potência por unidade de volume do caldo de fermentação) é controlada para ser 2,4 kW/m³ ou menor depois de precipitação dos cristais ou adição dos
15 cristais de semente.

Na presente invenção, “L-aminoácido” não é particularmente limitado contanto que o aminoácido possa ser acumulado em um meio com sua precipitação em método de fermentação usando microorganismos. Exemplos incluem aminoácidos básicos tal como L-lisina, L-ornitina, L-
20 arginina, L-histidina, e L-citrulina; L-aminoácidos alifáticos tal como L-isoleucina, L-alanina, L-valina, L-leucina, e L-glicina; L-aminoácidos que são ácidos hidroximonoaminocarboxílicos tal como L-treonina e L-serina; L-aminoácidos cíclicos tal como L-prolina; L-aminoácidos aromáticos tal como L-fenilalanina, L-tirosina, e L-triptofano; L-aminoácidos contendo enxofre tal
25 como L-cisteína, L-cistina, e L-metionina; L-aminoácidos ácidos tal como ácido L-glutâmico, e ácido L-aspártico; L-aminoácidos com grupo amida na cadeia lateral tal como L-glutamina, e L-asparagina, etc.

Aminoácidos hidrofóbicos, aminoácidos ácidos e aminoácidos com grupo amida na cadeia lateral são preferivelmente exemplificados. Como

os aminoácidos hidrofóbicos, L-valina, L-leucina e L-isoleucina, que são aminoácidos alifáticos, L-triptofano, L-fenilalanina e L-tirosina, que são aminoácidos aromáticos, como aminoácidos ácidos, ácido L-glutâmico e ácido L-aspártico, e como os aminoácidos com grupo amida na cadeia lateral, 5 L-glutamina, L-asparagina, e assim por diante são particularmente preferivelmente exemplificados.

Além disso, o L-aminoácido referido na presente invenção inclui derivados obtidos dos aminoácidos mencionados acima como materiais de partida, e exemplos incluem GABA, p-hidroxi-D-fenilglicina, DOPA, 10 ácido succínico, ácido málico e ácido pirúvico.

O L-aminoácido ou ácido nucleico produzido pela presente invenção pode consistir de um ou dois ou mais tipos de L-aminoácidos ou ácidos nucleicos.

Na presente invenção, o "ácido nucleico" não é 15 particularmente limitado, contanto que ele seja um ácido nucleico que pode ser acumulado com sua precipitação em um meio em método de fermentação utilizando um microorganismo. Exemplos do ácido nucleico incluem nucleosídeos de purina, nucleotídeos de purina, e assim por diante. Os nucleosídeos de purina incluem inosina, xantosina, guanosina, adenosina, e 20 assim por diante, e os nucleotídeos de purina incluem ésteres de 5'-fosfato dos nucleosídeos de purina, por exemplo, ácido inosínico, (inosina-5'-fosfato, de agora em diante também referido como "IMP"), ácido xantílico (xantosina-5'-fosfato, de agora em diante também referido como "XMP"), ácido guanílico (guanosina-5'-monofosfato, de agora em diante também referido como 25 "GMP"), ácido adenílico (adenosina-5'-monofosfato, de agora em diante também referido como "AMP"), e assim por diante. O ácido nucleico referido na presente invenção inclui derivados de ácidos nucleicos obtidos a partir dos ácidos nucleicos mencionados acima como materiais de partida, e exemplos incluem Ara-U (uracil arabinosídeo), ZVA (Z-valaciclovir), e assim por

diante. Na presente invenção, os L-aminoácidos, ácidos nucleicos e derivados destes mencionados acima também podem ser referidos como "substância alvo".

O impulsor de agitação é um dispositivo para agitar um meio líquido contido em um tanque de fermentação, e formato deste não é particularmente limitado. O impulsor de agitação normalmente consiste de um eixo e aletas (pás) fixadas no eixo, ou as aletas ou uma parte destas podem constituir o eixo. O impulsor de agitação normalmente gira ao redor do eixo como centro, mas ele também pode operar de outras maneiras. Como formato das aletas, aquelas na forma de turbina, pá, propulsor, âncora, fita, ou os semelhantes podem ser usadas, mas isto não é limitado a estas. Além disso, o número de aletas e disposição de cada aleta também não são particularmente limitados. O impulsor de agitação opera mediante o recebimento de potência com o eixo de uma máquina de potência tal como motores. Sobre o impulsor de agitação, por exemplo, Chemical Engineering Manual (Kagaku Kogaku Binran, edited by Chemical Engineering Association, revised 4th edition, pp.1310-1311, Maruzen Co., Ltd.) pode ser referido.

Na presente invenção, densidade de potência do impulsor de agitação significa potência do impulsor de agitação por unidade de volume de caldo de fermentação. Potência do impulsor de agitação é calculada subtraindo potência (saída) de uma máquina de potência no momento de realizar agitação em um tanque de fermentação vazio de potência (saída) da máquina de potência no momento de agitar o caldo de fermentação. Especificamente, a potência pode ser calculada, por exemplo, quando a máquina de potência é um motor, a partir de corrente que flui no motor e eficiência do motor. A potência também pode ser medida preparando uma curva de calibração mostrando a relação da corrente que flui em um motor e a potência, e convertendo a corrente na potência usando a curva de calibração. Além disso, a potência também pode ser calculada em conformidade com a

equação seguinte a partir de um valor de torque aplicado no impulsor de agitação, que é medido usando um instrumento para medir torque tal como torquímetro ou sensor de torque.

$$\text{Potência } P \text{ [kW]} = T \times 2 \times \pi \times n / 1000$$

5

T: Torque [N·m]

n: Número de rotação de impulsor de agitação [/s]

Um valor obtido dividindo o valor de potência medido como descrito acima com o volume do meio é a densidade de potência do impulsor de agitação.

10

Na presente invenção, a densidade de potência do impulsor de agitação é preferivelmente controlada para ser 2,4 kW/m³ ou menor depois de precipitação de cristais ou adição de cristais de semente. A densidade de potência do impulsor de agitação é controlada para ser mais preferivelmente 2,0 kW/m³ ou menor, particularmente preferivelmente 1,5 kW/m³ ou menor, mais preferivelmente 1,0 kW/m³ ou menor. Embora limite inferior da densidade de potência do impulsor de agitação não seja particularmente definido, contanto que produção de substância ou crescimento do microorganismo não sejam reduzidos, ele é desejavelmente controlado para ser 0,4 kW/m³ ou maior, preferivelmente 0,5 kW/m³ ou maior, mais preferivelmente 0,6 kW/m³ ou maior, mais preferivelmente 0,7 kW/m³ ou maior.

20

A densidade de potência do impulsor de agitação é controlada para estar dentro do intervalo mencionado acima depois de precipitação de cristais ou adição de cristais de semente, e ela preferivelmente é continuamente controlada como descrito acima até conclusão da fermentação. Além disso, se a densidade de potência do impulsor de agitação é substancialmente controlada para estar dentro do intervalo mencionado, ela pode temporariamente exceder o intervalo mencionado acima. Especificamente, se a densidade de potência do impulsor de agitação está

25

dentro do intervalo mencionado acima para 50% ou mais, preferivelmente 70% ou mais, mais preferivelmente 90% ou mais, do período depois de precipitação de cristais ou adição de cristais de semente até que fermentação ou acumulação de substância alvo atinja um platô, a densidade de potência do impulsor de agitação é substancialmente controlada.

A densidade de potência do impulsor de agitação antes de precipitação de cristais ou adição de cristais de semente é preferivelmente maior do que o intervalo mencionado acima definido para o período depois de precipitação de cristais ou depois de adição de cristais de semente, e ela é preferivelmente controlada para ser 2,6 kW/m³ ou maior, mais preferivelmente 2,8 kW/m³ ou maior, particularmente preferivelmente 3,0 kW/m³ ou maior. Se a densidade de potência do impulsor de agitação é substancialmente controlada para estar dentro do intervalo mencionado, ela pode ser temporariamente menor do que o intervalo mencionado acima. Especificamente, se a densidade de potência do impulsor de agitação está dentro do intervalo mencionado acima para 50% ou mais, preferivelmente 70% ou mais, mais preferivelmente 90% ou mais, do período do início da fermentação ou do período de produção de substância alvo descrito depois de precipitação de cristais ou adição de cristais de semente, a densidade de potência do impulsor de agitação é substancialmente controlada.

Na presente invenção, se a quantidade de substância alvo acumulada excede a solubilidade de saturação desta, ou excede estado de supersaturação, cristais da substância alvo precipitam espontaneamente. Portanto, se o microorganismo tem uma capacidade de acumular a substância alvo no meio em uma quantidade fornecendo uma concentração excedendo a solubilidade de saturação, não é necessária nenhuma operação para precipitar a substância alvo. Entretanto, a fim de promover precipitação da substância alvo, cristais podem ser adicionados. Os cristais de semente significam cristais adicionados ao meio como requerido para um tal propósito. Embora

os cristais de semente não sejam limitadas àquelas da substância alvo contanto que elas sejam efetivas para promover precipitação dos cristais, elas desejavelmente são cristais da substância alvo. Por exemplo, no caso de fermentação de L-triptofano, cristais de L-triptofano são desejáveis.

5 Como para concentração dos cristais de semente a serem adicionadas, quando o microorganismo que produz a substância alvo tem uma capacidade de precipitar cristais no meio no processo de fermentação, os cristais de semente são desejavelmente adicionadas em uma quantidade de 0,5 g/L ou mais, preferivelmente 1 g/L ou mais, mais preferivelmente 5 g/L ou
10 mais, ainda mais preferivelmente 10 g/L ou mais.

 Quando o microorganismo não tem nenhuma capacidade de acumular a substância alvo no meio em uma quantidade fornecendo uma concentração excedendo a solubilidade de saturação, é necessário adicionar a substância alvo ao meio em uma quantidade tal que concentração da
15 substância alvo exceda a solubilidade de saturação. Embora a substância alvo a ser adicionada em um tal caso possa estar na forma de solução, ou partículas finas ou cristais, ela preferivelmente contém cristais pelo menos como cristais de semente. Neste caso, a quantidade dos cristais de semente é desejavelmente 10 g/L ou mais, preferivelmente 20 g/L ou mais, mais
20 preferivelmente 30 g/L ou mais, ainda mais preferivelmente 50 g/L ou mais. Na presente invenção, qualquer substância adicionada a fim de promover precipitação da substância alvo, quer ela seja uma solução ou pó, está incluída no escopo da semente de cristalização, a menos que especificado.

 Em qualquer caso, como para o limite superior da
25 concentração dos cristais de semente a serem adicionadas, concentração não é particularmente definida, contanto que produção de substância e crescimento do microorganismo não sejam acentuadamente diminuídos. Entretanto, ela é preferivelmente 100 g/L ou menor, mais preferivelmente 90 g/L ou menor, ainda mais preferivelmente 80 g/L ou menor, particularmente preferivelmente

70 g/L ou menor.

Embora os cristais de semente possam ser adicionados em qualquer momento durante o período antes do microorganismo tendo uma capacidade de produzir a substância alvo ser inoculado no meio, ou período de cultura depois que o microorganismo é inoculado no meio, elas são preferivelmente adicionadas, por exemplo, depois que o microorganismo é inoculado no meio, e por volta de quando a concentração da substância alvo no meio atinge a solubilidade de saturação e antes de cristais da substância alvo precipitarem no meio, mais preferivelmente quando a concentração da substância alvo está em um nível fornecendo supersaturação, e antes de cristais da substância alvo precipitarem no meio. Se um tal momento é representado pelo tempo de cultura, elas são preferivelmente adicionadas por volta de 5 horas, desejavelmente por volta de 10 horas, mais desejavelmente por volta de 15 horas, ainda mais desejavelmente por volta de 20 horas, mais desejavelmente por volta de 25 horas, depois do início da cultura ou do início do estágio de produção de substância alvo descrito depois. Além disso, os cristais de semente são preferivelmente adicionadas quando cerca de 0,2, preferivelmente cerca de 0,3, ainda mais preferivelmente cerca de 0,4, do tempo total de cultura para produção de substância alvo ou tempo do estágio de produção de substância alvo para conclusão da cultura, que é tomado como 1, passa.

A solubilidade de saturação referida aqui significa uma concentração da substância alvo dissolvida no meio líquido que é saturado com a substância alvo. Isto é, ela significa uma concentração constante da substância alvo obtida quando a supersaturação da substância alvo é cancelada.

As solubilidades de L-aminoácidos e ácidos nucleicos são como mostrado em Tabelas 1 e 2, e os cristais de semente são preferivelmente adicionadas por volta de quando a concentração atinge qualquer destas

concentrações.

Tabela 1

L-Aminoácido	Solubilidade (20°C) g/L	Solubilidade (40°C) g/L
L-triptófono	10,6	14
L-fenilalanina	27,4	38
L-tirosina	0,38	0,75
L-isoleucina	41,2	44
L-leucina	23,8	26
L-valina	57,5	65
ácido L-glutâmico	7,2	15
L-treonina	90	122
L-glutamina	37,3	66
L-histidina	38	58
ácido L-aspartico	6,0	8,3
L-cisteína	160	
L-cistina	0,09	

Tabela 2

Nucleosídeo ou nucleotídeo	Solubilidade (20°C) g/L	Solubilidade (40°C) g/L
inosina	44,4	83,4
guanosina	0,42	1,05
adenosina	3,0	8,3
ácido inosínico	137	241
ácido guanílico	206	260

Na presente invenção, o tempo depois de precipitação de cristais significa um tempo depois que a concentração da substância alvo no meio excede a solubilidade de saturação, e cristais da substância alvo precipitam. Na presente invenção, a potência do impulsor de agitação antes da precipitação de cristais ou adição de cristais de semente é preferivelmente maior do que aquela depois da precipitação de cristais ou adição de cristais de semente. Embora a potência do impulsor de agitação antes da precipitação de cristais ou adição de cristais de semente possa ser qualquer potência contanto que ela esteja dentro de um intervalo preferido para o crescimento do microorganismo, ela é desejavelmente controlada para ser 2,4 kW/m³ ou maior, preferivelmente 2,6 kW/m³ ou maior, mais preferivelmente 2,8 kW/m³ ou maior, ainda mais preferivelmente 3,0 kW/m³ ou maior, mais preferivelmente 3,2 kW/m³ ou maior.

O método da presente invenção pode incluir um estágio para proliferar um microorganismo tendo uma capacidade de produzir uma substância alvo (fase de proliferação) e um estágio para produzir a substância alvo (fase de produção de substância alvo). Em um tal caso, é preferível
5 deixar o microorganismo crescer suficientemente no estágio de proliferação, e fazê-lo acumular maximamente a substância alvo na fase de produção de substância alvo. Além disso, precipitação da substância alvo ou adição de cristais de semente é preferivelmente atingida no estágio final da fase de crescimento ou da fase de produção de substância alvo. O total de cristais de
10 semente a ser adicionado pode ser adicionado de uma vez, porções divididas do total de cristais de semente podem ser adicionadas duas ou mais vezes, ou elas podem ser adicionadas continuamente.

A "fase de proliferação" referida na presente invenção significa o estágio quando a fonte de carbono é usada primariamente para
15 crescimento celular, isto é, o estágio quando o microorganismo está se proliferando logaritmicamente. A "fase de produção de substância alvo" referida na presente invenção significa o estágio quando a fonte de carbono é usada principalmente para produção de substância alvo depois de um período de 10 horas, preferivelmente 15 horas, mais preferivelmente 20 horas, do
20 início da cultura.

Potência dos impulsores de agitação na fase de proliferação não é particularmente limitada, contanto que ela esteja dentro de um intervalo adequado para crescimento do microorganismo, e especificamente, ela seja a
mesma que a potência dos impulsores de agitação usada antes da precipitação
25 de cristais ou adição de cristais de semente descrita acima.

Qualquer meio pode ser usado para a presente invenção contanto que ele contenha uma fonte de carbono e uma fonte de nitrogênio como nutrientes. Como um método de cultura para a presente invenção, qualquer cultura em batelada, cultura em batelada alimentada, ou cultura

contínua pode ser usada.

Na presente invenção, a cultura em batelada alimentada se refere a um método de cultura no qual o meio é continuamente ou intermitentemente alimentado no frasco de cultura, e o meio não é extraído até o fim da cultura. A cultura contínua significa um método no qual o meio é continuamente ou intermitentemente alimentado ao frasco de cultura durante a cultura, e o meio é extraído do frasco (normalmente em um volume equivalente ao volume do meio alimentado) ao mesmo tempo. O "meio inicial" significa o meio usado na cultura em batelada antes de alimentar o meio de alimentação na cultura em batelada alimentada ou cultura contínua, e o "meio de alimentação" significa um meio para ser fornecido a um fermentador quando cultura em batelada alimentada ou cultura contínua é realizada. O meio de alimentação pode conter todos ou uma parte dos componentes necessários para o crescimento de um microorganismo. O termo "meio de fermentação" significa um meio contido em um fermentador, e uma substância alvo é coletada deste meio de fermentação. Além disso, o termo "fermentador" significa um frasco no qual a produção de substância alvo é realizada, e o formato deste frasco não é limitado. Por exemplo, um tanque de fermentação ou um fermentador de tanque pode ser usado. Além disso, o volume do fermentador não é limitado contanto que uma substância alvo possa ser produzida e coletada.

Como a fonte de carbono no meio que é usada para a presente invenção, sacarídeos tal como glicose, glicerol, frutose, sacarose, maltose, manose, galactose, hidrolisado de amido, e melaço podem ser usados, e glicose e sacarose são particularmente preferidas. Em adição, ácidos orgânicos tal como ácido acético e ácido cítrico e álcoois tal como etanol e metanol também podem ser usados independentemente ou em combinação com outra fonte de carbono. Além disso, como uma matéria-prima da fonte de carbono, melaço de cana, melaço de beterraba, mel rico invertido, melaço de

citros e açúcar invertido podem ser usados, e hidrolisados de matérias-primas naturais tal como celulose, amido, milho, cereal, e tapioca também podem ser usados. Além disso, dióxido de carbono dissolvido no meio de cultura também pode ser usado como a fonte de carbono. Estas fontes de carbono
5 podem ser usadas no meio inicial e meio de alimentação. O meio pode conter um ou dois ou mais tipos destas fontes de carbono. Além disso, a mesma fonte de carbono pode ser usada para o meio inicial e o meio de alimentação, ou a fonte de carbono do meio de alimentação pode ser diferente daquela do meio inicial. Por exemplo, glicose pode ser usada como a fonte de carbono do
10 meio inicial, enquanto que sacarose pode ser usada como a fonte de carbono do meio de alimentação.

Como a fonte de nitrogênio no meio da presente invenção, amônia, sais de amônio tal como sulfato de amônio, carbonato de amônio, cloreto de amônio, fosfato de amônio e acetato de amônio, uréia, nitratos, e
15 assim por diante podem ser usados. Gás amônia e amônia aquosa usadas para ajustar o pH também podem ser utilizadas como a fonte de nitrogênio. Além disso, peptona, extrato de levedura, extrato de carne, extrato de malte, água de maceração de milho, hidrolisado de soja, e assim por diante também podem ser utilizados. O meio pode conter um ou mais tipos destas fontes de
20 nitrogênio. Estas fontes de nitrogênio também podem ser usadas tanto para o meio inicial como o meio de alimentação. Além disso, a mesma fonte de nitrogênio pode ser usada tanto para o meio inicial como o meio de alimentação, ou a fonte de nitrogênio do meio de alimentação pode ser diferente daquela do meio inicial.

25 O meio pode conter uma fonte de ácido fosfórico em adição à fonte de carbono e a fonte de nitrogênio. Como a fonte de ácido fosfórico, dihidrogenofosfato de potássio, hidrogenofosfato dipotássico, polímeros de fosfato tal como ácido pirofosfórico, e assim por diante podem ser utilizados.

Além disso, o meio da presente invenção pode conter um fator

promotor de crescimento (um nutriente com um efeito promotor de crescimento), em adição à fonte de carbono e fonte de nitrogênio. Como o fator promotor de crescimento, metais traço, aminoácidos, vitaminas, ácidos graxos, ácidos nucleicos assim como peptona, ácido casamino, extrato de levedura, produto de degradação de proteína de soja, e assim por diante contendo as substâncias precedentes podem ser usados. Aminoácidos aromáticos e aminoácidos de cadeia ramificada, em particular, compartilham um sistema de biossíntese comum, e, portanto um sistema de biossíntese do microorganismo para um outro aminoácido do que o aminoácido alvo pode ser atenuado como descrito posteriormente. Em um tal caso, é preferível adicionar o aminoácido para o qual sistema de biossíntese é atenuado ao meio. Por exemplo, quando o aminoácido alvo é L-triptofano, é desejável adicionar L-fenilalanina e/ou tirosina, e quando o aminoácido alvo é L-fenilalanina, é desejável adicionar L-triptofano e/ou L-tirosina (Patente Internacional 2003/048374).

Exemplos dos metais traço incluem ferro, manganês, magnésio, cálcio, e assim por diante. Exemplos das vitaminas incluem vitamina B₁, vitamina B₂, vitamina B₆, ácido nicotínico, amida de ácido nicotínico, vitamina B₁₂, piridoxina, ácido pantotênico, e assim por diante. Estes fatores promotores de crescimento podem estar presentes no meio inicial ou no meio de alimentação.

Além disso, quando um mutante auxotrófico que requer um aminoácido ou os semelhantes para crescimento é usado, é preferível suplementar o nutriente requerido para o meio. Em particular, uma vez que uma via biossintética de L-aminoácido é aumentada e uma capacidade de degradar L-aminoácido é freqüentemente atenuada em uma bactéria produtora de L-aminoácido que pode ser usada para a presente invenção como descrito posteriormente, um ou mais de L-lisina, L-homoserina, L-isoleucina, e L-metionina são preferivelmente adicionados. Também é preferível para

bactérias produtoras de ácidos nucleicos similarmente adicionar uma substância requerida ao meio.

O meio inicial e o meio de alimentação podem ter as composições iguais ou diferentes. Além disso, quando o meio de alimentação
5 é alimentado em múltiplos estágios, as composições do meio de alimentação alimentado nos vários estágios podem ser as mesmas ou diferentes.

A cultura é preferivelmente realizada como cultura em aeração em uma temperatura de fermentação de 20 a 45°C, particularmente preferivelmente a 30 a 42°C. Como para o gás fornecido ao tanque de
10 fermentação, também é possível fornecer alta concentração de oxigênio simultaneamente com ar, e com isso elevar a concentração de oxigênio no gás fornecido, assim como ar (se referir a Publicação de Patente Japonesa (KOKOKU) Nos. 05-048117 e 5-39594).

A quantidade de oferta de oxigênio pode ser uma quantidade
15 tal que a concentração de oxigênio no meio é 2 a 4 ppm, e é preferível fornecer um gás misturado alta concentração de oxigênio de 40 a 100% de concentração de oxigênio e ar a 1/10 a 1,5/1 vvm. A alta concentração de oxigênio pode ser preparada usando um concentrador de oxigênio. Como o concentrador de oxigênio, há aqueles de tipo PSA e tipo membrana de
20 enriquecimento em oxigênio, e um método de evaporar oxigênio líquido com um evaporador e fornecê-lo a um tanque de fermentação, ou fornecer diretamente oxigênio líquido a um tanque de fermentação pode ser usado.

A cultura em aeração é realizada com o pH ajustado para 5 a 9. Se pH é diminuído durante a cultura, por exemplo, carbonato de cálcio ou
25 uma base alcalina tal como gás amônia e amônia aquosa é adicionado para neutralizar a cultura. Quando o aminoácido alvo é um aminoácido ácido, por exemplo, ácido L-glutâmico, é desejável realizar a cultura em pH 3 a 9, preferivelmente pH 3 a 5. Quando a cultura é realizada em tais condições preferivelmente por cerca de 10 a 120 horas, uma notável quantidade de

substância alvo é acumulada no meio de cultura. Embora a concentração de substância alvo que se acumula não seja limitada contanto que ela seja maior do que aquela observada com cepas tipo selvagem e a substância alvo possa ser coletada do meio, ela pode ser 50 g/L ou maior, desejavelmente 75 g/L ou maior, mais desejavelmente 100 g/L ou maior quando a substância alvo é um L-aminoácido, e ela pode ser 50 g/L ou maior, desejavelmente 75 g/L ou maior, mais desejavelmente 100 g/L ou maior, quando a substância alvo é um ácido nucleico.

A substância alvo pode ser coletada de acordo com um método de coleta conhecido do meio de cultura depois da cultura. Por exemplo, a substância alvo precipitada no meio pode ser coletada por centrifugação ou filtração. Além disso, a substância alvo que está dissolvida no meio pode ser cristalizada, e então a substância alvo precipitada e os cristais podem ser isolados juntos.

Na presente invenção, a cultura do microorganismo pode ser realizada como pré-inóculo e cultura principal a fim de assegurar acumulação de mais substância alvo do que um certo nível. Por exemplo, o pré-inóculo pode ser realizado como cultura em agitação usando um frasco ou os semelhantes, ou cultura em batelada, e a cultura principal pode ser realizada como cultura em batelada alimentada ou cultura contínua. Alternativamente, tanto o pré-inóculo como a cultura principal podem ser realizadas como cultura em batelada. Além disso, antes do pré-inóculo e da cultura principal, pré-cultura pode ser realizada uma vez ou duas vezes ou mais vezes para tornar a escala de cultura sucessivamente maior.

Nestes métodos de cultura, quando a concentração de substância alvo atinge o nível pretendido, uma parte da substância alvo pode ser extraída, e meio fresco pode ser adicionado para repetir a cultura. Como o meio fresco a ser adicionado, um meio contendo uma fonte de carbono e um nutriente tendo um efeito promotor de crescimento (fator promotor de

crescimento) é preferido. Como a fonte de carbono, glicose, sacarose, e frutose são preferidos. Como o fator promotor de crescimento, fontes de nitrogênio, ácido fosfórico, aminoácidos, e assim por diante são preferidos. Como a fonte de nitrogênio, amônia, sais de amônio tal como sulfato de amônio, carbonato de amônio, cloreto de amônio, fosfato de amônio e acetato de amônio, uréia, nitratos, e assim por diante podem ser usados. Além disso, como a fonte de ácido fosfórico, dihidrogenofosfato de potássio e hidrogenofosfato dipotássico podem ser usados. Como para os aminoácidos, quando uma cepa mutante auxotrófica é usada, é preferível suplementar o nutriente requerido.

Quando cultura em batelada alimentada ou cultura contínua é realizada na presente invenção, o meio de alimentação pode ser alimentado intermitentemente de forma que o fornecimento de sacarídeo ou fonte de nutrição seja temporariamente interrompido. O fornecimento do meio de alimentação é interrompido, por exemplo, em no máximo, 30% ou menos, preferivelmente 20% ou menos, particularmente preferivelmente 10% ou menos, do tempo de alimentação. Quando o meio de alimentação é alimentado intermitentemente, o meio de alimentação pode ser adicionado por um tempo pré-determinado, e a segunda e seguintes adições podem ser controladas para começar quando um aumento no pH ou concentração de oxigênio dissolvido é detectado por um computador mediante exaustão da fonte de carbono no meio de fermentação durante o período de adição parada antes de um certo período de adição de meio, de forma que a concentração de substrato no tanque de cultura seja sempre automaticamente mantida em um nível baixo (Patente U.S. No. 5.912.113).

Como a fonte de carbono, glicose, sacarose, e frutose são preferidos. Como o fator promotor de crescimento, fontes de nitrogênio, ácido fosfórico, aminoácidos, e assim por diante são preferidos. Como a fonte de nitrogênio, amônia, sais de amônio tal como sulfato de amônio, carbonato de

amônio, cloreto de amônio, fosfato de amônio e acetato de amônio, uréia, nitratos, e assim por diante podem ser usados. Além disso, como a fonte de ácido fosfórico, dihidrogenofosfato de potássio e hidrogenofosfato dipotássico podem ser usados. Como para os aminoácidos, quando uma cepa mutante auxotrófica é usada, é preferível suplementar o nutriente requerido. Além disso, o meio de alimentação pode ser um tipo de meio, ou uma mistura de dois ou mais tipos de meios. Quando dois ou mais tipos de meios de alimentação são usados, os meios podem ser misturados e alimentados usando uma caixa de alimentação, ou os meios podem ser separadamente alimentados usando duas ou mais caixas de alimentação.

Quando cultura em batelada alimentada é realizada, o meio de alimentação é preferivelmente alimentado em uma quantidade tal que a quantidade de sacarídeo no meio de alimentação ou todo o meio de fermentação não excede 30 g/L, e ela é preferivelmente controlada para ser 20 g/L ou menor, mais preferivelmente 10 g/L ou menor. Em particular, a concentração de sacarídeo é preferivelmente controlada de forma que esteja no intervalo de concentração mencionado acima no fim da proliferação logarítmica do microorganismo e dali pra frente. A vazão de alimentação da fonte de carbono pode ser controlada usando o método descrito em Patente U.S. No. 5.912.113. Além disso, sacarídeo e ácido fosfórico são preferivelmente alimentados em tais concentrações de forma que sacarídeo e ácido fosfórico servem como fatores limitantes do crescimento de célula bacteriana. Ácido fosfórico pode estar presente no meio de alimentação em uma quantidade de 2 ou menor, preferivelmente 1,5 ou menor, mais preferivelmente 1 ou menor, expressa em termos da proporção fósforo/carbono (P/C) (se referir a Patente U.S. No. 5.763.230).

Quando o método de cultura contínua é usado na presente invenção, o meio pode ser extraído e alimentado simultaneamente, ou uma parte do meio pode ser extraída, e então o meio pode ser alimentado. Além

disso, o método também pode ser um método de cultura contínua incluindo reciclar células nas quais o meio de cultura contendo uma substância alvo e células bacterianas é extraído, e apenas as células são devolvidas para o fermentador (Patente Francesa No. 2669935). Como o método para alimentar
5 continuamente ou intermitentemente uma fonte de nutrientes, é usado o mesmo método que na cultura em batelada alimentada.

Quando o meio de cultura é intermitentemente extraído, uma parte da substância alvo é extraída quando a concentração de substância alvo atinge um nível pré-determinado, e um meio fresco é alimentado para
10 continuar a cultura. Além disso, a cultura é preferivelmente realizada de forma que o volume final do meio depois de adicionar o meio é igual ao volume do meio de cultura antes da extração. O termo “igual” significa que o volume correspondendo a cerca de 93 a 107% do volume do meio antes da extração.

Quando o meio de cultura é continuamente extraído, a extração é desejavelmente iniciada ao mesmo tempo em que ou depois da alimentação do meio de nutrientes. Por exemplo, dentro de 5 horas no máximo, desejavelmente 3 horas, mais desejavelmente 1 hora, depois do início da alimentação, a extração pode ser iniciada. Além disso, o volume de
15 extração do meio de cultura é preferivelmente igual ao volume do meio alimentado.

O método de cultura contínua de reciclar células bacterianas inclui extrair intermitentemente ou continuamente o meio de fermentação quando a concentração de substância alvo atinge um nível pré-determinado,
25 extraindo apenas a substância alvo, e re-circular resíduos de fermentação contendo células bacterianas no frasco de fermentação, e isto pode ser realizado se referindo a, por exemplo, Patente Francesa No. 2669935.

Além disso, os cristais precipitados pelo método de cristalização da presente invenção podem ser extraídos do tanque de

fermentação durante a cultura. Especificamente, pode ser usado um método de aumentar produtividade realizando fermentação em um tanque de fermentação de acordo com o método da presente invenção, extraíndo o caldo de fermentação contendo a substância alvo e células do caldo de fermentação, coletando cristais da substância alvo por centrifugação ou concentração, e reciclando o caldo de fermentação para o tanque de fermentação. Por exemplo, no equipamento mostrado em Fig. 1, pode ser usado um método de circular caldo de fermentação contendo a substância alvo e células através da cepa A, concentrando cristais da substância alvo por centrifugação B, extraíndo os cristais da cepa C, e reciclando o caldo de fermentação para o tanque de fermentação através da cepa D. Em um tal método, as células podem ser ou não recicladas para o tanque de fermentação. Para a centrifugação dos cristais, um separador centrífugo líquido é preferivelmente usado (Patente Japonesa Não-examinada No. 5-92944).

Além disso, para a produção de um ácido nucleico, permitindo que nucleosídeo de purina fosforilase e fosforribosiltransferase atuem em inosina ou guanosina preparada pelo método da presente invenção, 5'-ácido inosínico ou 5'-ácido guanílico pode ser obtido.

Além disso, também é possível fosforilar o nucleosídeo de purina produzido usando o microorganismo da presente invenção permitindo que fosfotransferase atue no nucleosídeo de purina para produzir um nucleotídeo de purina (éster de ácido 5'-fosfórico de nucleosídeo) (Patente Japonesa Não-examinada No. 2000-295996). Por exemplo, o método para produzir um nucleotídeo de purina usando uma bactéria *Escherichia* na qual um gene codificando inosina guanosina quinase de *Escherichia coli* é introduzido (Patente Internacional 91/08286), e o método para produzir um nucleotídeo de purina usando *Corynebacterium ammoniagenes* na qual um gene codificando inosina guanosina quinase de *Exiguobacterium acetylicum* é introduzido (Patente Internacional 96/30501) podem ser usados.

Além disso, também é possível produzir um nucleotídeo de purina (éster de ácido 5'-fosfórico de nucleosídeo) permitindo que um microorganismo tendo uma capacidade de produzir um éster de ácido 5'-fosfórico de nucleosídeo ou fosfatase ácida (EC 3.1.3.2) atue no nucleosídeo de purina produzido usando o microorganismo da presente invenção e um doador de fosfato selecionado a partir do grupo consistindo de ácido polifosfórico, fenil fosfato e carbamil fosfato. Embora o microorganismo tendo uma capacidade de produzir um éster de ácido 5'-fosfórico de nucleosídeo não seja particularmente limitado contanto que um microorganismo tendo uma capacidade de converter um nucleosídeo de purina em um nucleotídeo de purina seja escolhido, exemplos incluem, por exemplo, o microorganismo descrito em Publicação de Patente Internacional WO96/37603.

Além disso, *Escherichia blattae* JCM 1650, *Serratia ficaria* ATCC 33105, *Klebsiella planticola* IFO 14939 (ATCC 33531), *Klebsiella pneumoniae* IFO 3318 (ATCC 8724), *Klebsiella terrigena* IFO 14941 (ATCC 33257), *Morganella morganii* IFO 3168, *Enterobacter aerogenes* IFO 12010, *Enterobacter aerogenes* IFO 13534 (ATCC 13048), *Chromobacterium fluviatile* IAM 13652, *Chromobacterium violaceum* IFO 12614, *Cedecea lapagei* JCM 1684, *Cedecea davisiae* JCM 1685, *Cedecea neteri* JCM 5909, e assim por diante descritas em Patente Japonesa Não-examinada No. 07-231793 também podem ser usadas.

Como a fosfatase ácida, por exemplo, aquelas descritas em Patente Japonesa Não-examinada No. 2002-000289 podem ser usadas, e uma fosfatase ácida cuja afinidade para um nucleosídeo é aumentada (Patente Japonesa Não-examinada No. 10-201481), uma fosfatase ácida mutante cuja atividade de nucleotidase é diminuída (Patente Internacional 96/37603), uma fosfatase ácida mutante cuja atividade de hidrólise de éster de ácido fosfórico é diminuída (Patente Japonesa Não-examinada No. 2001-245676) e assim por

diante podem ser mais preferivelmente usadas.

Também é possível obter um nucleotídeo de purina fosforilando quimicamente um nucleosídeo de purina produzido usando o microorganismo da presente invenção (Bulletin of the Chemical Society of Japan, 42, 3505). Além disso, um método de obter GMP acoplado o microorganismo tendo uma capacidade de produzir XMP da presente invenção e atividade de XMP aminase usando o sistema regenerador de ATP de um microorganismo, e um método de obter IMP acoplado inosina quinase (Biosci. Biotech. Biochem., 51, 840 (1997); Patente Japonesa Não-examinada No. 63-230094) também podem ser usados.

Inosina, guanosina ou nucleosídeo de purina preparados pelo método da presente invenção usado para a preparação mencionada acima de nucleotídeo de purina podem ser um produto purificado, ou caldo de fermentação de nucleosídeo de purina, ou um produto bruto contendo um nucleosídeo de purina.

<2> Microorganismos utilizáveis para a presente invenção

O microorganismo usado para a presente invenção não é particularmente limitado, contanto que um microorganismo tendo uma capacidade de produzir um L-aminoácido ou ácido nucleico, e capaz de acumular o L-aminoácido ou ácido nucleico em um meio líquido quando ele é cultivado no meio seja escolhido. A quantidade do L-aminoácido ou ácido nucleico a ser acumulado também não é particularmente limitada contanto que ele possa ser acumulado em uma quantidade tal que ele possa ser coletado do meio. Entretanto, o microorganismo preferivelmente tem uma capacidade de cristalizar a substância alvo no meio, e é desejável que o microorganismo possa acumular a substância alvo, por exemplo, em uma concentração maior do que as concentrações descritas em Tabelas 1 e 2.

Por exemplo, quando o pH de uma solução aquosa contendo ácido L-glutâmico é reduzido, a solubilidade de ácido L-glutâmico diminui

acentuadamente por volta de pKa (4,25) do grupo γ -carboxila, e é o mais baixo no ponto isoelétrico (pH 3,2). Embora também dependa da composição do meio, ácido L-glutâmico normalmente dissolve em uma quantidade de 10 a 20 g/L em pH 3,2, 30 a 40 g/L em pH 4,0, e 50 a 60 g/L em pH 4,7, a cerca de 30°C.

Como o microorganismo da presente invenção ou uma cepa parental que é usada para derivar o microorganismo, microorganismos pertencendo à família *Enterobacteriaceae*, exemplos típicos dos quais são bactérias *Escherichia* e bactérias *Pantoea*, bactérias corineformes, e assim por diante podem ser usados. Em adição, bactérias que utilizam metanol tal como bactérias *Metilophilus* e bactérias *Metilobacillus*, que podem produzir L-aminoácido a partir de metanol, também podem ser usadas. Exemplos adicionais de microorganismos pertencendo à família *Enterobacteriaceae* incluem enterobactérias pertencendo a γ -proteobactérias tal como aquelas pertencendo ao gênero *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Erwinia*, *Salmonella*, *Morganella*, ou os semelhantes, e exemplos de outros microorganismos incluem bactérias *Alicyclobacillus*, bactérias *Bacillus*, leveduras pertencendo ao gênero *Saccharomyces*, *Candida* ou os semelhantes, e assim por diante.

Como as bactérias *Escherichia*, aquelas mencionadas no trabalho de Neidhardt et al. (Neidhardt, F.C. et al., *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1208, tabela 1), tal como *Escherichia coli*, podem ser utilizadas. Exemplos de cepas tipo selvagem de *Escherichia coli* incluem, por exemplo, a cepa K12 e derivados desta, cepa MG1655 de *Escherichia coli* (ATCC No. 47076), cepa W3110 (ATCC No. 27325), e assim por diante. Elas estão disponíveis a partir da American Type Culture Collection (ATCC, Endereço: P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, Estados Unidos da América). Isto é, números de registro são dados para cada uma das cepas, e as cepas podem ser

ordenadas usando estes números de registro. Os números de registro das cepas são listados no catálogo da American Type Culture Collection (se referir a <http://www.atcc.org/>).

Além disso, exemplos das bactérias *Enterobacter* incluem *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes* e assim por diante, e exemplos das bactérias *Pantoea* incluem *Pantoea ananatis*. Algumas espécies de *Enterobacter agglomerans* foram recentemente re-classificadas em *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea stewartii* ou as semelhantes, baseado na análise de seqüências de nucleotídeos de 16S rRNA, etc.. Tanto as bactérias *Enterobacter* como bactérias *Pantoea* podem ser usadas contanto que a bactéria escolhida seja classificada na família *Enterobacteriaceae*. Quando uma cepa de *Pantoea ananatis* é melhorada por uma técnica de engenharia genética, *Pantoea ananatis* cepa AJ13355 (FERM BP-6614), cepa AJ13356 (FERM BP-6615), cepa AJ13601 (FERM BP-7207) e derivados destas podem ser usados. Estas cepas foram identificadas como *Enterobacter agglomerans* quando elas foram isoladas, e depositadas como *Enterobacter agglomerans*. Entretanto, elas foram recentemente re-classificadas como *Pantoea ananatis* com base em seqüenciamento de nucleotídeos de 16S rRNA e assim por diante como descrito acima.

Exemplos específicos das bactérias *Metilophilus* incluem *Metilophilus metilotrophus*, e exemplos típicos de *Metilophilus metilotrophus* incluem a cepa AS1 (NCIMB 10515) e assim por diante. A cepa AS1 de *Metilophilus metilotrophus* está disponível a partir da National Collections of Industrial and Marine Bacteria (Endereço: NCIMB Ltd., Torry Research Station, 135, Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, Reino Unido).

Exemplos específicos das bactérias *Metilobacillus* incluem *Metilobacillus glycogenes*, *Metilobacillus flagellatum*, e assim por diante. Exemplos de *Metilobacillus glycogenes* incluem a cepa T-11 (NCIMB 11375), cepa ATCC 21276, cepa ATCC 21371, cepa ATR80 (descrita em

Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 42, pp.67-72, 1994), cepa A513 (descrita em Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 42, pp.67-72 (1994)), e assim por diante. A cepa NCIMB 11375 de *Metilobacillus glycogenes* pode ser obtida a partir da National Collections of Industrial and Marine Bacteria (Endereço: 5 NCIMB Lts., Torry Research Station 135, Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, Reino Unido). Exemplos de *Metilobacillus flagellatum* incluem a cepa KT (descrita em Arch. Microbiol., vol. 149, pp.441-446, 1988) e assim por diante.

As bactérias corineformes são um grupo de microorganismos definido em Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed., p.599 10 (1974), e microorganismos classificados em tais bacilos aeróbicos, Gram-positivos e não ácido-resistentes que são incapazes de esporular podem ser usados. As bactérias corineformes incluem bactérias que foram previamente classificadas no gênero *Brevibacterium*, mas atualmente são unidas no gênero *Corynebacterium* (Int. J. Syst. Bacteriol. 41:255-260 (1991)), e bactérias 15 pertencendo ao gênero *Brevibacterium* ou *Microbacterium*, que são intimamente relacionados ao gênero *Corynebacterium*.

Exemplos específicos de tais bactérias corineformes incluem as seguintes:

- Corynebacterium acetoacidophilum*
- 20 *Corynebacterium acetoglutamicum*
- Corynebacterium alkanolyticum*
- Corynebacterium callunae*
- Corynebacterium glutamicum*
- Corynebacterium lilium*
- 25 *Corynebacterium melassecola*
- Corynebacterium thermoaminogenes* (*Corynebacterium efficiens*)
- Corynebacterium herculis*
- Brevibacterium divaricatum*

Brevibacterium flavum

Brevibacterium immariophilum

Brevibacterium lactofermentum

Brevibacterium roseum

5 *Brevibacterium saccharolyticum*

Brevibacterium thiogenitalis

Corynebacterium ammoniagenes

Brevibacterium album

Brevibacterium cerinum

10 *Microbacterium ammoniaphilum*

Exemplos específicos destas bactérias incluem as cepas seguintes:

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC 13870

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC 15806

15 *Corynebacterium alkanolyticum* ATCC 21511

Corynebacterium callunae ATCC 15991

Corynebacterium glutamicum ATCC 13020, ATCC 13032, ATCC 13060

Corynebacterium lilium ATCC 15990

20 *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965

Corynebacterium efficiens AJ12340 (FERM BP-1539)

Corynebacterium herculis ATCC 13868

Brevibacterium divaricatum ATCC 14020

25 *Brevibacterium flavum* ATCC 13826, ATCC 14067, AJ12418 (FERM BP-2205)

Brevibacterium immariophilum ATCC 14068

Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869

(*Corynebacterium glutamicum* TCC 13869)

Brevibacterium roseum ATCC 13825

Brevibacterium saccharolyticum ATCC 14066

Brevibacterium thiogenitalis ATCC 19240

Brevibacterium ammoniagenes ATCC 6871, ATCC 6872

Brevibacterium album ATCC 15111

5 *Brevibacterium cerinum* ATCC 15112

Microbacterium ammoniaphilum ATCC 15354

Estas cepas estão disponíveis, por exemplo, a partir da American Type Culture Collection (ATCC) (Endereço: P.O. Box 1549, Manassas, VA 2010812301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, Estados Unidos da América). A cepa AJ12340 foi depositada em 27 de Outubro de 1987 em National Institute of Bioscience and Human Technology of Agency of Industrial Science and Technology (atualmente agência administrativa independente, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-5466, Japão), com um número de depósito de FERM BP-1539 sujeito a disposições do Tratado de Budapeste. A cepa AJ12418 foi depositada em 5 de Janeiro de 1989 em National Institute of Bioscience and Human Technology of Agency of Industrial Science and Technology, com um número de depósito de FERM BP-2205 sujeito a disposições do Tratado de Budapeste.

Quando bactérias *Bacillus* são usadas, exemplos destas incluem *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, e assim por diante.

Exemplos de *Bacillus subtilis* incluem *Bacillus subtilis* cepa 168 Marburg (ATCC 6051), *Bacillus subtilis* cepa PY79 (Plasmid, 1984, 12, 1-9), e assim por diante. Exemplos de *Bacillus amyloliquefaciens* incluem *Bacillus amyloliquefaciens* cepa T (ATCC 23842), *Bacillus amyloliquefaciens* cepa N (ATCC 23845), e assim por diante. Exemplos de *Bacillus pumilus* incluem *Bacillus pumilus* Gottheil No. 3218 (ATCC 21005) (Patente U.S. No.

3.616.206), e assim por diante.

A seguir, são descritos métodos para conceder uma capacidade de produzir L-aminoácido ou ácido nucleico a tais cepas parentais como mencionado acima.

5 Para fornecer a capacidade de produzir um L-aminoácido ou um ácido nucleico, métodos convencionalmente empregados no melhoramento de bactérias corineformes ou bactérias do gênero *Escherichia* (veja "Amino Acid Fermentation", Gakkai Shuppan Center (Ltd.), 1st Edition, publicado em 30 de Maio de 1986, pp. 77-100) podem ser usados. Tais
10 métodos incluem métodos de adquirir um mutante auxotrófico, uma cepa resistente a análogo, ou um mutante de regulação metabólica, ou construir uma cepa recombinante de forma que ela superexpresse uma enzima de biossíntese de L-aminoácido ou ácido nucleico. Aqui, no melhoramento de uma bactéria produtora de L-aminoácido, uma ou mais das propriedades
15 descritas acima tal como auxotrofia, resistência a análogo, ou mutação de regulação metabólica podem ser fornecidas. Expressão de uma ou mais enzimas de biossíntese de L-aminoácido pode ser aumentada. Além disso, os métodos de fornecer propriedades tal como uma mutação auxotrófica, resistência a análogo, ou mutação de regulação metabólica podem ser
20 combinados com os métodos de aumentar as enzimas de biossíntese.

 Uma cepa mutante auxotrófica, cepa resistente a análogo de L-aminoácido ou ácido nucleico, ou cepa mutante de regulação metabólica com uma capacidade de produzir um L-aminoácido ou ácido nucleico pode ser obtida sujeitando uma cepa parental ou cepa tipo selvagem a uma mutagênese
25 convencional, tal como exposição a raios X ou radiação UV, ou tratamento com um mutagênico tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, etc., e então selecionando aquelas que exibem uma auxotrofia, resistência a análogo, ou mutação de regulação metabólica e que também têm a capacidade de produzir um L-aminoácido a partir das cepas mutantes obtidas.

Uma cepa mutante auxotrófica, cepa resistente a análogo de L-aminoácido, ou cepa mutante de regulação metabólica com uma capacidade de produzir um L-aminoácido pode ser obtida sujeitando uma cepa parental ou cepa tipo selvagem a uma mutagênese convencional, tal como exposição a raios X ou radiação UV, ou tratamento com um mutagênico tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina ou etil metanossulfonato (EMS), etc., e então selecionando aquelas que exibem uma auxotrofia, resistência a análogo, ou mutação de regulação metabólica e que também têm a capacidade de produzir um L-aminoácido a partir das cepas mutantes obtidas.

Métodos para conceder capacidade de produzir L-aminoácido e bactérias produtoras de aminoácidos serão especificamente exemplificados abaixo.

L-Triptofano, L-fenilalanina, e L-tirosina são todos aminoácidos aromáticos e compartilham uma via de biossíntese comum.

Exemplos dos genes codificando as enzimas de biossíntese para estes aminoácidos aromáticos incluem deoxi-arabino-heptulosonato fosfato sintase (*aroG*), 3-deidroquinato sintase (*aroB*), ácido chiquímico desidrogenase (*aroE*), chiquimato quinase (*aroL*), 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (*aroA*), e corismato sintase (*aroC*) (Patente Européia Não-examinada No. 763127). Sabe-se que estes genes são controlados pelo repressor de tirosina (*tyrR*), de forma que atividade de uma enzima de biossíntese de aminoácido aromático também pode ser aumentando deletando o gene *tyrR* (veja Patente Européia Não-examinada No. 763127). As abreviações em parênteses depois dos nomes das enzimas representam os nomes dos genes (o mesmo deve se aplicar às mesmas ocasiões para o futuro).

A fim de melhorar a produtividade de cada um dos aminoácidos aromáticos alvo, biossíntese de um outro aminoácido do que o aminoácido alvo pode ser atenuada. Por exemplo, quando o aminoácido alvo é L-triptofano, vias biossintéticas de L-fenilalanina e/ou L-tirosina podem ser

atenuadas (Patente U.S. No. 4.371.614).

Além disso, 3-deoxi-D-arabinoheptulose-7-fosfato sintetase (*aroF*, *aroG*) é sujeita a inibição por retroalimentação por aminoácidos aromáticos. Portanto, a enzima pode ser modificada de forma que ela não seja sujeita a inibição por retroalimentação. Uma bactéria produtora de L-aminoácido aromático pode ser obtida, por exemplo, introduzindo um *aroF* mutante no qual o ácido L-aspartico em posição 147 ou a L-serina em posição 181 é substituído por outro aminoácido, ou introduzindo um gene *aroG* mutante no qual o ácido L-aspartico em posição 146 do término N, a L-metionina em posição 147, a L-prolina em posição 150 ou a L-alanina em posição 202, ou tanto a L-metionina em posição 157 como a L-alanina em posição 219 são substituídas por outro(s) aminoácido(s) (Patente Européia Não-examinada No. 0488424).

Um exemplo de um gene envolvido na síntese de aminoácidos de cadeia ramificada é o operon *ilvGMEDA*, e este operon é sujeito a controle de expressão (atenuação) por L-valina e/ou L-isoleucina e/ou L-leucina. Portanto, produtividade de um microorganismo para estes L-aminoácidos pode ser melhorada introduzindo no microorganismo o operon *ilvGMEDA* no qual a região requerida para atenuação é removida ou mutada.

Aminoácidos aromáticos e aminoácidos de cadeia ramificada compartilham um sistema de biossíntese comum, e, portanto, é preferível usar uma cepa na qual um sistema de biossíntese específico para um aminoácido aromático ou aminoácido de cadeia ramificada outro do que o L-aminoácido alvo é atenuado. Por exemplo, uma cepa que pode produzir eficientemente um L-aminoácido alvo pode ser obtida atenuando o sistema de biossíntese de L-fenilalanina e L-tirosina quando o aminoácido alvo é L-triptofano, atenuando o sistema de biossíntese de L-triptofano e L-tirosina quando o aminoácido alvo é L-fenilalanina, atenuando o sistema de biossíntese de L-leucina e L-isoleucina quando o aminoácido alvo é L-valina, atenuando o sistema de

biossíntese de L-valina e L-leucina quando o aminoácido alvo é L-isoleucina, ou atenuando o sistema de biossíntese de L-valina e L-isoleucina quando o aminoácido alvo é L-leucina. Atenuação de um sistema de biossíntese pode ser atingida introduzindo uma mutação em um gene codificando para uma

5 enzima do sistema de biossíntese ou obtendo uma cepa que requer um L-aminoácido sintetizado por um sistema de biossíntese que se deseja que seja atenuado usando um meio sintético contendo aquele L-aminoácido.

Métodos para conceder capacidade de produzir L-aminoácido e microorganismos aos quais capacidade de produzir L-aminoácido é

10 fornecida, e que são utilizáveis para a presente invenção são exemplificados abaixo.

Bactérias produtoras de L-triptofano

Exemplos de bactérias produtoras de L-triptofano e cepas parentais que podem ser usadas para derivar estas incluem, mas não são

15 limitados a, cepas pertencendo ao gênero *Escherichia*, tal como *E. coli* JP4735/pMU3028 (DSM10122) e JP6015/pMU91 (DSM10123) que são deficientes em triptofanoil-tRNA sintetase codificada por gene *trpS* mutante (Patente U.S. No. 5.756.345), *E. coli* SV164 (pGH5) tendo um alelo *serA* codificando fosfoglicerato desidrogenase não sujeito a inibição por

20 retroalimentação por serina e um alelo *trpE* codificando antranilato sintase não sujeito a inibição por retroalimentação por triptofano (Patente U.S. No. 6.180.373); *E. coli* AGX17 (pGX44) (NRRL B-12263) e AGX6(pGX50)aroP (NRRL B-12264) deficiente na enzima triptofanoase (Patente U.S. No. 4.371.614), *E. coli* AGX17/pGX50,pACKG4-pps na qual uma capacidade de

25 produzir fosfoenolpiruvato é aumentada (Patente Internacional 97/08333, Patente U.S. No. 6.319.696), e assim por diante. Bactérias produtoras de L-triptofano pertencendo ao gênero *Escherichia* que têm atividade aumentada da proteína codificada pelo gene *yedA* ou *yddG* também podem ser usadas (Pedidos Publicados de Patente U.S. 2003/0148473 A1 e 2003/0157667 A1).

Exemplos de bactérias produtoras de L-triptofano e cepas parentais que podem ser usadas para derivar estas também incluem cepas nas quais uma ou mais atividades das seguintes enzimas são aumentadas: antranilato sintase (*trpE*), fosfoglicerato desidrogenase (*serA*), e triptofano sintase (*trpAB*). A antranilato sintase e fosfoglicerato desidrogenase são ambas sujeitas à inibição por retroalimentação por L-triptofano e L-serina, portanto uma mutação dessensibilizando a inibição por retroalimentação pode ser introduzida nestas enzimas. Exemplos específicos de cepas tendo uma tal mutação incluem *E. coli* SV164 que abriga antranilato sintase dessensibilizada e uma cepa transformante SV164(pGH5) obtida introduzindo na *E. coli* SV164 o plasmídeo pGH5, que contém um gene *serA* mutante codificando uma fosfoglicerato desidrogenase dessensibilizada para inibição por retroalimentação.

Exemplos de bactérias produtoras de L-triptofano e cepas parentais que podem ser usadas para derivar estas também incluem uma cepa que tem atividade aumentada de 3-fosfoserina fosfatase (*serB*) (Patente U.S. No. 4.371.614), uma cepa que tem atividade aumentada de fosfoenolpiruvato carboxiquinase (*pckA*) (Patente Internacional 2004/090125), e uma cepa que expressa constitutivamente o operon de maleato sintase-isocitrato liase-isocitrato desidrogenase-quinase/fosfatase (operon *ace*) ou na qual expressão deste operon é aumentada (Patente Internacional 2005/103275).

Exemplos de bactérias produtoras de L-triptofano e cepas parentais para derivar estas também incluem cepas nas quais o operon de triptofano contendo um gene codificando antranilato sintase dessensibilizada para inibição foi introduzido (Patente Japonesa Não-examinada Nos. 57-71397, 62-244382, Patente U.S. No. 4.371.614). Além disso, capacidade de produzir L-triptofano pode ser fornecida acentuando expressão de um gene que codifica triptofano sintase no operon de triptofano (*trpBA*). Triptofano sintase consiste de subunidades α e β que são codificadas pelos genes *trpA* e

trpB, respectivamente. Em adição, capacidade de produzir L-triptofano pode ser melhorada acentuando expressão do operon de isocitrato liase-malato sintase (Patente Internacional 2005/103275).

Como bactérias corineformes, *Corynebacterium glutamicum* AJ12118 (FERM BP-478, Patente Japonesa No. 01681002), que é resistente a sulfaguanidina, a bactéria corineforme introduzida com o operon de triptofano (Patente Japonesa Não-examinada No. 63-240794), e a bactéria corineforme introduzida com um gene codificando para chiquimato quinase derivada de uma bactéria corineforme (Patente Japonesa Não-examinada No. 01-994749) podem ser usadas.

Bactérias produtoras de L-fenilalanina

Exemplos de bactérias produtoras de L-fenilalanina e cepas parentais que podem ser usadas para derivar estas incluem, mas não são limitados a, cepas pertencendo ao gênero *Escherichia*, tal como *E. coli* AJ12739 (*tyrA*::Tn10, *tyrR*) (VKPM B-8197), *E. coli* HW1089 (ATCC 55371) abrigando um gene *pheA34* mutante (Patente U.S. No. 5.354.672), *E. coli* MWE101-b (Patente Coreana No. 8903681), *E. coli* NRRL B-12141, NRRL B-12145, NRRL B-12146, e NRRL B-12147 (Patente U.S. No. 4.407.952). Também, como uma cepa parental, *E. coli* K-12 [W3110 (*tyrA*)/pPHAB (FERM BP-3566), *E. coli* K-12 [W3110 (*tyrA*)/pPHAD] (FERM BP-12659), *E. coli* K-12 [W3110 (*tyrA*)/pPHATerm] (FERM BP-12662) e *E. coli* K-12 [W3110 (*tyrA*)/pBR-aroG4, pACMAB] denominada como AJ12604 (FERM BP-3579) podem ser usadas (Publicação de Patente Européia No. 488424 B1). Além disso, bactérias produtoras de L-fenilalanina pertencendo ao gênero *Escherichia* com uma atividade aumentada da proteína codificada pelo gene *yedA* ou pelo gene *yddG* também podem ser usadas (Pedidos Publicados de Patente U.S. No. 2003/0148473 A1 e 2003/0157667 A1).

Como bactérias corineformes produtoras de fenilalanina, a

Cornebacterium glutamicum BPS-13 (FERM BP-1777), K77 (FERM BP-2062), e K78 (FERM BP-2063) (Patente Européia Não-examinada No. 331145, Patente Japonesa Não-examinada No. 02-303495), cuja atividade de fosfoenolpiruvato carboxilase ou piruvato quinase é reduzida, cepa
 5 auxotrófica para tirosina (Patente Japonesa Não-examinada No. 05-049489), e assim por diante podem ser usadas.

Uma bactéria que produz eficientemente fenilalanina também pode ser obtida modificando uma bactéria de forma que a bactéria incorpora subprodutos, por exemplo, aumentando a expressão do gene de absorção de
 10 L-triptofano, *tnaB* ou *mtr*, ou do gene de absorção de L-tirosina, *tyrP* (Patente Européia No. 1484410).

Bactérias produtoras de L-tirosina

Exemplos de bactérias produtoras de tirosina incluem bactérias *Escherichia* com um gene de prefenato desidratase (*tyrA*) dessensibilizado. O
 15 produto de expressão deste gene é dessensibilizado para inibição por tirosina (Pedido de Patente Européia Não-examinado No. 1616940).

Bactérias produtoras de L-valina

Exemplos de bactérias produtoras de L-valina e cepas parentais que podem ser usadas para derivar bactérias produtoras de L-valina
 20 incluem, mas não são limitados a, cepas que foram modificadas para superexpressar o operon *ilvGMEDA* (Patente U.S. No. 5.998.178). É preferido que a região no operon *ilvGMEDA* que é requerida para atenuação seja removida de forma que expressão do operon não seja atenuada pela L-valina que é produzida. Além disso, é preferido que o gene *ilvA* no operon seja
 25 rompido de forma que atividade de treonina desaminase seja diminuída.

Exemplos de bactérias produtoras de L-valina que podem ser usadas para derivar bactérias produtoras de L-valina também incluem cepas mutantes com amino-acil t-RNA sintetase tendo uma mutação (Patente U.S. No. 5.658.766). Por exemplo, *E. coli* VL1970, que tem uma mutação no gene

ileS codificando isoleucina tRNA sintetase, pode ser usada. *E. coli* VL1970 foi depositada na Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscou 117545, Rússia) em 24 de Junho de 1988 sob um número de acesso VKPM B-4411.

5 Além disso, mutantes requerendo ácido lipóico para crescimento e/ou carecendo de H^+ -ATPase também podem ser usados como cepas parentais (Patente Internacional 96/06926).

10 Exemplos de bactérias produtoras de L-valina de bactérias corineformes incluem, por exemplo, cepas modificadas de forma que expressão de um gene codificando uma enzima biossintética de L-valina seja aumentada. Exemplos da enzima de biossíntese de L-valina incluem enzimas codificadas por genes presentes no operon *ilvBNC*, isto é, ácido acetohidroxi sintetase codificada por *ilvBN* e isomero-redutase codificada por *ilvC* (Patente Internacional 00/50624). Uma vez que o operon *ilvBNC* é sujeito a regulação
15 de expressão por L-valina e/ou L-isoleucina e/ou L-leucina, é desejável eliminar atenuação para evitar supressão de expressão por L-valina que é produzida.

20 Fornecimento de capacidade de produzir L-valina a bactérias corineformes pode ser realizado diminuindo ou eliminando atividade de pelo menos um tipo de enzima que está envolvida em uma via metabólica que diminui produção de L-valina. Por exemplo, diminuição da atividade de treonina desidratase envolvida na síntese de L-leucina, ou atividade de uma enzima que está envolvida em síntese de D-pantotenato é observada (Patente Internacional 00/50624).

25 Exemplos de métodos para conceder capacidade de produzir L-valina também incluem fornecer resistência a um análogo de aminoácido ou os semelhantes.

Exemplos incluem, por exemplo, cepas mutantes que são auxotróficas para L-isoleucina e L-metionina, e resistentes a D-ribose,

ribonucleosídeo de purina ou ribonucleosídeo de pirimidina, e têm uma capacidade de produzir L-valina (FERM P-1841, FERM P-29, Publicação de Patente Japonesa No. 53-025034), cepas mutantes resistentes a policetídeos (FERM P-1763, FERM P-1764, Publicação de Patente Japonesa No. 06-065314), e cepas mutantes resistentes a L-valina em um meio contendo ácido acético como a única fonte de carbono e sensíveis a análogos de ácido pirúvico (ácido fluoropirúvico etc.) em um meio contendo glicose como a única fonte de carbono (FERM BP-3006, BP-3007, Patente Japonesa No. 3006929).

Bactérias produtoras de L-isoleucina

Exemplos de bactérias produtoras de L-isoleucina e cepas parentais que podem ser usadas para derivar bactérias produtoras de L-isoleucina incluem, mas não são limitados a, mutantes tendo resistência a 6-dimetilaminopurina (Patente Japonesa Não-examinada No. 5-304969), mutantes tendo resistência a um análogo de isoleucina tal como tiaisoleucina e hidroxamato de isoleucina, e mutantes adicionalmente tendo resistência a DL-etionina e/ou hidroxamato de arginina (Patente Japonesa Não-examinada No. 5-130882). Em adição, cepas recombinantes transformadas com genes codificando proteínas envolvidas em biossíntese de L-isoleucina, tal como treonina desaminase e ácido acetohidroxi sintase, também podem ser usadas como cepas parentais (Patente Japonesa Não-examinada No. 2-458, Patente Francesa No. 0356739, e Patente U.S. No. 5.998.178).

Exemplos de cepas produtoras de L-isoleucina de bactérias corineformes incluem a bactéria corineforme cujo gene *brnE* codificando para uma proteína de excreção de aminoácido de cadeia ramificada é amplificado (Patente Japonesa Não-examinada No. 2001-169788), a bactéria corineforme fornecida com capacidade de produzir L-isoleucina por fusão de protoplastos com uma bactéria produtora de L-lisina (Patente Japonesa Não-examinada No. 62-74293), a bactéria corineforme cuja homoserina desidrogenase é

aumentada (Patente Japonesa Não-examinada No. 62-91193), a cepa resistente a hidroxamato de treonina (Patente Japonesa Não-examinada No 62-195293), cepa resistente a ácido α -cetomalônico (Patente Japonesa Não-examinada No. 61-15695), e a cepa resistente a metil lisina (Patente Japonesa
5 Não-examinada No. 61-15696).

Bactérias produtoras de L-valina

Exemplos de bactérias produtoras de L-valina e cepas parentais para derivar bactérias produtoras de L-valina incluem, mas não são limitados a, bactérias *Escherichia*, tal como cepas de *E. coli* resistentes a
10 leucina (por exemplo, a cepa 57 (VKPM B-7386, Patente U.S. No. 6.124.121)) ou análogos de leucina incluindo β -2-tienilalanina, 3-hidroxileucina, 4-azaleucina e 5,5,5-trifluoroleucina (Publicação de Patente Japonesa No. 62-34397 e Patente Japonesa Não-examinada No. 8-70879);
15 cepas de *E. coli* obtidas pelo método de engenharia genética descrito em Patente Internacional 96/06926; e *E. coli* H-9068 (Patente Japonesa Não-examinada No. 8-70879).

A bactéria da presente invenção também pode ser melhorada aumentando a expressão de um ou mais genes envolvidos em biossíntese de L-leucina. Exemplos de tais genes incluem genes do operon *leuABCD*, que
20 são preferivelmente representados por um gene *leuA* mutante codificando para isopropilmalato sintase dessensibilizado para inibição por retroalimentação por L-leucina (Patente U.S. No. 6.403.342). Em adição, a bactéria da presente invenção pode ser melhorada aumentando a expressão de um ou mais genes codificando para proteínas que excretam L-aminoácido da
25 célula bacteriana. Exemplos de tais genes incluem os genes *b2682* e *b2683* (genes *ygaZH*) (Patente Européia Não-examinada No. 1239041 A2).

Exemplos de cepas produtoras de L-leucina de bactérias corineformes incluem as cepas resistentes a 2-tiazolalanina e β -hidroxileucina (Patente Japonesa Não-examinada No. 8-266295), a cepa resistente a análogo

de valina (Patente Japonesa Não-examinada No. 63-248392), a cepa auxotrófica para valina (Publicação de Patente Japonesa No. 38-4395), a cepa resistente a S-(2-aminoetil)-L-cisteína (AEC) (Publicação de Patente Japonesa No. 51-37347), e a cepa auxotrófica para fenilalanina, valina e isoleucina (Publicação de Patente Japonesa No. 54-36233).

Bactérias produtoras de ácido L-glutâmico

Exemplos preferidos de bactérias produtoras de ácido L-glutâmico incluem cepas nas quais expressão de um gene codificando uma enzima biossintética de ácido L-glutâmico é aumentada. Exemplos de tais genes incluem, mas não são limitados a, genes codificando glutamato desidrogenase (*gdhA*), glutamina sintetase (*glnA*), glutamato sintetase (*gltAB*), 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*), triose fosfato isomerase (*tpiA*), frutose bifosfato aldolase (*fbp*), fosfofrutoquinase (*pfkA*, *pfkB*), glicose fosfato isomerase (*pgi*), metilcitrato sintase (*prpC*) e assim por diante.

Exemplos de cepas que foram modificadas de forma que expressão do gene de citrato sintetase, do gene de fosfoenolpiruvato carboxilase, do gene de isocitrato desidrogenase, do gene de piruvato desidrogenase, e/ou do gene de glutamato desidrogenase é aumentada incluem aquelas descritas em Patente Européia Não-examinada Nos. 1078989, 955368, e 952221.

A modificação para fornecer capacidade de produzir ácido L-glutâmico pode ser atingida diminuindo ou eliminando atividade de uma enzima que catalisa uma reação que se bifurca da via de biossíntese de ácido L-glutâmico e produzindo um outro composto do que ácido L-glutâmico.

Exemplos de uma tal enzima que catalisa uma reação que se bifurca da via de biossíntese de ácido L-glutâmico e produzindo um outro composto do que ácido L-glutâmico incluem isocitrato liase (*aceA*), α -cetoglutarato desidrogenase (*sucA*), ácido acetohidroxi sintase (*ilvG*), acetolactato sintase (*ilvI*), formato acetiltransferase (*pfl*), lactato desidrogenase (*ldh*), glutamato descarboxilase (*gadAB*), 1-pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (*putA*), e assim por diante.

Por exemplo, a fim de diminuir a atividade de α -cetoglutarato desidrogenase, uma modificação pode ser realizado usando o gene *sucA* (*odhA*) codificando para a subunidade E1 da enzima. Exemplos de cepas com atividade de α -cetoglutarato desidrogenase diminuída incluem, por exemplo, as cepas seguintes:

Brevibacterium lactofermentum cepa ΔS (Patente Internacional 95/34672)

15 *Brevibacterium lactofermentum* AJ12821 (FERM BP-4172; Patente Francesa No. 9401748)

Brevibacterium flavum AJ12822 (FERM BP-4173; Patente Francesa No. 9401748)

20 *Corynebacterium glutamicum* (FERM BP-4174; Patente Francesa No. 9401748)

Pantoea ananatis AJ13601 (FERM BP-7207)

Klebsiella planticola AJ13410 (FERM BP-6617)

Pantoea ananatis AJ13355 (FERM BP-6614)

25 *Pantoea ananatis* AJ13356 é deficiente em atividade de α -cetoglutarato desidrogenase como um resultado de ruptura do gene de 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 re-classificada como *Pantoea ananatis* com base em seqüenciamento de nucleotídeos de 16S rRNA

e assim por diante. Embora AJ13356 tenha sido depositada no depósito mencionado acima como *Enterobacter agglomerans*, ela é descrita como *Pantoea ananatis* neste relatório.

Além disso, a capacidade de produzir ácido L-glutâmico em bactérias corineformes também pode ser atingida por um método de amplificar o gene *yggB* (NCgl 1221;NP_600492. Reports small-conductance. [gi:19552490], Patente Internacional 2006/070944), e um método de introduzir um gene *yggB* mutante no qual uma mutação é introduzida na região de codificação.

O microorganismo usado para o método de produção da presente invenção pode ser um microorganismo modificado de forma que atividade de D-xilose-5-fosfato fosfocetolase e/ou atividade de frutose-6-fosfato fosfocetolase é aumentada.

Tanto uma como ambas das atividades de D-xilose-5-fosfato fosfocetolase e frutose-6-fosfato fosfocetolase podem ser ativadas.

Exemplos de outros métodos para conceder ou aumentar capacidade de produzir ácido L-glutâmico incluem um método de fornecer resistência a um análogo de ácido orgânico, um inibidor de cadeia respiratória, etc., e um método de fornecer sensibilidade para um inibidor de síntese de parede celular. Exemplos de tais métodos incluem os métodos de fornecer resistência a ácido monofluoroacético (Patente Japonesa Não-examinada No. 50-113209), o método de resistência a adenina ou timina (Patente Japonesa Não-examinada No. 57-065198), o método de atenuar urease (Patente Japonesa Não-examinada No. 52-038088), o método de fornecer resistência a ácido malônico (Patente Japonesa Não-examinada No. 52-038088), o método de fornecer resistência a benzopironas ou naftoquinonas (Patente Japonesa Não-examinada No. 56-1889), o método de fornecer resistência a HOQNO (Patente Japonesa Não-examinada No. 56-140895), o método de fornecer resistência a ácido α -cetomalônico (Patente

Japonesa Não-examinada No. 57-2689), o método de fornecer resistência a guanidina (Patente Japonesa Não-examinada No. 56-35981), o método de fornecer sensibilidade para penicilina (Patente Japonesa Não-examinada No. 4-88994), e assim por diante.

5 Exemplos específicos de tais cepas resistentes incluem as cepas seguintes:

Brevibacterium flavum AJ3949 (FERM BP-2632; Patente Japonesa Não-examinada No. 50-113209)

10 *Corynebacterium glutamicum* AJ11628 (FERM P-5736; Patente Japonesa Não-examinada No. 57-065198)

Brevibacterium flavum AJ11355 (FERM P-5007; Patente Japonesa Não-examinada No. 56-1889)

Corynebacterium glutamicum AJ11368 (FERM P-5020; Patente Japonesa Não-examinada No. 56-1889)

15 *Brevibacterium flavum* AJ11217 (FERM P-4318; Patente Japonesa Não-examinada No. 57-2689)

Corynebacterium glutamicum AJ11218 (FERM P-4319; Patente Japonesa Não-examinada No. 57-2689)

20 *Brevibacterium flavum* AJ11564 (FERM BP-5472; Patente Japonesa Não-examinada No. 56-140895)

Brevibacterium flavum AJ11439 (FERM BP-5136; Patente Japonesa Não-examinada No. 56-35981)

Corynebacterium glutamicum H7684 (FERM BP-3004; Patente Japonesa Não-examinada No. 04-88994)

25 *Brevibacterium lactofermentum* AJ11426 (FERM P-5123; Patente Japonesa Não-examinada No. 56-048890)

Corynebacterium glutamicum AJ11440 (FERM P-5137; Patente Japonesa Não-examinada No. 56-048890)

Brevibacterium lactofermentum AJ11796 (FERM P-6402;

Patente Japonesa Não-examinada No. 58-158192)

Bactérias produtoras de L-treonina

Exemplos preferidos de microorganismos tendo capacidade de produzir L-treonina preferivelmente usados para a presente invenção incluem

5 bactérias pertencendo à família *Enterobacteriaceae* nas quais uma atividade de enzima de sistema de biossíntese de L-treonina é aumentada. Exemplos de genes codificando para enzimas biossintéticas de L-treonina incluem o gene de aspartoquinase III (*lysC*), gene de aspartato semialdeído desidrogenase (*asd*), gene de aspartoquinase I (*thrA*), gene de homoserina quinase (*thrB*), e

10 gene de treonina sintase (*thrC*) codificados pelo operon *thr*. Dois ou mais tipos destes genes podem ser introduzidos. Os genes codificando para as enzimas biossintéticas de L-treonina podem ser introduzidos em uma bactéria *Enterobacteriaceae* com decomposição de treonina diminuída. Exemplos da bactéria *Escherichia* com decomposição de treonina diminuída incluem, por

15 exemplo, a cepa TDH6 que é deficiente em atividade de treonina desidrogenase (Patente Japonesa Não-examinada No. 2001-346578), e assim por diante.

As atividades das enzimas biossintéticas de L-treonina são inibidas pelo produto final L-treonina, e, portanto, enzimas biossintéticas de

20 L-treonina são preferivelmente modificadas de forma a serem dessensibilizadas para inibição por retroalimentação por L-treonina quando construindo cepas produtoras de L-treonina. Os genes *thrA*, *thrB* e *thrC* descritos acima constituem o operon de treonina que tem uma estrutura atenuadora. A expressão do operon de treonina é inibida por isoleucina e

25 treonina no meio de cultura e também reprimida por atenuação. Esta atenuação pode ser eliminada ou reduzida removendo uma seqüência líder ou atenuador na região de atenuação (Lynn, S.P., Burton, W.S., Donohue, T.J., Gould, R.M., Gumport, R.I., e Gardner, J.F.J., Mol. Biol. 194:59-69 (1987); Patente Internacional 02/26993; Patente Internacional 2005/049808).

O promotor nativo presente na região antes do operon de treonina pode ser substituído por um promotor não nativo (Patente Internacional 98/04715), ou o operon de treonina pode ser construído de forma que expressão dos genes biossintéticos de treonina seja controlada pelo repressor e promotor de λ -fago (Patente Européia No. 0593792). Além disso, bactérias *Escherichia* mutantes que são dessensibilizadas para inibição por retroalimentação por L-treonina podem ser obtidas selecionando cepas resistentes a ácido α -amino- β -hidroxiisovalérico (AHV).

É preferível que o número de cópias do operon de treonina resistente a retroalimentação seja aumentado, ou a expressão do operon modificado seja aumentada conectando-o a um promotor potente. O número de cópias pode ser aumentado usando, em adição a amplificação usando um plasmídeo, transposon, fago Mu, ou os semelhantes de forma que o operon seja transferido para o cromossomo.

O gene codificando aspartoquinase III (*lysC*) é preferivelmente modificado de forma que a enzima é dessensibilizada para inibição por retroalimentação por L-lisina. Um tal gene *lysC* modificado pode ser obtido pelo método descrito em Patente U.S. No. 5.932.453.

Bactérias produtoras de L-treonina também podem ser preferivelmente obtidas acentuando expressão de genes envolvidos na via glicolítica, ciclo TCA, ou cadeia respiratória, ou genes que regulam expressão destes genes, ou genes envolvidos em absorção de açúcar, além dos genes de enzima biossintética de L-treonina. Exemplos destes genes que são efetivos para produção de L-treonina incluem o gene de transidrogenase (*pntAB*, Patente Européia No. 733712), gene de fosfoenolpiruvato carboxilase (*pepC*, Patente Internacional 95/06114), gene de fosfoenolpiruvato sintase (*pps*, Patente Européia No. 877090), e gene de piruvato carboxilase derivado de bactéria corineforme ou bactéria *Bacillus* (Patente Internacional 99/18228, Patente Européia Não-examinada No. 1092776).

Bactérias produtoras de L-treonina também podem ser preferivelmente obtidas acentuando expressão de um gene que fornece resistência a L-treonina e/ou um gene que fornece resistência a L-homoserina, ou fornecendo resistência a L-treonina e/ou resistência a L-homoserina à

5 bactéria hospedeira. Exemplos dos genes que fornecem a resistência mencionada acima incluem o gene *rhtA* (Res. Microbiol. 154:123-135 (2003)), gene *rhtB* (Patente Européia Não-examinada No. 0994190), gene *rhtC* (Patente Européia Não-examinada No. 1013765), gene *yfiK*, e gene *yeaS* (Patente Européia Não-examinada No. 1016710). Métodos exemplares para

10 conceder resistência a L-treonina a uma bactéria hospedeira incluem aqueles descritos em Patente Européia Não-examinada No. 0994190 ou Patente Internacional 90/04636.

E. coli VKPM B-3996 (Patente U.S. No. 5.175.107) pode ser exemplificada como uma bactéria produtora de L-treonina. A cepa VKPM B-

15 3996 foi depositada em 19 de Novembro de 1987 na Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM), GNII Genetika (Rússia, 117545 Moscou 1, Dorozhny proezd, 1) sob o número de registro VKPM B-3996. A cepa VKPM B-3996 contém o plasmídeo pVIC40 (Patente Internacional 90/04636) que foi obtido inserindo os genes biossintéticos de

20 treonina (operon de treonina, *thrABC*) em um plasmídeo vetor pAYC32 com ampla variedade de hospedeiros contendo o marcador de resistência a estreptomicina (Chistorerdov, A.Y., e Tsygankov, Y.D., Plasmid, 16, 161-167 (1986)). Em pVIC40, aspartoquinase I-homoserina desidrogenase I codificada pelo gene *thrA* no operon de treonina é dessensibilizada para inibição por

25 retroalimentação por treonina.

E. coli VKPM B-5318 (se referir a Patente Européia No. 0593792) também pode ser exemplificada como bactéria produtora de L-treonina. A cepa VKPM B-5318 foi depositada na Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) GNII Genetika (Rússia,

117545 Moscou 1, Dorozhny proezd, 1) em 3 de Maio de 1990 sob um número de registro de VKPM B-5318. A cepa VKPM B-5318 é prototrófica com relação a L-isoleucina, e abriga um DNA de plasmídeo recombinante construído de forma que o operon de treonina, i.e., genes de biossíntese de treonina, deficiente na região de atenuador, que é uma região de regulação de transcrição originalmente contida, está localizado depois do repressor C1 sensível a temperatura derivado de fago λ , promotor PR, e o gene codificando para N-terminal de proteína Cro, e a expressão dos genes de biossíntese de treonina são regulados pelo repressor e o promotor derivado de fago λ .

10 Bactérias produtoras de L-glutamina

Exemplos de método para fornecer capacidade de produzir L-glutamina por melhoramento incluem, por exemplo, um método de modificar uma bactéria de forma que expressão de um gene codificando para uma enzima que está envolvida em biossíntese de L-glutamina é aumentada.

15 Exemplos da enzima que está envolvida em biossíntese de L-glutamina incluem, por exemplo, glutamina sintetase e glutamato desidrogenase (Patente Japonesa Não-examinada No. 2002-300887).

Modificação para fornecer capacidade de produzir L-glutamina também pode ser atingida reduzindo ou deletando atividade de uma enzima que catalisa uma reação que se bifurca da via de biossíntese de L-glutamina e produzindo outro composto. Por exemplo, é concebível reduzir atividade intracelular de glutaminase (Patente Japonesa Não-examinada No. 2004-187684).

25 Exemplos de métodos para conceder ou aumentar capacidade de produzir L-glutamina por melhoramento incluem fornecer resistência a análogos de aminoácidos e assim por diante. Exemplos incluem adicionalmente fornecer resistência a 6-diazo-5-oxo-norleucina (Patente Japonesa Não-examinada No. 3-232497), fornecer resistência a análogo de purina e/ou resistência a sulfóxido de metionina (Patente Japonesa Não-

examinada No. 61-202694), fornecer resistência a ácido α -cetomalônico (Patente Japonesa Não-examinada No. 56-151495), fornecer resistência a um peptídeo contendo ácido glutâmico (Patente Japonesa Não-examinada No. 2-186994) e assim por diante.

5 Exemplos específicos de bactérias corineformes tendo capacidade de produzir L-glutamina incluem as cepas seguintes:

Brevibacterium flavum AJ11573 (FERM P-5492, veja Patente Japonesa Não-examinada No. 56-151495)

10 *Brevibacterium flavum* AJ12210 (FERM P-8123, veja Patente Japonesa Não-examinada No. 61-202694)

Brevibacterium flavum AJ12212 (FERM P-8123, veja Patente Japonesa Não-examinada No. 61-202694)

Brevibacterium flavum AJ12418 (FERM-BP2205, veja Patente Japonesa Não-examinada No. 2-186994)

15 *Brevibacterium flavum* DH18 (FERM P-11116, veja Patente Japonesa Não-examinada No. 3-232497)

Corynebacterium melassecola DH344 (FERM P-11117, veja Patente Japonesa Não-examinada No. 3-232497)

20 *Corynebacterium glutamicum* AJ11574 (FERM P-5493, veja Patente Japonesa Não-examinada No. No. 56-151495)

Bactérias produtoras de L-cisteína

Exemplos de bactérias produtoras de L-cisteína incluem, mas não são limitados a, cepas pertencendo ao gênero *Escherichia*, tal como *E. coli* JM15 que é transformada com diferentes alelos de *cysE* codificando serina acetiltransferases resistentes a retroalimentação (Patente U.S. No. 6.218.168, Pedido de Patente Russa No. 2003121601), *E. coli* W3110 que superexpressou genes que codificam proteínas que promovem excreção de substâncias tóxicas para células (Patente U.S. No. 5.972.663), cepas de *E. coli* com atividade reduzida de cisteína dessulfidrase (Patente Japonesa Não-

25

examinada No. 11-155571), *E. coli* W3110 com atividade aumentada de um regulador de transcrição positivo para regulon de cisteína codificado pelo gene *cysB* (Patente Internacional 01/27307A1), e assim por diante.

5 Nas bactérias produtoras de L-aminoácido usadas para a presente invenção, genes envolvidos em absorção de açúcar, metabolismo de açúcar (via glicolítica) e metabolismo energético podem ser amplificados em adição aos genes codificando enzimas características de biossíntese.

Exemplos dos genes envolvidos em metabolismo de açúcar incluem os genes codificando para as enzimas da via glicolítica e genes de absorção de açúcar, e incluem gene de glicose-6-fosfato isomerase (*pgi*, Patente Internacional 01/02542), gene de fosfoenolpiruvato sintase (*pps*, Patente Européia Não-examinada No. 877090), gene de fosfoglucomutase (*pgm*, Patente Internacional 03/04598), gene de frutose bifosfato aldolase (*fbp*, Patente Internacional 03/04664), gene de piruvato quinase (*pykF*, Patente Internacional 03/008609), gene de transaldolase (*talB*, Patente Internacional 03/008611), gene de fumarase (*fum*, Patente Internacional 01/02545), gene de fosfoenolpiruvato sintase (*pps*, Patente Européia Não-examinada No. 877090), gene de absorção de sacarose não PTS (*csc*, Patente Européia Não-examinada No. 149911), e gene de assimilação de sacarose (operon *scrAB*, Patente Internacional 90/04636).

Exemplos dos genes codificando enzimas envolvidas em metabolismo energético incluem o gene de transidrogenase (*pntAB*, Patente U.S. No. 5.830.716) e gene de citocromo tipo bo oxidase (*cyoB*, Patente Européia No. 1070376).

25 Métodos para conceder capacidade de produzir ácido nucleico a um microorganismo e bactérias produtoras de ácidos nucleicos serão exemplificados abaixo.

Uma bactéria tendo uma capacidade de produzir um ácido nucleico pode ser obtida fornecendo, por exemplo, auxotrofia para

nucleosídeo de purina ou resistência a uma droga tal como análogo de purina a tais bactérias como descrito acima (Publicação de Patente Japonesa Nos. 38-23099, 54-17033, 55-45199, 57-14160, 57-41915 e 59-42895). Por exemplo, uma bactéria *Bacillus* tendo auxotrofia ou resistência a droga pode ser obtida tratando a bactéria com mutagênico que é usado para tratamento de mutagênese comum tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) ou EMS (etil metanossulfonato).

Exemplos de bactérias *Bacillus* que produzem um nucleosídeo de purina incluem os seguintes.

Como um exemplo específico de cepa produtora de inosina pertencendo ao gênero *Bacillus*, a cepa KMBS16 de *Bacillus subtilis* pode ser usada. Esta cepa é derivada da cepa trpC2 de *Bacillus subtilis* conhecida (168 Marburg), caracterizada pelo fato de que o gene *purR* codificando o repressor de operon de purina (*purR::spc*), o gene *purA* codificando succinil-AMP sintase (*purA::erm*), e o gene *deoD* codificando nucleosídeo de purina fosforilase (*deoD::kan*) são rompidos (Patente Japonesa Não-examinada No. 2004-242610, Pedido Publicado de Patente U.S. No. 2004166575 A1). A cepa AJ3772 de *Bacillus subtilis* (FERM P-2555, Patente Japonesa Não-examinada No. 62-014794) e assim por diante também podem ser usadas.

Exemplos de bactérias *Bacillus* tendo uma capacidade de produzir guanosina incluem a bactéria *Bacillus* que tem atividade aumentada de IMP desidrogenase (Patente Japonesa Não-examinada No. 3-58787), bactéria *Bacillus* que é obtida introduzindo um vetor compreendendo um gene conferindo resistência a análogo de purina ou decoinina em um mutante auxotrófico de adenina (Publicação de Patente Japonesa No. 4-28357), e assim por diante.

Exemplos de bactérias *Bacillus* que produzem um nucleotídeo de purina incluem os seguintes.

Como bactérias *Bacillus* produtoras de ácido inosínico, cepas

produtoras de inosina de *Bacillus subtilis* que têm atividade de fosfatase atenuada foram relatadas (Uchida, K. et al., Agr. Biol. Chem., 1961, 25, 804-805; Fujimoto, M., Uchida, K., Agr. Biol. Chem., 1965, 29, 249-259). Exemplos de bactérias produtoras de ácido guanílico incluem mutantes de
5 bactérias *Bacillus* que têm auxotrofia para adenina, resistência para decoinina ou sulfóxido de metionina e uma capacidade de produzir 5'-ácido guanílico (guanosina-5'-monofosfato, de agora em diante referido como "GMP") (Publicação de Patente Japonesa No. 56-12438).

Além disso, uma bactéria produtora de ácido xantílico pode ser
10 construída pelo método usado para melhoramento de bactérias corineformes cujo exemplo típico é *Corynebacterium ammoniagenes*. Por exemplo, obtendo uma cepa melhorada com PRPP amidotransferase (Patente Japonesa Não-examinada No. 8-168383), uma cepa resistente a aminoácido alifático (Patente Japonesa Não-examinada No. 4-262790), ou uma cepa resistente a
15 dehidroprolina (Publicação de Patente Sul Coreana Não-examinada No. 2003-56490), uma bactéria produtora de ácido xantílico pode ser construída.

Além disso, exemplos de um método para melhorar bactérias *Bacillus* que têm uma capacidade de produzir uma substância derivada de purina também incluem aumentar atividade de uma enzima que está envolvida
20 em biossíntese de purina que é comum à biossíntese de nucleosídeos de purina e nucleotídeos de purina, i.e., biossíntese de enzima purina, em células bacterianas. A atividade da enzima nas células é preferivelmente aumentada para um nível maior do que aquele de uma cepa não modificada de bactéria *Bacillus*, por exemplo, uma bactéria *Bacillus* tipo selvagem. A frase
25 "atividade é aumentada" abrange, por exemplo, quando número de moléculas de enzima por célula é aumentado, e quando atividade específica por molécula de enzima é aumentada, e assim por diante. Por exemplo, a atividade pode ser aumentada aumentando quantidade de expressão do gene da enzima. Exemplos da enzima envolvida na biossíntese de purina incluem,

por exemplo, fosforribosil pirofosfato amidotransferase, fosforribosil pirofosfato sintetase (PRPP sintetase [EC: 2.7.6.1]), e assim por diante.

Alguns dos catabólitos produzidos por metabolismo de fontes de açúcar tal como glicose que corre na via de pentose fosfato são convertidos em ribose-5-fosfato através de ribulose-5-fosfato. A partir da ribose-5-fosfato biossintetizada, fosforribosil pirofosfato (PRPP) é produzido, o qual é um precursor indispensável para biossínteses de nucleosídeo de purina, histidina e triptofano. Especificamente, ribose-5-fosfato é convertida em PRPP por fosforribosil pirofosfato sintetase. Portanto, uma capacidade de produzir substância derivada de purina pode ser fornecida a uma bactéria *Bacillus* modificando-a de forma que a atividade de fosforribosil pirofosfato sintetase desta é aumentada.

A frase "atividade de fosforribosil pirofosfato sintetase é aumentada" significa que a atividade de fosforribosil pirofosfato sintetase aumenta se comparada com aquela de uma cepa não modificada tal como uma cepa selvagem ou uma cepa parental. A atividade da fosforribosil pirofosfato sintetase pode ser medida, por exemplo, pelo método de Switzer et al. (Methods Enzymol., 1978, 51, 3-11) ou Roth et al. (Methods Enzymol., 1978, 51, 12-17). Uma bactéria *Bacillus* na qual a atividade de fosforribosil pirofosfato sintetase é aumentada pode ser produzida, por exemplo, aumentando expressão de um gene codificando a fosforribosil pirofosfato sintetase em uma bactéria *Bacillus* de acordo com um método de usar um plasmídeo ou integrando o gene em um cromossomo, o que pode ser realizado da mesma maneira que aquela do método descrito em Patente Japonesa Não-examinada No. 2004-242610.

Por outro lado, quando PRPP que é um precursor indispensável para biossínteses de nucleosídeo de purina, histidina e triptofano já está produzido, parte dele é convertido em nucleotídeos de purina e nucleosídeos de purina pelas enzimas envolvidas na biossíntese de

purina. Exemplos de genes codificando tais enzimas incluem os genes do operon de purina de *Bacillus subtilis*, especificamente, genes do operon *purEKB-purC(orf)QLF-purMNH(J)-purD* (Ebbole D.J. and Zalkin H., J. Biol. Chem., 1987, 262, 17, 8274-87) (atualmente, também chamado purEKBCSQLFMNHD, *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives, Editor in Chief: A.L. Sonenshein, ASM Press, Washington D.C., 2002, No. de Acesso de GenBank NC_000964), e os genes do regulon *pur* de *Escherichia coli* (*Escherichia* and *Salmonella*, Second Edition, Editor in Chief: F.C. Neidhardt, ASM Press, Washington D.C., 1996).

10 Por conseguinte, acentuando expressão destes genes, uma capacidade de produzir uma substância derivada de purina pode ser fornecida ou melhorada. Em adição, genes do operon de purina que podem ser usados para a presente invenção não são limitados a estes, e genes derivados de outros microorganismos, animais e plantas também podem ser usados.

15 Exemplos do método para aumentar expressão do operon de purina incluem aumentar expressão de genes do operon de purina em uma bactéria *Bacillus* por um método de usar um plasmídeo ou integrando os genes em um cromossomo ou os semelhantes.

20 O segundo método para aumentar expressão do operon de purina inclui substituir um promotor nativo do operon de purina por um promotor mais forte, e substituir a região -35 ou -10 do promotor nativo por uma sequência consenso.

25 Por exemplo, em *Bacillus subtilis* (cepa 168 Marburg de *B. subtilis*, ATCC 6051), a sequência -35 do operon de purina é uma sequência consenso (TTGACA), mas a sequência -10 é TAAGAT, que difere da sequência consenso TATAAT (Ebbole, D.J. e H. Zalikn, J. Biol. Chem., 1987, 262, 8274-8287). Portanto, substituindo a sequência -10 (TAAGAT) por uma sequência consenso, aproximando a sequência -10 (TAAGAT) da sequência consenso, ou mudando-a para TATAAT, TATGAT ou TAAAAT, a

atividade transcricional do operon de purina pode ser aumentada. Uma sequência de promotor pode ser substituída pelo mesmo método que aquele da substituição gênica, que é descrito abaixo.

O terceiro método para aumentar expressão do operon de purina inclui diminuir expressão do repressor de operon de purina (Patente U.S. No. 6.284.495). A frase "expressão de um repressor de operon de purina" inclui tanto transcrição de um gene de operon de purina como tradução de um produto de transcrição. Além disso, "diminuir expressão" inclui diminuir a expressão para ser menor do que aquela em uma cepa não modificada tal como uma bactéria *Bacillus* tipo selvagem, e substancialmente eliminar a expressão.

Expressão do repressor de operon de purina (repressor de purina) pode ser diminuída, por exemplo, tratando uma bactéria *Bacillus* com radiação de raio ultravioleta ou mutagênico usado em um tratamento de mutagênese comum tal como NTG ou EMS e selecionando um mutante mostrando expressão diminuída do repressor de purina pode ser empregado.

Além disso, uma bactéria *Bacillus* com expressão diminuída do repressor de purina também pode ser obtida, por exemplo, além de um tratamento de mutagênese, substituindo um gene codificando o repressor de purina em um cromossomo (*purR*, Acesso de GenBank NC_000964, região de codificação corresponde aos nucleotídeos número 54439 a 55293) por um gene correspondente que não funciona normalmente (a seguir, também referido como "gene tipo rompido") por recombinação homóloga utilizando uma técnica de recombinação gênica (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1972); Matsuyama, S. e Mizushima, S., J. Bacteriol., 1985, 162, 1196-1202).

Além disso, uma capacidade de produzir uma substância derivada de purina também pode ser melhorada atenuando absorção de substâncias derivadas de purina em células. Por exemplo, a absorção de

nucleosídeos de purina pelas células pode ser atenuada bloqueando uma reação envolvida na absorção de nucleosídeos de purina pelas células. Exemplos da reação envolvida na absorção de nucleosídeos de purina pelas células incluem reações catalisadas por permeases de nucleosídeos.

5 Além disso, quando um nucleosídeo de purina é produzido, atividade de uma enzima que decompõe o nucleosídeo de purina pode ser diminuída a fim de melhorar a capacidade de produzir nucleosídeo de purina. Exemplos de uma tal enzima incluem fosforilase de nucleosídeo de purina.

10 Nucleotídeos de purina biossintetizados a partir de PRPP por enzimas envolvidas em biossíntese de purina são desfosforilados e com isso convertidos em um nucleosídeo de purina. Para causar eficientemente acumulação de um nucleosídeo de purina, é preferível reduzir uma atividade de fosforilases de nucleosídeo de purina, que adicionalmente degradam nucleosídeos de purina em hipoxantina ou os semelhantes. Isto é, é preferível
15 atenuar ou eliminar uma atividade de um nucleosídeo de purina fosforilase que emprega nucleosídeos de purina tal como inosina, como um substrato.

 Especificamente, a atividade de fosforilase de nucleosídeo de purina pode ser diminuída rompendo os genes *deoD* e *pupG* codificando fosforilase de nucleosídeo de purina em bactérias *Bacillus*. A bactéria
20 *Bacillus* da presente invenção pode ser modificada rompendo um ou ambos os genes *deoD* e *pupG*. Como os genes *deoD* e *pupG*, por exemplo, aqueles genes derivados de bactérias *Bacillus* (*deoD*; No. de Acesso de GenBank NC_000964, região de codificação: 2134672-2135370), *pupG*; No. de Acesso de GenBank NC_000964, região de codificação: 2445610-2446422) podem
25 ser usados.

 A capacidade de produzir uma substância derivada de purina também pode ser melhorada diminuindo a atividade de succinil-AMP sintase. Exemplos do gene codificando succinil-AMP sintase incluem o gene *purA*. Exemplos do gene *purA* incluem, por exemplo, aqueles tendo a sequência de

nucleotídeos registrada como No. de Acesso de GenBank NC_000964 (região de codificação corresponde aos nucleotídeos número 4153460 a 4155749 da fita complementar).

5 A capacidade de produzir uma substância derivada de purina também pode ser melhorada diminuindo uma atividade de inosina monofosfato (IMP) desidrogenase. Exemplos do gene codificando IMP desidrogenase incluem o gene *guaB*. Exemplos do gene *guaB* incluem, por exemplo, aqueles tendo a sequência de nucleotídeos registrada como No. de Acesso de GenBank NC_000964 (região de codificação corresponde aos
10 nucleotídeos número 15913 a 17376).

Além disso, como um método para melhorar uma capacidade de produzir substância derivada de purina, amplificação de um gene codificando uma proteína tendo uma atividade de excretar uma substância derivada de purina pode ser contemplada. Um exemplo de uma bactéria na
15 qual um tal gene foi amplificado é uma bactéria *Bacillus* na qual o gene *rhtA* é amplificado (Patente Japonesa Não-examinada No. 2003-219876).

Quando as bactérias produtoras de L-aminoácido mencionadas acima são melhoradas por recombinação gênica, os genes a serem usados não são limitados a genes tendo a informação genética mencionada acima ou
20 genes tendo sequências conhecidas, mas também incluem genes tendo mutações conservativas, tal como genes homólogos ou artificialmente modificados, também podem ser usados contanto que as funções das proteínas codificadas não sejam degradadas. Isto é, eles podem ser genes codificando uma sequência de aminoácidos conhecida contendo uma ou mais
25 substituições, deleções, inserções, adições ou os semelhantes de um ou diversos resíduos de aminoácidos em uma ou diversas posições.

Embora o número do(s) “um ou diversos” resíduos de aminoácidos referidos neste lugar possam diferir dependendo da posição na estrutura tridimensional ou dos tipos de resíduos de aminoácidos da proteína,

especificamente, ele pode ser preferivelmente 1 a 20, mais preferivelmente 1 a 10, ainda mais preferivelmente 1 a 5. A mutação conservativa é uma mutação caracterizado pelo fato de que substituição ocorre mutuamente entre Phe, Trp, e Tyr, se o sítio de substituição é um aminoácido aromático; entre Leu, Ile e Val, se ele é um aminoácido hidrofóbico; entre Gln e Asn, se ele é um aminoácido polar; entre Lys, Arg e His, se ele é um aminoácido básico; entre Asp e Glu, se ele é um aminoácido ácido; e entre Ser e Thr, se ele é um aminoácido tendo um grupo hidroxila. Exemplos típicos de uma mutação conservativa são substituições conservativas, e substituições consideradas substituições conservativas incluem, especificamente, substituição de Ser ou Thr por Ala, substituição de Gln, His ou Lys por Arg, substituição de Glu, Gln, Lys, His ou Asp por Asn, substituição de Asn, Glu ou Gln por Asp, substituição de Ser ou Ala por Cys, substituição de Asn, Glu, Lys, His, Asp ou Arg por Gln, substituição de Gly, Asn, Gln, Lys ou Asp por Glu, substituição de Pro por Gly, substituição de Asn, Lys, Gln, Arg ou Tyr por His, substituição de Leu, Met, Val ou Phe por Ile, substituição de Ile, Met, Val ou Phe por Leu, substituição de Asn, Glu, Gln, His ou Arg por Lys, substituição de Ile, Leu, Val ou Phe por Met, substituição de Trp, Tyr, Met, Ile ou Leu por Phe, substituição de Thr ou Ala por Ser, substituição de Ser ou Ala por Thr, substituição de Phe ou Tyr por Trp, substituição de His, Phe ou Trp por Tyr, e substituição de Met, Ile ou Leu por Val. As substituições, deleções, inserções, adições, inversões de aminoácidos mencionadas acima ou as semelhantes podem resultar de uma mutação naturalmente ocorrente ou uma variação devido a uma diferença individual ou diferença de espécie de um microorganismo do qual os genes são derivados. Tais genes podem ser obtidos, por exemplo, modificando uma seqüência de nucleotídeos conhecida de um gene por mutagênese sítio específica de forma que os resíduos de aminoácidos nos sítios específicos da proteína codificada incluem substituições, deleções, inserções, ou adições de resíduos de aminoácidos.

Além disso, tais genes tendo uma mutação conservativa como mencionado acima podem codificar uma proteína tendo uma homologia de 80% ou mais, preferivelmente 90% ou mais, mais preferivelmente 95% ou mais, particularmente preferivelmente 97% ou mais, com a seqüência de aminoácidos codificada inteira e tendo uma função equivalente àquela da proteína tipo selvagem.

Além disso, códons nas seqüências gênicas podem ser substituídos por outros códons que são facilmente usados no hospedeiro no qual os genes são introduzidos.

Os genes tendo mutação(mutações) conservativa(s) podem ser obtidos por métodos normalmente usados em tratamentos de mutagênese tal como tratamentos com agentes de mutagênese.

Além disso, os genes podem ser um DNA que pode hibridizar com uma seqüência complementar de uma seqüência gênica conhecida ou uma sonda que pode ser preparada a partir da seqüência complementar em condições estringentes e codifica uma proteína tendo uma função equivalente àquela do produto de gene conhecido. As “condições estringentes” referidas aqui são condições nas quais um assim chamado híbrido específico é formado, e um híbrido não específico não é formado. Exemplos das condições estringentes incluem aquelas nas quais DNAs altamente homólogos hibridizam uns com os outros, por exemplo, DNAs não menos do que 80% homólogos, preferivelmente não menos do que 90% homólogos, mais preferivelmente não menos do que 95% homólogos, particularmente preferivelmente não menos do que 97% homólogos, hibridizam uns com os outros, e DNAs menos homólogos do que os acima não hibridizam uns com os outros, ou condições de lavagem uma vez, preferivelmente 2 ou 3 vezes, em uma concentração salina e temperatura correspondentes a lavagem de hibridização Southern típica, i.e., 1 x SSC, 0,1% SDS a 60°C, preferivelmente 0,1 x SSC, 0,1% SDS a 60°C, mais preferivelmente 0,1 x SSC, 0,1% SDS a

68°C.

Como a sonda, uma parte da seqüência que é complementar ao gene também pode ser usada. Uma tal sonda pode ser preparada por PCR usando oligonucleotídeos preparados com base em uma seqüência gênica conhecida como iniciadores e um fragmento de DNA contendo a seqüência de nucleotídeos como um modelo. Por exemplo, quando um fragmento de DNA tendo um comprimento de cerca de 300 bp é usado como a sonda, as condições de lavagem de hibridização podem ser 50°C, 2 x SSC e 0,1% SDS.

Exemplos

Daqui por diante, a presente invenção será especificamente explicada com referência a exemplos. Entretanto, a presente invenção não é limitada aos exemplos seguintes.

Exemplo 1: Produção de L-triptofano

Como uma bactéria produtora de L-triptofano, *E. coli* No. 202 (se referir a Patente Internacional 2005/103275) foi usada. Esta cepa é um cepa obtida inserindo o gene de fosfoglicerato desidrogenase (*serA*, derivado do plasmídeo pGH5, se referir a Patente Internacional 94/08031) e o operon *trp* (derivado do plasmídeo pGX100) contendo um gene *trpE* tipo dessensibilizado (derivado de cepa MTR#2 de *E. coli*, se referir a Patente U.S. No. 4.371.614) no cromossomo de uma bactéria produtora de L-triptofano, a cepa SV164 (se referir a Patente Internacional 94/08031).

Um estoque de glicerol de *E. coli* No. 202 foi inoculado em meio LB-placa de agarose (1% de tripton, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de cloreto de sódio e 1,5% de agarose) em uma quantidade correspondendo a uma alça, e cultura estacionária foi realizada a 30°C por 24 horas.

10 µl do meio de cultura mencionado acima foi inoculado em 50 ml de meio LB (1% de tripton, 0,5% de extrato de levedura e 0,5% de cloreto de sódio) contido em um frasco Sakaguchi de 500 ml, e pré-cultura foi realizada a 30°C por 8 horas com agitação (114 rpm).

0,9 ml do meio de pré-cultura mencionado acima foi inoculado em 300 ml de um meio de pré-inóculo tendo a composição seguinte. Cultura foi realizada a 30°C por cerca de 14 horas usando um tanque de fermentação pequeno tendo um volume total de 1 L com uma densidade de potência de um impulsor de agitação de 4,4 kW/m³ e aeração de ar comprimido esterilizado com um filtro de esterilização a 1 vvm. Durante a cultura, temperatura foi mantida em 30°C, e pH foi mantido em 6,5 com gás amônia.

[Composição de meio de pré-inóculo]

	Glicose	10 g/L
10	KH ₂ PO ₄	1 g/L
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2,5 g/L
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g/L
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg/L
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	10 mg/L
15	Hidrolisado de soja	0,4 g/L
	L-Metionina	50 mg/L
	L-Fenilalanina	125 mg/L
	L-Tirosina	125 mg/L
	Vitamina B1	5 mg/L
20	Piridoxina	30 mg/L

Um meio de cultura principal tendo a composição seguinte foi preparado em um volume de 300 ml, e 30 ml do meio de pré-inóculo foi inoculado. A cultura principal foi realizada a 31°C usando um tanque de fermentação pequeno tendo um volume total de 1 L com agitação a 4,4 kW/m³ e aeração de ar comprimido esterilizado com um filtro de esterilização a 1 vvm. Durante a cultura, temperatura foi mantida em 31°C, e pH foi mantido em 6,7 com gás amônia. Durante a cultura, uma solução de 700 g/L de glicose foi apropriadamente alimentada para ajustar a concentração de sacarídeo no tanque de fermentação pequeno para ser 5 a 20 g/L. Depois de

23 horas da cultura, 10 g de cristais de L-triptofano (33 g/L) foram adicionados, e a cultura foi realizada em quatro tipos de condições da densidade de potência do impulsor de agitação, 2,4 kW/m³, 5,5 kW/m³, 15,5 kW/m³ e 19,9 kW/m³.

5	[Composição de meio de cultura principal]	
	Glicose	15 g/L
	KH ₂ PO ₄	1 g/L
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g/L
	Hidrolisado de soja	0,75 g/L
10	NaCl	0,5 g/L
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3 g/L
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	14,7 mg/L
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg/L
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	7,5 mg/L
15	L-Metionina	0,3 g/L
	L-Fenilalanina	1 g/L
	Vitamina B1	5 mg/L
	Piridoxina	36,5 mg/L
	NH ₄ Cl	3,13 g/L
20	KOH	1 g/L

Depois de 46 horas da cultura, concentração L-triptofano no meio foi medida, e taxa de produção foi calculada. Os resultados são mostrados em Fig. 2. Embora a cultura não tenha sido realizada em uma densidade de potência de 0, a plotagem também foi realizada para densidade de potência de 0 em Fig. 2 a fim de criar uma curva aproximada. A taxa de produção foi representada com valores relativos baseados na taxa de produção obtida com uma densidade de potência com agitação de 15,5 kW/m³, que foi adotada como 1.

Exemplo de Referência 1: Construção de bactéria produtora de

ácido L-glutâmico

O iniciador 1 (SEQ ID NO: 1) e o iniciador 2 (SEQ ID NO: 2) para amplificar uma parte do plasmídeo RSFCPG (Patente Européia Não-examinada No. 1233068) que contém os genes *gltA*, *ppc* e *gdhA* derivados de *Escherichia coli* foram desenhados para amplificar a outra parte do que a ORF de *gltA*. Usando estes iniciadores e RSFCPG como um modelo, PCR foi realizado para obter um fragmento de cerca de 14,9 kb. PCR também foi realizado usando o iniciador 3 (SEQ ID NO: 3), o iniciador 4 (SEQ ID NO: 4) e o DNA cromossômico da cepa W3110 de *E. coli* como um modelo para obter um fragmento de cerca de 1,2 kb contendo o gene de metilcitrato sintase (*prpC*). Ambos os produtos de PCR foram tratados com *Bgl*III e *Kpn*I, ligados, e então usados para transformar a cepa JM109 de *E. coli*. Todas as colônias que apareceram foram coletadas, e plasmídeos foram extraídos das células como uma mistura. A cepa ME8330 de *E. coli* como uma cepa deficiente em citrato sintase (CS) foi transformada com a mistura de plasmídeos, e a suspensão de células foi aplicada em um meio mínimo M9 (meio contendo 5 g de glicose, 2 mM sulfato de magnésio, 3 g de fosfato monopotássico, 0,5 g de cloreto de sódio, 1 g de cloreto de amônio e 6 g de fosfato dissódico em 1 L de água pura) contendo 50 mg/L de uracil e 5 mg/L de tiamina HCl. A partir das cepas emergidas, um plasmídeo foi extraído e designado RSFPPG. Este plasmídeo de produção de ácido L-glutâmico RSFPPG foi introduzido na cepa SC17sucA de *Pantoea ananatis* para construir uma cepa produtora de ácido L-glutâmico, SC17sucA/RSFPPG (esta cepa é referida como “cepa NA1”).

A cepa SC17sucA mencionada acima é uma cepa obtida obtendo uma cepa mutante de baixa produção de fleuma (SC17) a partir da cepa AJ13355, que foi isolada da natureza como uma cepa que pode se proliferar em um meio contendo ácido L-glutâmico e uma fonte de carbono em baixo pH, e rompendo o gene *sucA* da cepa mutante (Patente U.S. No.

6.596.517). A cepa SC17sucA foi designada com um número privado de AJ417, depositada no National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of Economy, Trade and Industry (atualmente National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japão, código postal: 305-8566) em 26 de Fevereiro de 2004, e determinado um número de acesso de FERM BP-08646.

Exemplo 2: Produção de ácido L-glutâmico

Um estoque de glicerol da bactéria produtora de ácido glutâmico, *Pantoea ananatis* NA1, foi inoculado em meio LBGM9-placa de agarose (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1,05% de cloreto de sódio, 0,5% de glicose, 0,05% de sulfato de magnésio 7 hidrato, 1,72% de hidrogenofosfato dissódico 12 hidrato, 0,3% de dihidrogenofosfato de potássio, 0,1% de cloreto de amônio, 2% de agarose, 25 mg/L de cloridrato de tetraciclina) em uma quantidade correspondendo a uma alça, e cultura estacionária foi realizada a 34°C por 24 horas.

As células bacterianas pré-cultivadas acima correspondendo a uma placa de cultura foram inoculadas em 300 ml de um meio tendo a composição seguinte. Cultura foi realizada usando um tanque de fermentação pequeno tendo um volume total de 1 L com uma densidade de potência de um impulsor de agitação de 3,3 kW/m³ e aeração de ar comprimido esterilizado com um filtro de esterilização a 1 vvm. Durante a cultura, temperatura foi mantida em 34°C, e pH foi mantido em 4,7 com gás amônia. Depois de 20 horas da cultura, uma solução de 700 g/L de sacarose foi apropriadamente alimentada para ajustar a concentração de sacarídeo no tanque de fermentação pequeno para ser 5 a 20 g/L. Depois de 20 horas da cultura, 20 g de α -cristais de ácido L-glutâmico foram adicionados, e a cultura foi realizada em três tipos de condições da densidade de potência do impulsor de agitação, 2,4

kW/m³, 15,5 kW/m³ e 19,9 kW/m³.

[Composição de meio]

	Sacarose	100 g/L
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,4 g/L
5	(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g/L
	KH ₂ PO ₄	6 g/L
	Extrato de levedura	6 g/L
	NaCl	1,5 g/L
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	20 mg/L
10	MnSO ₄ ·4H ₂ O	20 mg/L
	Cloridrato de L-lisina	0,6 g/L
	DL-Metionina	0,6 g/L
	Ácido diaminopimélico	0,6 g/L
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,64 mg/L
15	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,72 mg/L
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,64 mg/L
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,72 mg/L
	H ₃ BO ₃	0,4 mg/L
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1,2 mg/L
20	Cloridrato de tetraciclina	25 mg/L

Depois de 49 horas da cultura, concentração de ácido L-glutâmico no meio foi medida, e taxa de produção foi calculada. Os resultados são mostrados em Fig. 3. A taxa de produção foi representada com valores relativos baseados na taxa de produção obtida com uma densidade de potência com agitação de 15,5 kW/m₃, que foi adotada como 1.

Exemplo 3: Produção de L-treonina

Como uma bactéria produtora de L-treonina, *E. coli* VKPM B-5318 (Patente Européia Não-examinada No. 0593792) foi usada.

Um estoque de glicerol de *E. coli* VKPM B-5318 foi inoculado

em meio LB-placa de agarose (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de cloreto de sódio, 1,5% de agarose, 100 mg/L de sulfato de tetraciclina) em uma quantidade correspondendo a uma alça, e cultura estacionária foi realizada a 37°C por 24 horas.

5 O meio de cultura mencionado acima foi inoculado em uma quantidade correspondendo a 1/10 da placa para 50 ml de meio LB (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de cloreto de sódio, 25 mg/L de sulfato de canamicina e 20 mg/L de sulfato de estreptomicina) contido em um frasco Sakaguchi de 500 ml, e pré-cultura foi realizada a 40°C por 4 horas
10 com agitação (114 rpm).

Um meio de cultura principal tendo a composição seguinte foi preparado em um volume de 300 ml, e 30 ml do meio de pré-inóculo foi inoculado. A cultura principal foi realizada a 40°C usando um tanque de fermentação pequeno tendo um volume total de 1 L com agitação a 5,5
15 kW/m³ e aeração de ar comprimido esterilizado com um filtro de esterilização a 1 vvm. Durante a cultura, temperatura foi mantida em 40°C, e pH foi mantido em 7,0 com gás amônia. Durante a cultura, uma solução de 700 g/L de sacarose foi apropriadamente alimentada para ajustar a concentração de sacarídeo no tanque de fermentação pequeno para ser 5 a 20 g/L. Depois de
20 21 horas da cultura, 24 g de cristais de L-treonina (70 g/L) foram adicionados, e a cultura foi realizada em três tipos de condições da densidade de potência do impulsor de agitação, 2,4 kW/m³, 5,5 kW/m³ e 13,5 kW/m³.

[Composição de meio de cultura principal]

	Sacarose	40 g/L
25	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,36 g/L
	(NH ₄) ₂ SO ₄	4,5 g/L
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	18 mg/L
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	18 mg/L
	K ₂ HPO ₄	1,5 g/L

NaCl	0,6 g/L
Extrato de levedura	1,8 g/L
Sulfato de canamicina	25 mg/L
Sulfato de estreptomicina	25 mg/L

5 Depois de 45 horas da cultura, concentração de L-treonina no meio foi medida, e taxa de produção foi calculada. Os resultados são mostrados em Fig. 4. A taxa de produção foi representada com valores relativos baseados na taxa de produção obtida com uma densidade de potência com agitação de 5,5 kW/m³, que foi adotada como 1.

10 Exemplo 4: Produção de L-fenilalanina

 Como uma bactéria produtora de L-fenilalanina, cepa AJ12741 de *E. coli* (Patente Japonesa No. 3225597, de agora em diante também referida como "cepa R/GAL") é usada. Esta cepa é um cepa obtida introduzindo o gene *aroG4* codificando para 3-deoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato sintase
15 dessensibilizada para inibição por retroalimentação, gene *pheA* codificando para corismato mutase/prefenato desidratase e gene *aroL* codificando para chiquimato quinase na cepa K-12 W3110 de *Escherichia coli* deficientes nos genes *tyrR* e *tyrA*. Esta cepa foi depositada na agência administrativa independente, National Institute of Advanced Industrial Science and
20 Technology, International Patent Organism Depositary (Endereço: Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japão) em 11 de Junho de 1992 e determinado um número de acesso de FERM P-13000. Então, o depósito foi convertido em um depósito internacional sujeito a disposições do Tratado de Budapeste em 14 de Setembro de 1994, e um
25 número de acesso de FERM BP-4796 foi designado.

 Um estoque de glicerol da cepa AJ12741 é inoculado em meio LBG-placa de agarose (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de cloreto de sódio e 1,5% de agarose) em uma quantidade correspondendo a uma alça, e cultura estacionária é realizada a 35°C por 24 horas.

As células bacterianas cultivadas mencionadas acima correspondendo a uma placa de cultura foram inoculadas em 300 mL de um meio tendo a composição seguinte. Cultura foi realizada por cerca de 16 horas usando um tanque de fermentação pequeno tendo um volume total de 1 L com
 5 agitação em uma densidade de potência de um impulsor de agitação de 3,3 kW/m³ e aeração de ar comprimido esterilizado com um filtro de esterilização a 1 vvm. Durante a cultura, temperatura é mantida em 35°C, e pH é mantido em 6,5 com gás amônia.

[Composição de meio de pré-inóculo]

10	Glicose	40 g/L
	MgSO ₄	1 g/L
	(NH ₄) ₂ SO ₄	16 g/L
	KH ₂ PO ₄	1 g/L
	Extrato de levedura	2 g/L
15	FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg/L
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	8 mg/L
	L-Tirosina	1 g/L
	Ampicilina sódica	100 mg/L

Um meio de cultura principal tendo a composição seguinte é
 20 preparado em um volume de 300 ml, e 30 ml do meio de pré-inóculo é inoculado. A cultura principal é realizada a 35°C usando um tanque de fermentação pequeno tendo um volume total de 1 L com agitação em uma densidade de potência do impulsor de agitação de 3,3 kW/m³ e aeração de ar comprimido esterilizado com um filtro de esterilização a 1 vvm. Durante a
 25 cultura, temperatura é mantida em 35°C, e pH foi mantido em 6,5 com gás amônia. Durante a cultura, uma solução de 500 g/L de glicose é apropriadamente alimentada para ajustar a concentração de sacarídeo no tanque de fermentação pequeno para ser 5 a 20 g/L. Além disso, depois de 24 horas da cultura, 20 g de cristais de L-fenilalanina são adicionados, e a cultura

é realizada em quatro tipos de condições da densidade de potência do impulsor de agitação, 5,5 kW/m³, 15,5 kW/m³ e 19,9 kW/m³, e uma densidade de potência controlada para ser 2,4 kW/m³ ou menor.

[Composição de meio de cultura principal]

5	Glicose	40 g/L
	MgSO ₄	1 g/L
	(NH ₄) ₂ SO ₄	16 g/L
	KH ₂ PO ₄	2 g/L
	Extrato de levedura	8 g/L
10	FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg/L
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	8 mg/L
	L-Tirosina	1,4 g/L
	Ampicilina sódica	100 mg/L

Exemplo 5: Produção de inosina e/ou guanosina

15 Um estoque de glicerol da cepa AJ1991 de *Bacillus amyloliquefaciens* (VKPM B-8994, se referir a Patente U.S. No. 3.575.809), que produz inosina e guanosina, é inoculado em meio LBG-placa de agarose (1% de tripton, 0,5% de extrato de levedura, 1% de cloreto de sódio e 1,5% de agarose) em uma quantidade correspondendo a uma alça, e cultura
20 estacionária é realizada a 34°C por 24 horas. A cepa AJ1991 também foi designada cepa G1136A, depositada em 10 de Março de 2005 na Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM), GNII Genetika (Rússia, 117545 Moscou, 1st Dorozhny proezd, 1), e designada com um número de acesso VKPM B-8994. O depósito foi então convertido para um
25 depósito internacional em 13 de Outubro de 2006.

As células pré-cultivadas da bactéria mencionada acima são inoculadas em uma quantidade correspondendo a uma alça de platina em 50 ml de um meio tendo a composição seguinte contido em um frasco Sakaguchi de 500 ml, e pré-cultura é realizada a 34°C por 16 horas com agitação (115

rpm).

[Composição de meio de pré-inóculo]

	Glicose	30 g/L
	NH ₄ Cl	3 g/L
5	KH ₂ PO ₄	0,5 g/L
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,4 g/L
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg/L
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	10 mg/L
	Hidrolisado de soja	1,2 g/L
10	Extrato de levedura	0,5 g/L
	Ácido ribonucleico	5 g/L

Um meio de cultura principal tendo a composição seguinte foi preparado em um volume de 300 ml, e 15 ml do meio de pré-inóculo foi inoculado. A cultura principal foi realizada a 34°C usando um tanque de fermentação pequeno tendo um volume total de 1 L com agitação em uma densidade de potência do impulsor de agitação de 3,3 kW/m³ e aeração de ar comprimido esterilizado com um filtro de esterilização a 1 vvm. Durante a cultura, temperatura foi mantida em 34°C, e pH foi mantido em 6,5 com gás amônia. Durante a cultura, uma solução de 500 g/L de glicose foi apropriadamente alimentada para ajustar a concentração de sacarídeo no tanque de fermentação pequeno para ser 5 a 20 g/L. Depois de 24 horas da cultura, 0,8 g de cristais de guanosina são adicionados, e a cultura é realizada em quatro tipos de condições da densidade de potência do impulsor de agitação, 5,5 kW/m³, 15,5 kW/m³ e 19,9 kW/m³, e uma densidade de potência controlada para ser 2,4 kW/m³ ou menor.

[Composição de meio de cultura principal]

Glicose	200 g/L
NH ₄ Cl	2,5 g/L
KH ₂ PO ₄	1,3 g/L

	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,5 g/L
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg/L
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	10 mg/L
	Hidrolisado de soja	1,3 g/L
5	Ácido ribonucleico	1,24 g/L
	KCl	15 g/L
	DL-Metionina	50 mg/L

Aplicabilidade Industrial

De acordo com a presente invenção, em um método para
10 produzir um L-aminoácido ou um ácido nucleico por fermentação usando um
microorganismo tendo uma capacidade de produzir L-aminoácido ou ácido
nucleico, se torna possível melhorar produtividade do L-aminoácido ou ácido
nucleico. A melhora de produtividade de L-aminoácido ou ácido nucleico
inclui melhora em produção baseada em sacarídeo e/ou melhora em taxa de
15 produção.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir um L-aminoácido ou um ácido nucléico, caracterizado pelo fato de ser pelo cultivo de um microorganismo tendo uma capacidade de produzir o L-aminoácido ou ácido nucleico em um meio líquido contido em um tanque de fermentação provido com um impulsor de agitação opcionalmente adicionando cristais de semente ao meio se requerido para produzir e acumular cristais do L-aminoácido ou ácido nucleico no meio, e coletar cristais do L-aminoácido ou ácido nucleico de cultura, em que densidade de potência do impulsor de agitação é controlada para ser 2,4 kW/m³ ou menor depois de precipitação dos cristais ou adição dos cristais de semente.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que densidade de potência do impulsor de agitação é controlada para ser 0,5 kW/m³ ou maior depois de precipitação dos cristais ou adição dos cristais de semente.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que cultura é realizada com controle de densidade de potência do impulsor de agitação para ser 3,0 kW/m³ ou maior antes de precipitação dos cristais ou adição dos cristais de semente.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o microorganismo é um microorganismo pertencendo à família *Enterobacteriaceae*.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o microorganismo é uma bactéria corineforme ou uma bactéria *Bacillus*.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o L-aminoácido consiste de um ou mais tipos de L-aminoácidos selecionados a partir de L-triptofano, L-fenilalanina, L-tirosina, L-isoleucina, L-valina, L-leucina, ácido L-glutâmico, L-glutamina,

L-treonina, L-cisteína, L-cistina e derivados destes.

5 7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o ácido nucleico consiste de um ou mais tipos de ácidos nucleicos selecionados a partir de inosina, adenosina, guanosina, xantosina, ácido inosínico, ácido adenílico, ácido guanílico, ácido xantílico e derivados destes.

FIG. 1

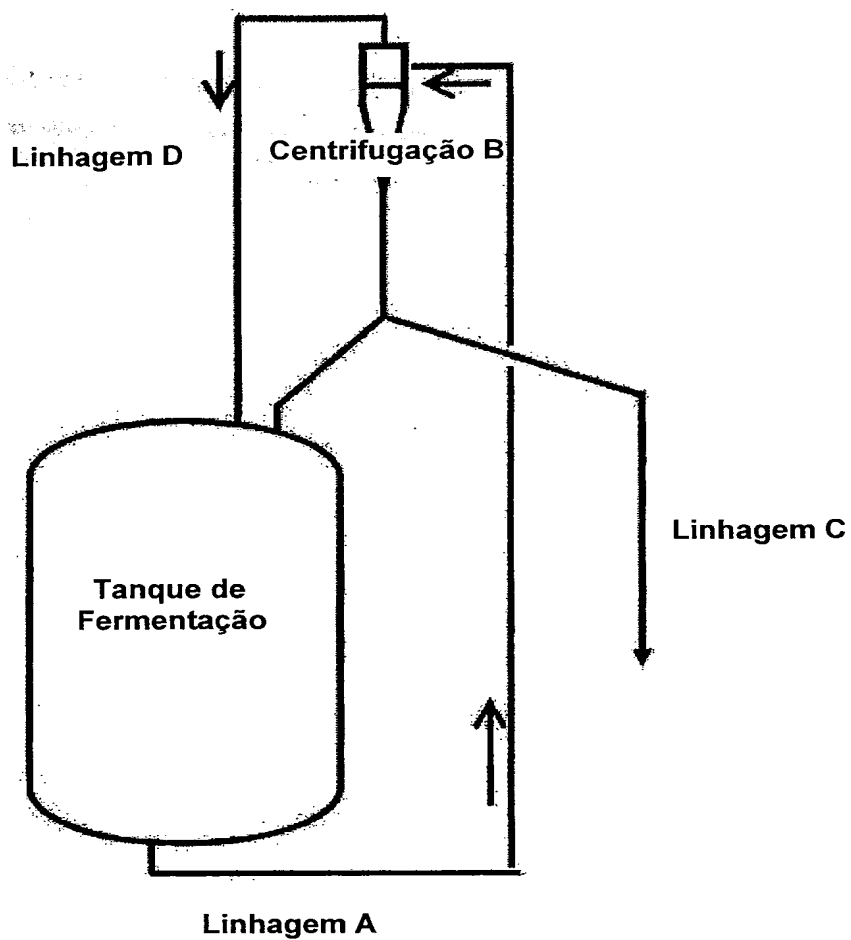


FIG. 2

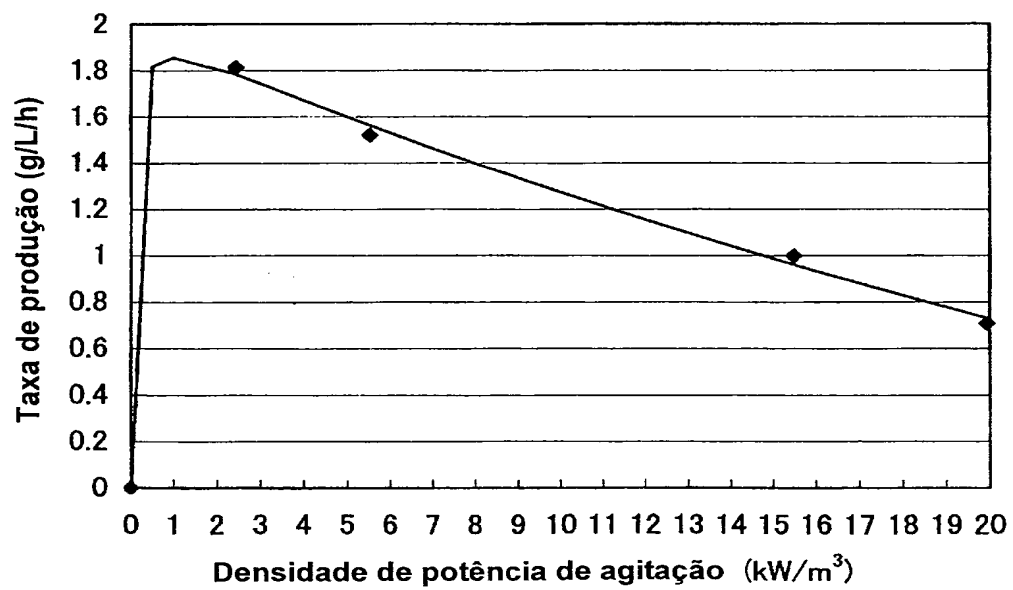


FIG. 2

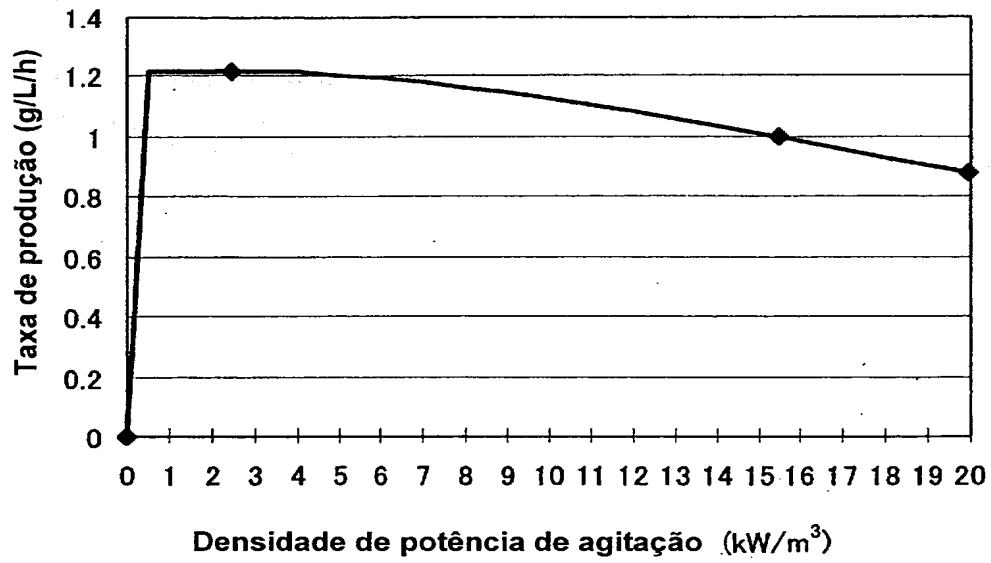
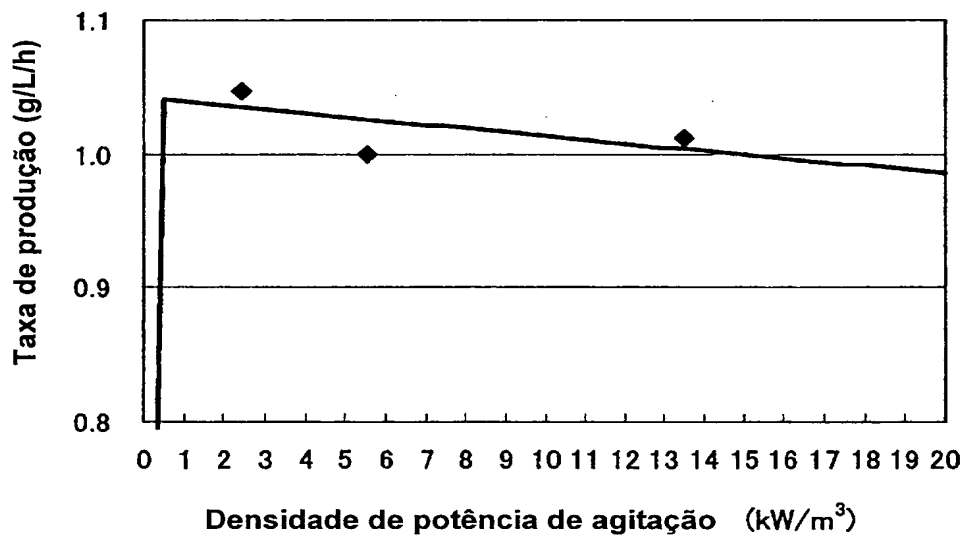
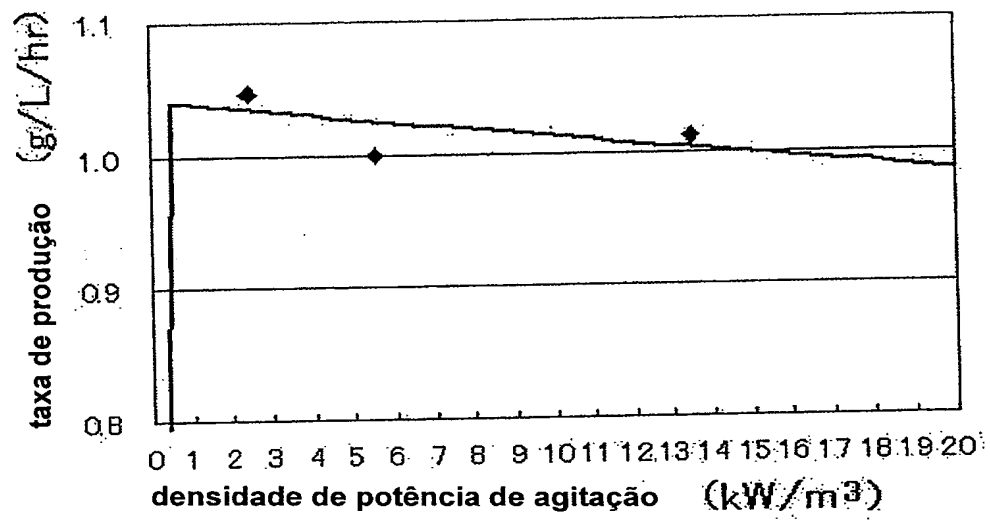


FIG. 4





RESUMO**“MÉTODO PARA PRODUZIR UM L-AMINOÁCIDO OU UM ÁCIDO NUCLEÍCO”**

É descrito um método para produzir um L-aminoácido ou um
5 ácido nucleico, que compreende as etapas de cultivar um microorganismo
capaz de produzir o L-aminoácido ou o ácido nucleico em um meio de cultura
líquido em um tanque de fermentação equipado com um impulsor de agitação
e opcionalmente adicionando uma semente de cristalização ao meio de cultura
para produzir e acumular um cristal do L-aminoácido ou do ácido nucleico no
10 meio de cultura, e coletar o cristal do L-aminoácido ou do ácido nucleico da
cultura, caracterizado pelo fato de que a densidade de potência do impulsor de
agitação é ajustada para $2,4 \text{ kW/m}^3$ ou menor depois que o cristal é
precipitado ou depois que a semente de cristalização é adicionada.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Ajinomoto Co., Inc.
<120> Método para Produzir L-Aminoácido ou Ácido Nucleico
<130> C877-C7307
<150> JP2007-039843
<151> 2007-02-20
<160> 4
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> iniciador 1
<400> 1
ggaagatcta ttgaccttcg cacatcaacc tgg 33

<210> 2
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> iniciador 2
<400> 2
cggggtacct tgtaaattatt ttaacccgcc 30

<210> 3
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> iniciador 3
<400> 3
ggaagatcta aggagacctt aaatgagcga cacaacgata ctgcaaaaca gtaccc 56

<210> 4
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
<223> iniciador 4
<400> 4
cggggtacct cgtagagggt tactggcgct tatccagcg 39