

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

(21) **PI0707674-6 A2**

(22) Data de Depósito: 23/02/2007
(43) Data da Publicação: 10/05/2011
(RPI 2105)



(51) Int.Cl.:
C12N 1/21
C12N 15/09
C12P 7/46

(54) Título: **BACTÉRIA CAPAZ DE PRODUZIR ÁCIDO ORGÂNICO E PROCESSO PARA PRODUÇÃO DO MESMO**

(30) Prioridade Unionista: 24/02/2006 JP 2006-048060

(73) Titular(es): Ajinomoto CO, INC., Mitsubishi Chemical Corporation

(72) Inventor(es): Akiko Sakamoto , Chie Koseki, Hloruki Kojima , Jun Nakamura , Keita Fukui , Kenji Yamagashi, Madoka Yonekura , Makoto Murase, Ryusuke Aoyama, Sanae Sato , Shuichi Yonomura

(74) Procurador(es): Mirian Oliveira da Rocha Pitta

(86) Pedido Internacional: PCT JP2007053360 de 23/02/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/099867 de 07/09/2007

(57) Resumo: BACTÉRIA CAPAZ DE PRODUZIR ÁCIDO ORGÂNICO E PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DO MESMO - Provê-se uma bactéria que é capaz de produzir um ácido orgânico e que é modificada de modo a ter a atividade da 2-oxoglutarato desidrogenase aumentada em comparação com a de uma cepa não modificada. Um ácido orgânico como o ácido succínico pode ser produzido cultivando-se a bactéria.

BACTÉRIA CAPAZ DE PRODUZIR ÁCIDO ORGÂNICO E PROCESSO PARA A
PRODUÇÃO DO MESMO

Área Técnica

A presente invenção refere-se a uma bactéria produtora
5 de ácido orgânico, tal como uma bactéria corineforme, e
refere-se também à produção de um ácido orgânico como o
ácido succínico, usando a bactéria produtora de ácido
orgânico.

Técnica Antecedente

10 Para a produção de ácidos orgânicos, inclusive o ácido
succínico, por fermentação, geralmente são usadas bactérias
anaeróbicas como as pertencentes ao gênero
Anaerobiospirillum e ao gênero *Actinobacillus* (Documentos-
Patentes 1 e 2 e Documento Não-Patente 1). O uso de
15 bactérias anaeróbicas resulta no alto rendimento dos
produtos, ao mesmo tempo em que exige muitos nutrientes
para a proliferação das bactérias anaeróbicas. Portanto, é
necessário acrescentar ao meio uma grande quantidade de uma
fonte de nitrogênio orgânico, tal como milhocina (CSL, do
20 inglês *Corn Steep Liquor*). A adição de uma quantidade
abundante de uma fonte de nitrogênio orgânico não somente
leva a um aumento do custo do meio, mas leva também a um
aumento do custo da purificação para isolar o produto, o
que não é econômico.

25 Além disso, também se conhece um método no qual
bactérias aeróbicas como as bactérias corineformes são
primeiramente cultivadas sob condições aeróbicas para que
as bactérias proliferem e, então, as bactérias são mantidas
sob condições anaeróbicas, como bactérias em descanso, para
30 produzirem um ácido orgânico (Documentos-Patentes 3 e 4).
Nesse caso, para que as células bacterianas proliferem,
acrescenta-se apenas uma pequena quantidade de nitrogênio
orgânico; assim, trata-se de um método econômico, porque as
células bacterianas podem crescer suficientemente em um

meio simples; porém, trata-se de um método que ainda precisa ser aprimorado, em termos da quantidade do ácido orgânico desejado produzida, sua concentração e sua taxa de produção por célula bacteriana, bem como em termos de simplificação do método de produção e semelhantes. Além disso, foi relatada a produção fermentativa de um ácido orgânico usando uma bactéria na qual a atividade da fosfoenol piruvato carboxilase aumenta (Documento-Patente 5), mas há necessidade de um desenvolvimento adicional da produção fermentativa de um ácido orgânico.

Foi relatado que a atividade da 2-oxoglutarato desidrogenase (também chamada alfa-cetoglutarato desidrogenase) foi detectada em uma bactéria corineforme (Documento Não-Patente 2), e o gene de 2-oxoglutarato desidrogenase foi clonado (Documento Não-Patente 3). Além do mais, foi descrito um método de produção para um aminoácido usando um microorganismo em que a atividade da 2-oxoglutarato desidrogenase foi reduzida (Documento-Patente 6).

No entanto, a produção de um ácido orgânico usando uma bactéria em que a atividade da 2-oxoglutarato desidrogenase seja aumentada não foi relatada até o presente.

Documento-Patente 1: Patente U.S. No. 5.143.834

Documento-Patente 2: Patente U.S. No. 5.504.004

Documento-Patente 3: JP-A-11-113588

Documento-Patente 4: JP-A-11-196888

Documento-Patente 5: JP-A-11-196887

Documento-Patente 6: WO 95/34672

Documento Não-Patente 1: *International Journal of Systematic Bacteriology* (1999), 49, 207-216

Documento Não-Patente 2: Shiio I, Ujigawa-Takeda K. 1980. "Presence and regulation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in a glutamate-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*". *Agric. Biol. Chem.* 44: 1897-1904.

Documento Não-Patente 3: Usuda Y, Tujimoto N, Abe C, Asakura Y, Kimura E, Kawahara Y, O, Matsui H. 1996. "Molecular cloning of the *Corynebacterium glutamicum* ('*Brevibacterium lactofermentum*' AJ12036) *odhA* gene encoding a novel type of 2-oxoglutarate dehydrogenase. *Microbiology*. 142: 3347-54.

Descrição da Invenção

Um objetivo da presente invenção é prover um método para a produção de um ácido orgânico como o ácido succínico com eficiência produtiva mais alta.

Os inventores da presente invenção estudaram intensamente como alcançar o objetivo mencionado acima. Como resultado, os inventores descobriram que, permitindo-se que uma bactéria modificada de modo a aumentar a atividade da 2-oxoglutarato desidrogenase, ou que uma célula tratada da mesma bactéria aja sobre uma matéria prima orgânica em uma solução de reação contendo um íon carbonato, um íon bicarbonato ou gás dióxido de carbono, a taxa de consumo de matéria prima, a produtividade de um ácido orgânico como o ácido succínico, ou o rendimento do ácido orgânico aumentam, concluindo assim a presente invenção.

Isto é, a presente invenção provê o seguinte:

(1) Uma bactéria que tem capacidade de produzir um ácido orgânico, caracterizada por: a bactéria ser modificada de tal modo que a atividade da 2-oxoglutarato desidrogenase aumenta em comparação com uma cepa não modificada quanto à atividade da 2-oxoglutarato desidrogenase.

(2) Uma bactéria que tem capacidade de produzir um ácido orgânico, caracterizada por: a bactéria ser modificada de tal modo que a produção de ácido acético se reduz e a atividade da 2-oxoglutarato desidrogenase aumenta, em comparação com uma cepa não modificada quanto à

atividade da 2-oxoglutarato desidrogenase.

(3) A bactéria de acordo com o item (2) acima, caracterizada por: a produção de ácido acético ser reduzida por meio da diminuição de uma das atividades da acetato
5 quinase e fosfotransacetilase, ou de ambas.

(4) A bactéria de acordo com o item (2) acima, caracterizada por: a produção de ácido acético ser reduzida por meio da diminuição da atividade da acetil-CoA hidrolase.

10 (5) A bactéria de acordo com o item (2) acima, caracterizada por: a produção de ácido acético ser reduzida por meio da redução da atividade da piruvato oxidase.

(6) A bactéria de acordo com qualquer dos itens de (1) a (5) acima, caracterizada por: a bactéria ser
15 adicionalmente modificada do modo que a atividade da lactato desidrogenase diminui.

(7) A bactéria de acordo com qualquer dos itens de (1) a (6) acima, caracterizada por: a bactéria ser adicionalmente modificada de modo que a atividade da
20 piruvato carboxilase aumenta.

(8) A bactéria de acordo com qualquer dos itens de (1) a (7) acima, caracterizada por: a bactéria ser selecionada no grupo que consiste de uma bactéria corineforme, uma bactéria *Bacillus*, uma bactéria *Rhizobium*, uma bactéria
25 *Escherichia*, uma bactéria *Lactobacillus* e uma bactéria *Saccinobacillus*.

(9) A bactéria de acordo com qualquer dos itens de (1) a (8) acima, caracterizada por: o ácido orgânico ser o ácido succínico.

30 (10) Um método para produzir um ácido orgânico, caracterizado por: consistir em fazer a bactéria de acordo com qualquer um dos itens de (1) a (9) acima, ou uma célula tratada da mesma bactéria, agir sobre uma matéria prima orgânica em uma solução contendo um íon carbonato, um íon

bicarbonato, ou gás de dióxido de carbono, produzindo, desse modo, um ácido orgânico, e coletar o ácido orgânico.

(11) O método de acordo com o item (10) acima, caracterizado por: consistir em fazer a bactéria ou a sua
5 célula tratada agir sobre uma matéria prima orgânica sob atmosfera anaeróbica.

(12) O método de acordo com o item (10) ou (11) acima, caracterizado por: a matéria prima orgânica ser glicose ou sucrose.

10 (13) O método de acordo com qualquer dos itens de (10 a (12) acima, caracterizado por: o ácido orgânico ser ácido succínico.

(14) Um método para produzir um polímero contendo um ácido orgânico, caracterizado por: consistir em: produzir
15 um ácido orgânico pelo método de acordo com qualquer dos itens de (10) a (13) acima, e submeter o ácido orgânico obtido como matéria prima a uma reação de polimerização.

Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 é um diagrama que ilustra um procedimento
20 para a construção do plasmídeo pC3.14.

A Figura 2 é um diagrama que ilustra um procedimento para a construção do plasmídeo pODH3.2.

Melhor Maneira para Executar a Invenção

A partir deste ponto, incorporações da presente
25 invenção serão descritas com detalhes.

A bactéria da presente invenção é uma bactéria que tem a capacidade de produzir um ácido orgânico e que é modificada de modo que a atividade da 2-oxoglutarato desidrogenase (doravante aqui denominada também ODH - do
30 inglês, *Oxoglutarate DeHydrogenase*) aumenta, em comparação com uma cepa não modificada.

Na presente invenção, a expressão "capacidade de produzir ácido orgânico" refere-se à capacidade de acumular um ácido orgânico em um meio quando a bactéria da presente

invenção é cultivada nesse meio. Os exemplos de "ácido orgânico" incluem ácidos orgânicos que servem como um intermediário metabólico no ciclo TCA e seus exemplos específicos incluem ácido succínico, ácido málico, ácido fumárico, ácido cítrico, ácido isocítrico e ácido cis-aconítico. Entre esses, os ácidos succínico, málico e fumárico são preferenciais, e o ácido succínico é mais preferencial.

A bactéria pode ser uma bactéria obtida modificando-se uma bactéria que tenha a capacidade intrínseca de produzir ácido orgânico, ou uma bactéria à qual tenha sido conferida a capacidade de produzir ácido orgânico por cultivo direcionado ao aumento da atividade da ODH, ou pode ser uma bactéria que venha a ter a capacidade de produzir ácido orgânico por meio de modificação para aumentar a atividade da ODH. Como método para conferir a capacidade de produzir ácido orgânico pelo cultivo, pode-se citar como exemplo um tratamento de mutação ou tratamento de recombinação genética. Exemplos específicos incluem uma modificação para diminuir a atividade da lactato desidrogenase e uma modificação para aumentar a atividade da piruvato carboxilase, conforme descrição abaixo.

A bactéria usada na presente invenção pode ser uma bactéria que tenha a capacidade de produzir dois ou mais tipos de ácido orgânico.

A bactéria que pode ser usada no método da presente invenção não tem limitação, desde que tenha a capacidade de produzir ácido orgânico. Uma bactéria corineforme, uma bactéria pertencente ao gênero *Bacillus*, uma bactéria pertencente ao gênero *Escherichia*, uma bactéria pertencente ao gênero *Lactobacillus*, uma bactéria pertencente ao gênero *Saccinobacillus*, e uma bactéria pertencente ao gênero *Rhizobium* são preferíveis. Entre essas, uma bactéria corineforme é mais preferível.

Como bactéria pertencente ao gênero *Escherichia*, pode-se citar como exemplo *Escherichia coli*. Como bactéria pertencente ao gênero *Lactobacillus*, pode-se citar como exemplo *Lactobacillus helveticus* (*J Appl Microbiol*, 2001, 91, p846-852). Exemplos de bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* incluem *Bacillus subtilis*, *Bacillus anyloliuefaciens*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus stearothermophilus*. Como exemplo de bactéria pertencente ao gênero *Rhizobium*, pode-se citar *Rhizobium etli*.

10 A bactéria corineforme não é particularmente limitada, desde que seja classificada como bactéria corineforme. Exemplos incluem uma bactéria pertencente ao gênero *Corynebacterium*, uma bactéria pertencente ao gênero *Brevibacterium*, e uma bactéria pertencente ao gênero
15 *Arthrobacter*. Entre essas, é preferível uma bactéria pertencente ao gênero *Corynebacterium* ou uma bactéria pertencente ao gênero *Brevibacterium*. Os exemplos mais preferíveis incluem as bactérias classificadas como *Corynebacterium glutamicum*, *Brevibacterium flavum*,
20 *Brevibacterium ammoniagenes* e *Brevibacterium lactofermentum*.

Os exemplos especialmente preferíveis de cepas-mãe da bactéria usada na presente invenção incluem *Brevibacterium flavum* MJ-233 (FERM BP-1497), *Brevibacterium flavum* MJ-233
25 AB-41 (FERM BP-1498), *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC6872, *Corynebacterium glutamicum* ATCC31831, e *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869. Como a *Brevibacterium flavum* é, às vezes, classificada como *Corynebacterium glutamicum* (Lielbl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W. e Schleifer, K.H.,
30 *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1991, vol. 41, p255-260), na presente invenção a cepa MJ-233 de *Brevibacterium flavum* e sua mutante, cepa MJ-233 AB-41, são idênticas à cepa MJ-233 de *Corynebacterium glutamicum* e à cepa MJ-233 AB-41 de *Corynebacterium glutamicum*,

respectivamente.

Brevibacterium flavum MJ-233 foi depositada sob No. de Acesso FERM P-3068 no National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of Internacional Trade and Industry (Instituto Nacional de Biociência e Tecnologia Humana, Agência da Ciência e Tecnologia Industrial, Ministério do Comércio e Industria Internacional) (atualmente, International Patent Organism Depositary National Institute of Advanced Industrial Science and Technology - Órgão Depositário de Patentes Internacionais, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Industrial Avançada) (Central 6, 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki, 305-54566, Japão), em 28 de abril de 1975 e, então, foi transferida para um depósito internacional de acordo com as disposições do Tratado de Budapeste de 1 de maio de 1981, com o Número de Acesso FERM BP-1497.

As bactérias mencionadas acima usadas como cepas-mãe podem ser quaisquer cepas, inclusive não apenas cepas do tipo selvagem, mas também mutantes obtidas pelo tratamento de mutação costumeiro, tal como irradiação UV e um tratamento com NTG, e cepas recombinantes obtidas por um método genético, como fusão celular e um método de recombinação genética.

As bactérias da presente invenção podem ser obtidas modificando-se as bactérias mencionadas acima que têm a capacidade de produzir um ácido orgânico, de modo que a atividade da ODH aumente. Pode-se realizar uma modificação para conferir a capacidade de produzir um ácido orgânico depois que a modificação para aumentar a atividade da ODH tiver sido realizada.

No presente documento, o termo "atividade da ODH" refere-se à atividade que catalisa uma reação na qual 2-oxoglutarato (alfa-cetoglutarato) é oxidativamente

descarboxilada para gerar succinil-CoA. O termo "a atividade da ODH aumenta" refere-se ao fato da atividade da ODH aumentar em comparação com uma cepa não modificada quanto à ODH. Preferivelmente, a atividade da ODH aumenta
5 no mínimo 1,5 vezes mais que a da cepa não modificada quanto à ODH, por unidade de peso de células bacterianas e, mais preferivelmente, no mínimo 2 vezes mais do que a da cepa não modificada quanto à ODH. A atividade da ODH pode ser medida de acordo com o método de Shiio e outros (Isamu
10 Shiio e Kyoko Ujigawa-Takeda, *Agric Biol Chem*, 44(8), 1897-1904, 1980).

Uma modificação para aumentar a atividade da ODH usando um gene da ODH pode ser realizada, por exemplo, por transformação usando um plasmídeo ou semelhante, integração
15 do gene da ODH em um cromossomo por recombinação ou semelhante, ou uma modificação de uma sequência de controle da expressão do gene de ODH.

O gene da ODH que pode ser usado para ser introduzido em uma bactéria hospedeira por transformação usando um
20 plasmídeo, etc., recombinação homóloga ou semelhante, não tem limitação, desde que seja um gene que aumente a atividade da ODH quando o gene for introduzido na bactéria hospedeira, isto é, um gene que codifique uma proteína que tenha atividade de ODH. O gene da ODH (*odhA*) derivado de
25 uma bactéria corineforme e que tem a sequência de nucleotídeos mostrada em SEQ ID NO: 3 é um exemplo. O gene da ODH pode ser um gene homólogo, tal como um DNA que hibridize com um DNA que tenha a sequência de nucleotídeos mencionada acima sob condições rigorosas, ou um DNA que
30 tenha uma sequência de nucleotídeos no mínimo 90% homóloga; preferivelmente, no mínimo 95% homóloga e, mais preferivelmente, no mínimo 99% homóloga à sequência de nucleotídeos mencionada acima, desde que codifique uma proteína que tenha uma atividade de ODH.

No presente documento, condições rigorosas incluem condições de lavagem para hibridização "southern" costumeira e, preferivelmente, incluem condições sob as quais a hibridização é realizada a 60°C, e com uma
5 concentração de sal equivalente a 1 x SSC, e 0,1% SDS, preferivelmente 0,1 x SSC e 0,1% SDS.

Além disso, também pode ser usado um gene da ODH derivado de outras bactérias além da bactéria corineforme, outros microorganismos, animais ou plantas. Como genes da
10 ODH derivados de microorganismos, animais ou plantas, podem ser usados: um gene cuja sequência de nucleotídeos já tenha sido determinada e um gene com uma sequência de nucleotídeos a ser determinada após isolar-se o gene que codifica uma proteína que tem uma atividade de ODH
15 proveniente de um cromossomo de microorganismos, animais ou plantas com base na homologia ou semelhante. Além disso, após a sequência de nucleotídeos de um gene ser determinada, um gene sintetizado com base na sequência de nucleotídeos também pode ser usado. Esses genes podem ser
20 obtidos amplificando-se regiões que incluem um promotor e um ORF, por um método de hibridização, ou por um método de PCR.

Inserindo-se um fragmento de DNA contendo o gene de ODH mencionado acima em um plasmídeo adequado, tal como um
25 vetor plasmídeo contendo pelo menos um gene que controle uma função de replicação de plasmídeo em uma bactéria corineforme, pode-se obter um plasmídeo recombinante capaz de expressar ODH em alto grau em uma bactéria corineforme. No plasmídeo recombinante mencionado acima, um promotor
30 para expressar o gene da ODH pode ser um promotor originado do próprio gene da ODH, mas o promotor pode ser substituído por outro promotor forte que possa funcionar em uma bactéria hospedeira. Um promotor derivado de *E. coli*, tal como um promotor *tac* ou um promotor *trc* pode ser um

exemplo.

Quando o gene da ODH é introduzido na bactéria corineforme, o vetor plasmídeo que pode ser usado não tem limitação, desde que contenha pelo menos um gene que controle uma função de replicação na bactéria corineforme. Exemplos específicos de vetores plasmídeos incluem: pCRY30, descrito em JP-A-3-210184; os plasmídeos pCRY21, pCRY2KE, pCRY2KX, pCRY31, pCRY3KE, e pCRY3KX descritos em JP-A-2-72876 na Patente US No. 5.185.262; os plasmídeos pCRY2 e pCRY3 descritos em JP-A-1-191686; pAM330 descrito em JP-A-58-67679; pHM1519 descrito em JP-A-58-77895; pAJ655, pAJ611, e pAJ1844 descritos em JP-A-58-192900; pCG1 descrito em JP-A-57-134500; pCG2 descrito em JP-A-58-35197; pCG4 e pCG11 descritos em JP-A-57-183799; e pPK4 descrito em WO 95/34672. Entre esses, como vetor plasmídeo a ser usado no sistema vetor-hospedeiro da bactéria corineforme, é preferível um vetor plasmídeo tendo um gene que controle uma função de replicação de plasmídeo na bactéria corineforme e um gene que controle a função de estabilização de plasmídeo na bactéria corineforme. Por exemplo, os plasmídeos pCRY30, pCRY21, pCRY2KE, pCRY2KX, pCRY31, pCRY3KE, e pCRY3KX podem ser usados preferencialmente.

Transformando-se uma bactéria corineforme como a *Brevibacterium flavum*, cepa MJ-233 (FERM BP-1497) com um vetor recombinante obtido inserindo-se o gene da ODH em um sítio adequado de um vetor plasmídeo, obtém-se uma bactéria corineforme na qual a expressão do gene de ODH é aumentada. A transformação pode ser realizada por um método conhecido, tal como o método de pulso elétrico (*Res Microbiol*, Vol. 144, p.181-185, 1993).

A atividade da ODH também pode ser aumentada incorporando-se múltiplas cópias do gene da ODH em um cromossomo por um método conhecido de recombinação

homóloga, de modo que o gene da ODH seja expresso em alto grau.

Um exemplo usando a bactéria corineforme foi descrito acima, mas a atividade da ODH também pode ser aumentada de
5 maneira semelhante quando outras bactérias são usadas.

Além do mais, a atividade da ODH também pode ser aumentada substituindo-se um promotor em um cromossomo de um hospedeiro. Informações sobre a sequência de uma região promotora podem ser obtidas, por exemplo, por meio do
10 GenBank, No. de Acesso ao Banco de Dados AP005276. O tipo de promotor a ser substituído não tem limitação, desde que seja capaz de funcionar em uma bactéria hospedeira. É preferível um promotor cuja atividade de transcrição não seja suprimida sob condições anaeróbicas. Exemplos incluem
15 um promotor *tac* e um promotor *trc* que são usados em *E. coli*.

Como exemplo de método para substituição do promotor, pode-se citar o método que usa o gene *sacB* mostrado nos Exemplos descritos abaixo (Schafer, A. e outros. *Gene* 145
20 (1994) 69-73).

Na presente invenção, a modificação para aumentar a atividade da ODH pode ser realizada em uma bactéria produtora de ácido orgânico que tenha sido modificada de modo que a produção de ácido acético seja reduzida. Em uma
25 bactéria produtora de ácido orgânico modificada para que a produção de ácido acético seja reduzida, 2-oxoglutarato às vezes se forma como um produto secundário. Como a ODH catalisa uma reação para descarboxilar oxidativamente o 2-oxoglutarato para gerar succinil-CoA, o aumento da
30 atividade de ODH leva a uma redução da quantidade de 2-oxoglutarato como produto secundário e a um aumento da produção do ácido orgânico alvo.

Exemplos de uma modificação para que a produção de ácido acético seja reduzida incluem uma modificação para

diminuir as respectivas atividades da acetato quinase (doravante no presente denominada também ACK), fosfotransacetilase (doravante no presente denominada também PTA), acetil-CoA hidrolase (doravante no presente denominada também ACH) e piruvato oxidase (doravante no presente denominada também POXB).

Por motivo do ácido acético ser gerado da acetil-CoA como um produto intermediário em um caminho biossintético de oxaloacetato e derivados de oxaloacetato, é preferível que qualquer uma das atividades das enzimas mencionadas acima, ou que as atividades de todas as enzimas sejam reduzidas, de modo que a quantidade de ácido acético como um produto secundário seja reduzida bloqueando-se o caminho biossintético do ácido acético.

O termo "atividade da PTA" refere-se a uma atividade de catalisação de uma reação que gera acetil-fosfato transferindo fosfato para acetil-CoA. A expressão "modificado(a) de modo que a atividade da PTA" seja reduzida significa que a atividade da PTA é mais baixa que uma atividade específica de uma cepa não modificada, tal como uma cepa do tipo selvagem. A atividade da PTA é reduzida, preferivelmente, para 30% ou menos, ou, mais preferivelmente, 10% ou menos por célula bacteriana, em comparação com uma cepa não modificada. A atividade da PTA pode ser eliminada completamente. A redução da atividade da PTA pode ser confirmada por medição da atividade da PTA pelo método de Klotzsch e outros (Klotzsch, H>R., Meth Enzymol 12, 381-386 (1969)).

O termo "atividade da ACK" refere-se a uma atividade de catalisação de uma reação que gera ácido acético de acetil-fosfato e ADP. A expressão "modificado(a) de modo que a atividade da ACK seja reduzida" significa que a atividade da ACK é mais baixa do que uma atividade específica de uma cepa não modificada, como uma cepa do

tipo selvagem. A atividade da ACK é reduzida, preferivelmente, a 30% ou menos e, mais preferivelmente, 10% ou menos por célula bacteriana, em comparação com uma cepa não modificada. A atividade da ACK pode ser
5 completamente eliminada. A redução na atividade da ACK pode ser confirmada por medição da atividade da ACK pelo método de Ramponi e outros (Ramponi G., *Meth Enzymol* 42, 409-426 (1975)).

Na *Corynebacterium glutamicum* (inclusive uma bactéria
10 classificada como *Brevibacterium flavum*), ambas as enzimas são codificadas pelo operon pta-ack, conforme descrição em *Microbiology* Fev. de 1999; 145 (Pt 2):503-13, de modo que as atividades de ambas as enzimas, PTA e ACK, podem ser reduzidas rompendo-se o gene pta.

15 O rompimento do gene pta pode ser conduzido de acordo com um método conhecido, tal como um método que usa uma recombinação homóloga, ou um método que usa o gene sacB (Schafer, A. e outros. *Gene* 145 (1994) 69-73). Como exemplo de gene pta, pode-se citar um DNA contendo a sequência de
20 nucleotídeos de números 1 a 1383 mostrada na SEQ ID NO:7. Além disso, como o gene a ser usado para rompimento do gene pta pode ter homologia em um grau que seja suficiente para causar recombinação homóloga com o gene pta em um DNA cromossômico de uma bactéria corineforme como alvo para
25 rompimento, um gene homólogo à sequência também pode ser usado. Nesse caso, a homologia em um grau que seja suficiente para causar recombinação homóloga significa homologia de, preferivelmente, no mínimo 70%, mais preferivelmente no mínimo 80% e ainda mais preferivelmente,
30 no mínimo 90% e, particularmente preferível, no mínimo 95%. Além disso, DNAs que podem hibridizar com o gene mencionado acima sob condições rigorosas podem sofrer recombinação homóloga entre si.

A bactéria usada na presente invenção pode ser uma

bactéria obtida por uma combinação de dois ou mais tipos de modificação mencionados acima, além da modificação para aumentar a atividade da ODH. Quando são realizadas múltiplas modificações, a ordem de cada modificação não é particularmente limitada.

O termo "atividade da ACH" refere-se a uma atividade de catalisação de uma reação que gera ácido acético de acetil-CoA e água. A expressão "modificada(o) de tal modo que a atividade da ACH é reduzida" significa que a atividade da ACH é mais baixa do que uma atividade específica de uma cepa não modificada, tal como uma cepa do tipo selvagem. A atividade da ACH é reduzida a 50% ou menos, preferivelmente 30% ou menos e, mais desejavelmente, 10% ou menos por célula bacteriana, em comparação com uma cepa não modificada. O termo "reduzida" também inclui a eliminação completa da atividade. A redução da atividade da ACH pode ser confirmada por medição da atividade da ACH pelo método de Gergely, J. e outros (Gergely, J., Hele, P. & Ramkrishnan, C.V. (1952) *J Biol Chem* 198 p323-334). Exemplos do gene que codifica a ACH de uma bactéria corineforme incluem a sequência de *Corynebacterium glutamicum* (NCgl240, No. de Acesso NC_003450 no GenBank (uma fita complementar aos números de nucleotídeos de 2729376 a 2730884 em NC 003450)) depositada no GenBank (WO 2005/113744). A sequência do gene ach da *Corynebacterium glutamicum* também é mostrada em 1037 a 2545 da SEQ ID NO:14. Além disso, um gene que tenha homologia com a sequência em um grau que seja suficiente para causar recombinação homóloga com o gene ach em um cromossomo também pode ser usado. Aqui, a homologia em um grau que seja suficiente para causar recombinação homóloga significa homologia de, preferivelmente, no mínimo 70%; mais preferivelmente, no mínimo 80%; mais preferivelmente ainda, no mínimo 90% e, particularmente preferível, no mínimo 95%.

Além disso, DNAs que possam hibridizar com o gene acima mencionado sob condições rigorosas podem sofrer recombinação homóloga entre si.

O termo "atividade da POXB" refere-se a uma atividade
5 de catalisação de uma reação que gera ácido acético de ácido pirúvico e água. A expressão "modificada de modo que a atividade da POXB é reduzida" significa que a atividade da POXB é mais baixa do que uma atividade específica de uma cepa não modificada, como uma cepa do tipo selvagem. A
10 atividade da POXB diminui, preferivelmente, para 50% ou menos; mais preferivelmente, 30% ou menos e, particularmente preferível, 10% ou menos por célula bacteriana em comparação com uma cepa não modificada. O termo "reduzida" também inclui a completa eliminação da
15 atividade. A redução da atividade da POXB pode ser confirmada por medição da atividade da POXB pelo método de Chang e outros (Chang Y. e Cronan J.E.JR, *J Bacteriol* 151, 1279-1289 (1982)). Exemplos do gene *poxB* de uma bactéria corineforme incluem a sequência (uma fita complementar aos
20 números de nucleotídeos de 2776766 a 2778505, No. de Acesso Genbank NC_003450) depositada no GenBank (WO 2005/113745). A sequência do gene *poxB* de *Corynebacterium glutamicum* também é mostrada em 996 a 2735 da SEQ ID NO:16. Além disso, também pode ser usado um gene que tenha homologia
25 com a sequência em um grau que seja suficiente para causar a recombinação homóloga com o gene *poxB* em um cromossomo. Aqui, a homologia em um grau que seja suficiente para causar recombinação homóloga significa preferivelmente uma homologia de no mínimo 70%; mais preferivelmente, no mínimo
30 80%; mais preferivelmente ainda, no mínimo 90% e, particularmente preferível, no mínimo 95%. Além disso, DNAs que possam hibridizar com o gene mencionado acima sob condições rigorosas podem sofrer recombinação homóloga entre si.

O rompimento do gene *ach* e do gene *poxB* pode ser realizado por um método conhecido, de maneira semelhante ao rompimento do gene *pta*, conforme descrição acima.

A bactéria da presente invenção pode ser uma bactéria modificada de modo que a atividade da lactato desidrogenase (doravante aqui denominada também LDH) seja reduzida, em acréscimo ao aumento da atividade da ODH. A referida bactéria é particularmente efetiva quando o ácido orgânico é o ácido succínico. Essa bactéria pode ser obtida, por exemplo, por meio da preparação de uma bactéria com o gene da LDH rompido, seguida por modificação da bactéria com o gene da ODH. Deve-se notar que qualquer uma das duas modificações, seja a que reduz a atividade da LDH, ou a que aumenta a atividade da ODH, pode ser realizada em primeiro lugar.

A expressão "a atividade da LDH é reduzida" significa que a atividade da LDH é mais baixa em comparação com a de uma cepa não modificada quanto ao gene da LDH. A atividade da LDH é preferivelmente reduzida para 10% ou menos por célula bacteriana, em comparação com a da cepa não modificada. Além disso, a atividade da LDH pode ser completamente eliminada. A redução da atividade da LDH pode ser confirmada por medição da atividade da LDH por um método conhecido (L.Kanarek e R.L. Hill, *J Biol Chem* 239, 4202 (1964)). Como exemplos de métodos específicos para a obtenção de uma cepa de bactéria corineforme cuja atividade da LDH é reduzida, pode-se citar o método que usa a recombinação homóloga em um cromossomo, descrito em JP-A-11-206385, o método que usa o gene *sacB* (Schafer, A. e outros. *Gene* 145 (1994) 69-73) e semelhantes.

Além disso, a bactéria usada na presente invenção pode ser uma bactéria modificada de modo que a atividade da piruvato carboxilase (doravante aqui denominada também PC) seja aumentada, em acréscimo ao aumento da atividade da

ODH. A expressão "a atividade da PC é aumentada" significa que a atividade da PC aumenta preferivelmente 100% ou mais e, mais preferivelmente, 300% ou mais, em comparação com a das cepas não modificadas, como uma cepa do tipo selvagem ou uma cepa-mãe. A atividade da PC pode ser medida, por exemplo, por um método para medir uma redução de NADH (WO 2005/021770). A referida bactéria pode ser obtida, por exemplo, introduzindo-se o gene da PC em uma bactéria corineforme na qual a expressão do gene da ODH foi aumentada. Deve-se notar que tanto a introdução do gene da PC quanto a modificação para aumentar a atividade da ODH podem ser realizadas em primeiro lugar.

A introdução do gene da PC pode ser realizada expressando-se em um alto grau o gene da piruvato carboxilase (PC) em uma bactéria corineforme, de maneira semelhante à descrita em JP-A-11-196888. Como gene da PC, pode ser usado, por exemplo, um gene da PC derivado de *Corynebacterium glutamicum* (Peters-Wendish, P.G. e outros. *Microbiology*, vol. 144 (1998) p915-927 (SEQ ID NO:5)). Na sequência de nucleotídeos da SEQ ID NO:5, uma parte dos nucleotídeos pode ser substituída com outros nucleotídeos, ou pode ser suprimida; novos nucleotídeos podem ser inseridos, ou uma parte dos nucleotídeos pode ser deslocada, desde que a atividade da PC não seja substancialmente prejudicada. Qualquer um desses derivados pode ser usado na presente invenção. Além disso, os seguintes DNAs também podem ser adequadamente usados: um DNA que hibridize com um DNA contendo a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:5 sob condições rigorosas; um DNA que tenha homologia de, no mínimo, 90%, preferivelmente no mínimo 95% e, mais preferivelmente, no mínimo 99% em relação à sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:5 e que codifique uma proteína que tenha atividade de PC.

Além do mais, um gene da PC derivado de bactérias que

não sejam *Corynebacterium glutamicum*, ou de outras bactérias, animais, ou plantas, também pode ser usado. Em particular, as seqüências dos genes da PC derivados das seguintes bactérias, animais e plantas já são conhecidas
 5 (os documentos de referência são indicados abaixo), ou os genes podem ser obtidos por hibridização de maneira semelhante à descrita acima, ou amplificando-se a ORF por um método de PCR.

Humano [*Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 202, 1009-1014,
 10 (1994)]

Camundongo [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90, 1766-1779, (1993)]

Rato [*Gene*, 165, 331-332, (1995)]

Levedura *Saccharomyces cerevisiae* [*Mol. Gen. Genet.*,
 15 229, 307-315, (1991)]

Schizosaccharomyces pombe [DDBJ No. de Acesso No.; D78170]

Bacillus stearothermophilus [*Gene*, 191, 47-50, (1997)]

Rhizobium etli [*J. Bacteriol.*, 178, 5960-5970, (1996)]

20 O aumento da atividade da PC pode ser realizado de modo semelhante ao do aumento da atividade da ODH, conforme descrito acima.

Método para a Produção de Ácido Orgânico

O método para a produção de um ácido orgânico da
 25 presente invenção consiste em permitir que as bactérias mencionadas acima, ou células tratadas das mesmas, ajam sobre uma matéria prima orgânica em uma solução de reação contendo um íon carbonato, um íon bicarbonato, ou gás dióxido de carbono para produzir um ácido orgânico, e em
 30 coletar o ácido orgânico. Os ácidos orgânicos a serem produzidos incluem os ácidos orgânicos mencionados acima. Entre esses, o ácido succínico, ácido fumárico, ácido málico ou ácido pirúvico são preferenciais, e o ácido succínico é o mais preferencial.

Quando as bactérias mencionadas acima são usadas na produção de um ácido orgânico, as bactérias submetidas à cultura em um meio sólido inclinado, tal como o agar, podem ser usadas diretamente para a reação, mas as células bacterianas preparadas cultivando-se antecipadamente as bactérias mencionadas acima em um meio líquido (isto é, cultura semeada) podem ser usadas preferencialmente. O meio a ser usado para a cultura semeada pode ser qualquer um dos que são usados normalmente para o cultivo de bactérias. Pode-se usar, por exemplo, um meio comum, que é preparado adicionando-se fontes naturais de nutrientes como extrato de carne, extrato de levedura e peptona a uma composição formada por sais inorgânicos como sulfato de amônio, fosfato de potássio e sulfato de magnésio. Após a cultura semeada, as células bacterianas são usadas preferivelmente para a reação de produção de um ácido orgânico depois de terem sido colhidas por centrifugação, separação por membrana, ou procedimentos semelhantes. O ácido orgânico pode ser produzido permitindo-se que a bactéria obtida pela cultura semeada reaja com uma matéria prima orgânica ao mesmo tempo em que prolifera em um meio contendo a matéria prima orgânica. Alternativamente, o ácido orgânico pode ser produzido permitindo-se que as células bacterianas obtidas por proliferação antecipada reajam com a matéria prima orgânica em uma solução de reação contendo a matéria prima orgânica.

Na presente invenção, também podem ser usadas células bacterianas tratadas. Exemplos de células bacterianas tratadas incluem células bacterianas imobilizadas com acrilamida, carragenano, ou semelhante; restos de células bacterianas esmagadas, um sobrenadante de centrifugação das mesmas, ou frações obtidas purificando-se parcialmente o sobrenadante com um tratamento de sulfato de amônio ou semelhante.

A matéria prima orgânica a ser usada no método de produção da presente invenção não é particularmente limitada, desde que seja uma fonte de carbono que possa ser assimilada pelas bactérias descritas no presente para gerar
5 um ácido orgânico como o ácido succínico. Em geral, usa-se um carboidrato fermentável, inclusive: um carboidrato como galactose, lactose, glicose, frutose, glicerol, sucrose, sacarose, amido, ou celulose; ou poliálcoois, como glicerina, manitol, xilitol ou ribitol. Entre esses, são
10 preferíveis a glicose ou a sucrose, e a glicose é especialmente preferível.

Além disso, também pode ser usado um líquido para sacarificação de amido, melado ou semelhantes, que contenha qualquer um dos carboidratos fermentáveis mencionados
15 acima. Qualquer um desses carboidratos fermentáveis pode ser usado isoladamente ou em combinação com outro(s). A concentração em que a matéria prima orgânica mencionada acima é usada não é especialmente limitada, mas é vantajoso que se aumente a concentração tanto quanto for possível,
20 dentro de uma faixa que não iniba a geração de um ácido orgânico como o ácido succínico. A reação geralmente é realizada na faixa de 5 para 30% (Peso/Volume) e preferivelmente na faixa de 10 para 20% (P/V). A matéria prima orgânica mencionada acima pode ser adicionada à
25 medida que diminuir durante o decorrer da reação.

A solução de reação contendo as matérias primas orgânicas não é especificamente limitada. A solução de reação a ser usada pode ser um meio para cultivo de bactérias ou um tampão, tal como um tampão fosfato. A
30 solução de reação é preferivelmente uma solução aquosa contendo uma fonte de nitrogênio, sais inorgânicos e semelhantes. Aqui, a fonte de nitrogênio não é especificamente limitada, desde que possa ser assimilada pelas bactérias descritas no presente para gerar um ácido

orgânico como o ácido succínico. Exemplos específicos de fontes de nitrogênio incluem vários compostos de nitrogênio orgânico e inorgânico, tais como sais de amônio, nitrato, uréia, um hidrolisado de soja, um catabólito de caseína, peptona, extrato de levedura, extrato de carne, e milhocina (CSL). Exemplos de sais inorgânicos incluem vários tipos de fosfatos, sulfatos e sais metálicos de magnésio, potássio, manganês, ferro, zinco e semelhantes. Além disso, quaisquer fatores que promovam o crescimento, inclusive vitaminas como a biotina, o ácido pantotênico, inositol e ácido nicotínico; nucleotídeos, e aminoácidos, podem ser acrescentados se necessário. Também é desejável que uma quantidade adequada de um agente anti-espumante disponível no mercado seja adicionado à solução de cultura para impedir a formação de espuma na hora da reação.

A solução de reação contém íons carbonato, íons bicarbonato e gás de dióxido de carbono, além das matérias primas orgânicas, da fonte de nitrogênio, dos sais inorgânicos e semelhantes mencionados acima. Os íons carbonato ou os íons bicarbonato podem ser fornecidos por carbonato de magnésio, carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, carbonato de potássio, ou bicarbonato de potássio, que também pode ser usado como agente neutralizante. Entretanto, se necessário, os íons carbonato ou íons bicarbonato também podem ser fornecidos por carbonato ou bicarbonato, ou sais desses, ou gás de dióxido de carbono. Exemplos específicos dos sais de carbonato ou bicarbonato incluem carbonato de magnésio, carbonato de amônio, carbonato de sódio, carbonato de potássio, bicarbonato de amônio, bicarbonato de sódio e bicarbonato de potássio. Os íons carbonato ou íons bicarbonato são adicionados com uma concentração de 1 para 500 mM, preferivelmente 2 para 300 mM, e mais preferivelmente, 3 para 200 mM. Quando a solução contiver gás de dióxido de carbono, a quantidade de gás de

dióxido de carbono a ser contida é de 50 mg a 25 g; preferivelmente, de 100 mg a 15 g e, mais preferivelmente, de 150 mg a 10 g por litro de solução.

5 O pH da solução de reação pode ser ajustado por meio do acréscimo de carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, carbonato de potássio, bicarbonato de potássio, carbonato de magnésio, hidróxido de sódio, hidróxido de cálcio, hidróxido de magnésio, ou semelhante. O pH para a reação é geralmente de 5 a 10, preferivelmente de 6 a 9,5; assim
10 sendo, o pH da solução de reação é ajustado, se necessário, dentro da faixa mencionada acima, com um material alcalino, carbonato, uréia, ou semelhante, mesmo durante a reação.

A temperatura ótima para o crescimento das bactérias a serem usadas na reação fica geralmente na faixa de 25°C a
15 35°C. A temperatura no momento da reação fica geralmente na faixa de 25°C a 40°C, e preferivelmente, na faixa de 30°C a 37°C. A quantidade de células bacterianas a serem usadas na reação não é especificamente limitada, mas a quantidade é ajustada na faixa de 1 a 700 g/L, preferivelmente de 10 a
20 500 g/L e, mais preferivelmente, de 20 a 400 g/L. O período de tempo da reação é preferivelmente de 1 a 168 horas e, mais preferivelmente, de 3 a 72 horas.

Quando se realiza a cultura semeada de bactérias, é preciso fornecer oxigênio por aeração e agitação. Por outro
25 lado, uma reação para produzir um ácido orgânico como o ácido succínico pode ser realizada com aeração e agitação, ou pode ser realizada sob condição anaeróbica, sem aeração e sem fornecimento de oxigênio. Aqui, o termo "condição anaeróbica" significa que uma reação é conduzida ao mesmo
30 tempo em que o nível de oxigênio dissolvido é mantido baixo na solução. Nesse caso, é desejável que se conduza a reação com níveis de oxigênio dissolvido de 0 a 2 ppm, preferivelmente de 0 a 1 ppm e, mais preferivelmente, de 0 a 0,5 ppm. Para tal fim, podem ser usados métodos que

incluem conduzir a reação com um vaso hermeticamente selado sem aeração; conduzir a reação ao mesmo tempo em que se fornece um gás inerte, tal como gás nitrogênio, e realizar aeração com um gás inerte contendo gás de dióxido de carbono.

A reação bacteriana mencionada acima leva à geração e acumulação, em uma solução de reação, de ácidos orgânicos como o ácido succínico, ácido fumárico, ácido málico, ou ácido pirúvico. Os ácidos orgânicos acumulados na solução de reação (solução de cultura) podem ser coletados da solução de reação de acordo com procedimentos convencionais. Especificamente, os ácidos orgânicos podem ser coletados removendo-se a substância sólida, como células bacterianas, por meio de centrifugação, filtração, ou semelhante e dessalgando-se o restante com uma resina trocadora de íons ou semelhante, seguido por cristalização ou purificação da solução por cromatografia de coluna.

Além disso, na presente invenção, após a produção dos ácidos orgânicos pelo método da presente invenção descrito acima, pode-se conduzir uma reação de polimerização usando os ácidos orgânicos obtidos como uma matéria prima para produzir polímeros contendo ácidos orgânicos.

Nos últimos anos, ao mesmo tempo em que o número de produtos industriais favoráveis ao ambiente está aumentando, polímeros preparados usando-se matérias primas de origem vegetal têm atraído atenção. O ácido succínico a ser produzido na presente invenção pode ser processado como polímero, tal como poliéster e poliamida, e usado como tal. Exemplos específicos de polímeros contendo ácido succínico incluem os poliésteres de ácido succínico obtidos por meio da polimerização entre um diol, tal como butanodiol ou etileno glicol e ácido succínico, e poliamidas de ácido succínico obtidas por meio da polimerização entre uma diamina, tal como hexametilenodiamina e ácido succínico.

Além disso, o ácido succínico obtido pelo método de produção da presente invenção, ou uma composição contendo o ácido succínico, podem ser usados em aditivos alimentares, produtos farmacêuticos, cosméticos e semelhantes.

5

Exemplo 1

Preparação de Cepa Amplificada com Plasmídeo de ODH

(A) Extração de DNA Genômico da Cepa MJ233

Em 10 mL de meio A [2 g de uréia, 7 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de K_2HPO_4 , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot 4-5\text{H}_2\text{O}$, 200 μg de biotina, 100 μg de tiamina, 1 g de extrato de levedura, 1 g de ácido casamino, e 20 g de glicose dissolvidos em 1 L de água destilada], a cepa MJ-233 de *Brevibacterium flavum* foi cultivada até a última etapa da fase logarítmica e as células bacterianas foram coletadas por centrifugação (10.000 x g, 5 minutos). As células bacterianas obtidas foram suspensas, a uma concentração de 10 mg/mL, em 0,15 mL de uma solução contendo uma lisozima, 10 mM NaCl, 20 mM tampão Tris (pH 8,0) e 1 mM EDTA·2Na. Em seguida, adicionou-se proteinase K à suspensão, de modo a obter-se uma concentração final de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e o resultado foi mantido a 37°C por uma hora. Acrescentou-se ainda dodecil sulfato de sódio, de modo a obter-se uma concentração final de 0,5% e o resultado foi mantido a 50°C por 6 horas para bacteriólise. Ao lisato, foi adicionada uma solução de uma quantidade equivalente de fenol e clorofórmio, e a mistura foi lentamente agitada à temperatura ambiente, por 10 minutos. Subseqüentemente, a mistura toda foi centrifugada (5.000 x g por 20 minutos a uma temperatura de 10 a 12°C) e a fração sobrenadante foi coletada. Acrescentou-se acetato de sódio de modo a alcançar 0,3 M e 2 equivalentes de etanol foram acrescentados e misturados. A mistura foi submetida a centrifugação (15.000 x g por 2 minutos) para coletar-se o precipitado. O precipitado coletado foi lavado

com etanol 70% e, então, foi secado por sopro de ar. Ao DNA obtido, foram adicionados 5 mL de uma solução de 10 mM tampão Tris (pH 7,5) contendo 1 mM de EDTA·2Na, e deixou-se descansar durante a noite, a 4°C. O DNA obtido foi usado
5 como DNA "template" para a PCR conduzida mais tarde.

(B) Clonagem do Gene da ODH e Construção de um Plasmídeo
para Aumento

O gene (odhA), incluindo uma região promotora de 2-oxoglutarato desidrogenase componente do complexo E1,
10 derivado da cepa MJ-233 de *Brevibacterium flavum* foi obtido realizando-se PCR, usando o DNA preparado em (A) acima como "template", e DNAs sintetizados (SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:2), que foram configurados com base na sequência do gene (uma fita complementar a 1172498-1176271 do No. de Acesso
15 BA000036 da Base de Dados do GenBank) da cepa ATCC13032 de *Corynebacterium glutamicum*, cuja sequência genômica inteira foi relatada. Uma solução de reação foi composta com 1 µL do DNA "template", 0,5 µL de PfxDNA polimerase (fabricada por Invitrogen Corporation), o tampão anexo na concentração
20 1, 0,4 µL de cada um dos "primers", 1 mM MgSO₄, e 0,2 µM dNTPs, e o volume total foi ajustado em 50 µL. A temperatura de reação e as condições da reação foram as seguintes: foi usado o ciclador térmico para DNA PTC-200 (fabricado por MJ Research Inc.), e um ciclo de 94°C por 10
25 segundos e 68°C por 5 minutos foi repetido 35 vezes, sendo a solução de reação mantida em 94°C por 2 minutos no primeiro ciclo e mantida em 68°C por 10 minutos no ciclo final. Após a conclusão da reação de PCR, 0,1 µL de Takara Ex Taq (TAKARA BIO INC.) foi acrescentado, e a mistura foi
30 ainda mantida a 72°C por 30 minutos. O produto amplificado foi confirmado como segue: o produto amplificado foi separado sendo submetido a eletroforese em gel de agarose 0,75% (SeaKem GTG agarose, fabricada por FMC Bioproducts Inc.); então, foi visualizado sendo submetido a coloração

com brometo de etídio e, desse modo, foi detectado um fragmento de cerca de 4,4 kb. O fragmento de DNA-alvo foi coletado do gel usando-se o QIAQuick Gel Extraction Kit (fabricado por QIAGEN GmbH). O fragmento de DNA coletado
 5 foi misturado com um vetor de clonagem do produto da PCR, pT7Blue T-Vector (fabricado por Novagen Inc.) e ambos foram ligados entre si usando-se o Ligation Kit ver. 2 (TAKARA BIO INC.). O DNA de plasmídeo obtido foi usado para transformar *E. coli* (cepa DH5alfa). A *E. coli* recombinante
 10 assim obtida foi espalhada em um meio agar LB contendo 50 µg/mL ampicilina e 50 µg/mL X-Gal. O clone que formou uma colônia branca no meio foi cultivado em um meio líquido por um método convencional, seguido por purificação do DNA de plasmídeo. O DNA de plasmídeo obtido foi clivado com as
 15 enzimas de restrição SseI e BamHI e, desse modo, detectou-se um fragmento inserido de cerca de 4.4 kb. O DNA de plasmídeo obtido foi denominado pODH1.0.

(C) Construção de Vetor de Expressão para Bactéria

Corineforme que Tem Compatibilidade com pTZ4

20 (i) Introdução de gene resistente à estreptomicina/espectinomicina

Um vetor para bactéria corineforme que é capaz de coexistir com pTZ4 foi construído substituindo-se o gene resistente à canamicina do vetor plasmídeo pC3 (*Plasmid* 36
 25 62(1996)) que tem uma região de replicação compatível com pTZ4 com o gene resistente à estreptomicina/espectinomicina. Deve-se notar que pTZ4 é o plasmídeo original de um plasmídeo para amplificação da PC introduzido na cepa MJ233/PC/ΔLDH descrita abaixo.

30 O gene resistente à estreptomicina/espectinomicina (*E. coli* Tn7) foi obtido por PCR na qual o vetor binário pLAN421 (*Plant Cell Reports* 10, 286 (1991)) para transformação de vegetal, que carrega o gene, foi usado como "template".

Uma solução de reação foi composta com 10 ng do DNA "template", 0,2 µL de PfxDNA polimerase (fabricada por Invitrogen Corporation), o tampão anexo com concentração 1, 0,3 µL de cada um dos "primers" (DNAs sintetizados mostrados na SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:11), 1 mM MgSO₄ e 0,25 µM dNTPs, e o volume total foi ajustado em 20µL.

A temperatura da reação e as condições de reação foram como segue: foi utilizado o ciclador térmico de DNA PTC-200 (fabricado por MJ Research Inc.), e um ciclo de 94°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos e 72°C por 60 segundos foi repetido 20 vezes, sendo que a solução de reação foi mantida em 94°C por 1 minuto e 20 segundos no primeiro ciclo e foi mantida em 72°C por 2 minutos no ciclo final.

O produto amplificado foi confirmado como segue: o produto amplificado foi separado sendo submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8% (agarose Seakem GTG: fabricada por FMC Bioproducts Inc.); o produto foi visualizado sendo submetido a coloração com brometo de etídio, e um fragmento de 937 bp foi detectado. O fragmento de DNA-alvo foi coletado do gel usando-se o QIAQuick Gel Extraction Kit (fabricado por QIAGEN GmbH). O fragmento de DNA coletado foi submetido a fosforilação no terminal 5' com T4 Polynucleotide Kinase (TAKARA BIO INC.).

Após o pC3 ser clivado com as enzimas de restrição HindIII e NruI, ambas as extremidades foram cegadas com Klenow Fragment (TAKARA BIO INC.). O fragmento de DNA foi misturado com os genes resistentes a estreptomicina/espectinomicina preparados conforme descrição acima, e o fragmento e o gene foram ligados um ao outro usando-se o Ligation Kit ver. 2 (TAKARA BIO INC.). O DNA de plasmídeo obtido foi usado para transformar *E. coli* (cepa DH5alfa) e 50 µg/mL de espectinomicina foram espalhados sobre um meio agar LB. A colônia obtida foi cultivada em um meio líquido e o DNA de plasmídeo foi preparado por um método

convencional. Como resultado da análise de PCR mencionada acima na qual os DNAs sintetizados de SEQ ID NO:10 e SEQ ID NO:11 foram usados como "primers", a inserção do gene resistente à estreptomicina/espectinomicina foi confirmada.

5 O DNA de plasmídeo obtido foi denominado pC3.

Em seguida, um fragmento de DNA foi preparado clivando-se o pC3 com as enzimas de restrição BamHI e PvuII, e ambas as extremidades do fragmento do DNA foram cegadas com Klenow Fragment. O fragmento de DNA foi
10 misturado com pBglIII Linker (TAKARA BIO INC.: CAGATCTG) para realizar a ligação usando-se o Ligation Kit ver. 2 (TAKARA BIO INC.). O DNA de plasmídeo obtido foi usado para transformar *E. coli* (cepa DH5alfa) e a *E. coli* transformada foi espalhada sobre um meio agar LB contendo 50 µg/ml de
15 espectinomicina. A colônia obtida foi cultivada em um meio líquido e o DNA de plasmídeo foi preparado por um método convencional. Um DNA de plasmídeo que podia ser clivado com a enzima de restrição foi selecionado e denominado pC3.1.

(ii) Introdução de um sítio de multiclonagem

20 O gene de alfa-peptídeo incluindo o sítio de multiclonagem LacZ foi preparado por PCR usando-se plasmídeo de *E. coli*, pT7Blue (Novagen Inc.) como "template", e os DNAs sintetizados mostrados nas SEQ ID NO:12 e SEQ ID NO:13 como "primers".

25 Uma solução de reação foi composta com 10 ng do DNA "template", 0,2 µL de PfxDNA polimerase (fabricada por Invitrogen Corporation), o tampão anexo em concentração 1, 0,3 µM de cada um dos "primers", 1 mM de MgSO₄, e 0,25 µM dNTPs, e o volume total foi ajustado em 20 µL.

30 A temperatura de reação e as condições da reação foram como segue: foi usado o ciclador térmico de DNA PTC-200 (fabricado por MJ Research Inc.), e um ciclo de 94°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos e 72°C por 30 segundos foi repetido 20 vezes, sendo a solução de reação mantida em

94°C por 1 minuto e 20 segundos no primeiro ciclo e em 72°C por 2 minutos no ciclo final.

O produto amplificado foi confirmado como segue: o produto amplificado foi separado, sendo submetido a eletroforese em gel de agarose 1% (agarose SeaKem GTG: fabricada por FMC Bioproducts Inc.); o produto foi visualizado sendo submetido a coloração com brometo de etídio, e um fragmento de 5,777 bp foi detectado. O fragmento de DNA alvo foi coletado do gel usando-se o QIAQuick Gel Extraction Kit (fabricado por QIAGEN GmbH). O fragmento de DNA coletado passou por fosforilação no terminal 5' com T4 Polynucleotide Kinas (TAKARA BIO INC.).

Após o pC3.1 ter sido clivado com as enzimas de restrição PstI e HpaI, ambas as extremidades do fragmento de DNA foram cegadas com Klenow Fragment (TAKARA BIO INC.). O fragmento de DNA foi misturado com o fragmento de gene de alfa-peptídeo preparado conforme a descrição acima, seguido por ligação usando-se o Ligation Kit ver. 2 (TAKARA BIO INC.). O DNA de plasmídeo obtido foi usado para transformar *E. coli* (cepa DH5alfa) e a *E. coli* transformada foi espalhada sobre um meio agar LB contendo 50 µg/mL de X-Gal e 50 µg/mL de espectinomicina. Entre as colônias obtidas, foram selecionadas as colônias azuis. As colônias foram cultivadas em um meio líquido e os DNAs de plasmídeo foram então preparados por um método convencional. Foi confirmado que cada um dos DNAs de plasmídeo tinha um sítio de clivagem clivado por EcoRV, sendo o sítio derivado do sítio de multiclonagem LacZ inserido. O DNA de plasmídeo obtido foi denominado pC3.14 (a Figura 1 mostra o procedimento para a construção).

Em seguida, um fragmento de DNA de cerca de 4,4 kb obtido clivando-se o pODH1.0 com as enzimas de restrição SseI e BamHI foi separado por eletroforese em gel de agarose 0,75% e coletado. O fragmento obtido foi misturado

com um fragmento de DNA preparado clivando-se o plasmídeo pC3.14 com as enzimas de restrição PstI e BamHI, seguido por ligação usando-se o Ligation Kit ver. 2 (TAKARA BIO INC.). O DNA de plasmídeo obtido foi usado para transformar
5 *E. coli*, cepa DH5alfa. A *E. coli* transformada foi espalhada sobre um meio agar LB contendo 50 µg/mL de espectinomicina e 50 µg/mL de X-Gal. Uma colônia branca que cresceu no meio foi cultivada em um meio líquido por um método convencional, seguido por purificação de um DNA de
10 plasmídeo. O plasmídeo de DNA obtido foi clivado com as enzimas de restrição SseI e BamHI, selecionado-se, desse modo, um plasmídeo contendo um fragmento de cerca de 4,4 kb, que foi denominado pODH3.2 (Figura 2).

(D Preparação de Cepa Amplificada com Plasmídeo de ODH

15 Um DNA de plasmídeo (pODH3.2) para aumento da ODH foi introduzido na *Brevibacterium flavum*, cepa MJ233/PC/ΔLDH (uma cepa na qual o gene de PC foi amplificado e o gene de LDH foi rompido: JP-A-2005-95169: WO 2005/21770) pelo método de pulso elétrico (*Res Microbiol*, Vol. 144, p. 181-
20 185, 1993). O transformante obtido foi espalhado sobre um meio agar LBG [10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl, 20 g de glicose e 15 g de agar, dissolvidos em 1 L de água destilada] contendo 10 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de canamicina. Cada uma das cepas
25 que cresceu no meio foi cultivada em um meio líquido por um método convencional. Então, os DNAs de plasmídeo foram extraídos e analisados por clivagem com enzimas de restrição. Como resultado, foi confirmado que a cepa carregava pODH3.2 e ela foi denominada *Brevibacterium*
30 *flavum* cepa MJ233/pODH/PC/ΔLDH.

(E) Medição da Atividade Enzimática da ODH

A cepa *Brevibacterium flavum* MJ233/pODH/PC/ΔLDH mencionada acima foi cultivada durante a noite em 100 ml de meio A contendo 2% de glicose. 50 ml da cultura obtida

foram submetidos a centrifugação a 4000 rpm a 4°C por 10 minutos, para coleta de células. Depois disso, a cepa foi lavada duas vezes com 30 mL de tampão 100 mM TES-NaOH (pH 7,5). As células bacterianas lavadas foram suspensas em 10 mL de tampão A (tampão 100 mM TES-NaOH (pH 7,5), 30% glicerol) e 1 mL da suspensão de células bacterianas foi transferido para um tubo Falcon de 15 ml para lise, e foi adicionado 1 mg de glóbulos de vidro. A suspensão de células bacterianas foi submetida a lise ultra-sônica (um ciclo de 1 minuto de sonicação em nível Alto seguido por 2 minutos de quebra foi repetido 7 vezes) com Bioruptor (fabricado por Cosmo Bio Co., Ltd.) na condição de resfriamento a 4°C. A solução de lise das células bacterianas foi submetida a centrifugação a 4°C a 18.000 x g por 5 minutos para remoção dos glóbulos e foi ainda submetida a centrifugação a 18.000 x g por 25 minutos. O sobrenadante obtido foi usado como uma fração de enzima bruta para medir a atividade enzimática da ODH. A concentração de proteína foi medida com Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., #500-0006), usando-se uma concentração BSA como padrão.

A atividade da ODH foi medida como segue, com referência ao método descrito em *Agric Biol Chem*, 44(8), 1897-1904, 1980, I Shiio e K Ujigawa-Takeda. Primeiramente, uma solução de reação foi preparada de modo a conter o seguinte, na concentração final: 100 mM tampão de NaOH TES (DOJINDO LABORATORIES, #344-02653) (pH 7,7); 0,2 mM coenzima A (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., #306-50481); 0,3 mM pirofosfato de tiamina (Sigma-Aldrich Corporation, #8754); 5 mM 2-oxoglutarato (Sigma-Aldrich Corporation, #305-72-6); 3 mM L-cisteína (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., #033-05272) 5mM MgCl₂, 1 mM 3-acetilpiridina adenina dinucleotídeo (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., #44047000). Depois que a solução de

reação foi transferida para uma "cuvette" para medição, a solução de enzima bruta foi adicionada para dar início a uma reação. A elevação da absorvência (A_{365}) foi medida em 365 nm. 1U foi definido como quantidade de enzimas quando A_{365} aumentou em 1 por minuto. A atividade específica de ODH da cepa *Brevibacterium flavum* MJ233/pODH/PC/ Δ LDH foi medida pelo método mencionado acima como 0,028 U/mg de proteína. Por outro lado, as células bacterianas obtidas cultivando-se a cepa *Brevibacterium flavum* MJ233/PC/ Δ LDH como cepa-mãe de maneira semelhante, mostraram uma atividade específica de ODH de 0,009 U/mg de proteína. Como resultado, foi confirmado que a atividade da ODH aumentou cerca de 3 vezes na cepa amplificada pelo plasmídeo da ODH.

Exemplo 2

15 Avaliação da Cepa Amplificada com o Plasmídeo da ODH

(A) Condição Isenta de Amônia

Em um frasco cônico de 500 mL foram adicionados 100 mL de um meio obtido dissolvendo-se 4 g de uréia, 14 g de sulfato de amônio, 0,5 g de fosfato monopotássico, 0,5 g de fosfato de potássio dibásico, 0,5 g de sulfato de magnésio heptaidrato, 20 mg de sulfato ferroso heptaidrato, 20 mg de sulfato de manganês hidrato, 200 μ g de D-biotina, 200 μ g de hidrocloreto de tiamina, 5 g de extrato de levedura, e 5 g de ácido casamino em 1000 mL de água destilada, meio esse que foi aquecido a 120°C por 20 minutos para esterilização e depois foi resfriado até a temperatura ambiente. Foram então adicionados 4 mL de uma solução aquosa de glicose a 50% previamente esterilizada, 50 μ L de solução aquosa de canamicina a 5% filtrada assepticamente e 50 μ L de solução aquosa de estreptomicina a 2% assepticamente filtrada. Então, a cepa *Brevibacterium flavum* MJ233/pODH/PC/ Δ LDH preparada em (D) do Exemplo 1 foi inoculada no meio acima para cultura semeada a 30°C, por 24 horas.

Em um fermentador de 5 L, foi adicionado um meio

obtido dissolvendo-se 42 g de sulfato de amônio, 1,5 g de fosfato monopotássico, 1,5 g de fosfato de potássio dibásico, 1,5 g de sulfato de magnésio.heptaidrato, 60 mg de sulfato ferroso heptaidrato, 60 mg de sulfato de manganês hidrato, 600 µg de D-biotina, 600 µg de hidrocloreto de tiamina, 15 g de extrato de levedura, 15 g de ácido casamino e 1 mL de um anti-espumante (Adekanol LG294, fabricado por Asahi Denka Co., Ltd.) em 2.500 mL de água destilada. Esse meio foi então aquecido a 120°C por 20 minutos para esterilização e, então, foi resfriado até temperatura ambiente. Foram adicionados 500 mL de solução aquosa de glicose a 12%, previamente esterilizada, 1,5 mL de solução aquosa de canamicina a 5% filtrada assepticamente e 1,5 mL de solução aquosa de estreptomicina a 2% assepticamente filtrada. 100 mL da cultura semeada mencionada acima foram acrescentados ao meio e mantidos a 30°C, seguido por cultura principal por 16 horas com pH 7,5, mantido usando-se 2 M carbonato de amônio, com aeração de 500 mL por minuto, e agitação a 500 rpm.

Em um frasco cônico de 500 mL, foi acrescentado um meio obtido dissolvendo-se 0,2 g de sulfato de magnésio heptaidrato, 8 mg de sulfato ferroso heptaidrato, 8 mg de sulfato de manganês hidrato, 80 µg de D-biotina, 80 µg de hidrocloreto de tiamina, e 1 mL de um anti-espumante (Adekanol LG294, fabricado por Asahi Denka Co., Ltd.) em 200 mL de água destilada. O meio foi então aquecido a 120°C por 20 minutos para esterilização e, então, resfriado até temperatura ambiente. O meio foi adicionado às células obtidas centrifugando-se a cultura principal mencionada acima a 8.000 rpm por 5 minutos, e as células foram novamente suspensas de modo que O.D. (660 nm) tornou-se 60. 200 mL da suspensão e 200 mL de solução de glicose a 20% esterilizada previamente foram carregados em uma jarra fermentadora de 1L e misturados, sendo a mistura resultante

mantida em 35°C. A mistura foi submetida a uma reação com pH 7,6 mantido com 2 M carbonato de amônio, na condição isenta de aeração e agitação a 400 rpm. A reação foi concluída cerca de 47 horas após o seu início.

5 Como resultado, na cepa *Brevibacterium flavum* MJ233/pODH/PC/ Δ LDH, o rendimento de ácido succínico aumentou em 3,4% e a quantidade de produção de aminoácidos por ácido succínico diminuiu em 47%, em comparação com a cepa MJ233/PC/ Δ LDH. Isto é, descobriu-se que o aumento da
10 ODH teve efeitos significativos de melhora no rendimento de ácido succínico e de redução na produção de aminoácidos.

(B) Condição Isenta de Sódio

Em um frasco cônico de 500 mL, foram carregados 100 mL de um meio obtido dissolvendo-se 4 g de uréia, 14 g de
15 sulfato de amônia, 0,5 g de fosfato monopotássico, 0,5 g de fosfato de potássio dibásico, 0,5 g de sulfato de magnésio heptaidrato, 20 mg de sulfato ferroso heptaidrato, 20 mg de sulfato de manganês hidrato, 200 μ g de D-biotina, 200 μ g de hidrocloreto de tiamina, 5 g de extrato de levedura e 5 g
20 de ácido casamino em 1000 mL de água destilada. O meio foi então aquecido a 120°C por 20 minutos para esterilização e, então, foi resfriado até temperatura ambiente. 4 mL de solução aquosa de glicose a 50% previamente esterilizada, 50 μ L de solução aquosa de canamicina filtrada
25 assepticamente e 50 μ L de solução aquosa de estreptomicina a 2% filtrada assepticamente foram adicionados ao meio. Então, a cepa *Brevibacterium flavum* MJ233/pODH/PC/ Δ LDH preparada em (D) do Exemplo 1 foi inoculada no meio para cultura semeada a 30°C por 24 horas.

30 Em um fermentador de 5 L, foi carregado um meio obtido dissolvendo-se 42 g de sulfato de amônio, 1,5 g de sulfato monopotássico, 1,5 g de fosfato de potássio dibásico, 1,5 g de sulfato de magnésio heptaidrato, 60 mg de sulfato ferroso heptaidrato, 60 mg de sulfato de manganês hidrato,

600 µg de D-biotina, 600 µg de hidrocloreto de tiamina, 15 g de extrato de levedura, 15 g de ácido casamino, e 1 mL de um anti-espumante (Adekanol LG294, fabricado por Asahi Denka Co., Ltd.) em 2500 mL de água destilada. O meio foi
5 então aquecido a 120° por 20 minutos para esterilização e então foi resfriado até temperatura ambiente. Acrescentaram-se então 500 mL de solução aquosa de glicose a 12% previamente esterilizada, 1,5 mL de solução aquosa de canamicina a 5% assepticamente filtrada e 1,5 mL de solução
10 aquosa de estreptomicina a 2%, assepticamente filtrada. Então, 100 mL do meio de cultura semeada mencionado acima foram acrescentados, e o resultado foi mantido em 30°C, seguido por cultura principal por 16 horas com pH 7,5, mantido usando-se 2 M de carbonato de amônio, com aeração
15 de 500 mL por minuto e agitação a 500 rpm.

Em um frasco cônico de 500 mL, carregou-se um meio obtido dissolvendo-se, em 200 mL de água destilada, 0,2 g de sulfato de magnésio heptaidrato, 8 mg de sulfato ferroso heptaidrato, 8 mg de sulfato de manganês hidrato, 80 µg de
20 D-biotina, 80 µg de hidrocloreto de tiamina, e 1 mL de um anti-espumante (Adekanol LG294, fabricado por Asahi Denka Co., Ltd.). O meio foi então aquecido a 120°C por 20 minutos para esterilização e, depois, resfriado à temperatura ambiente. O meio foi acrescentado às células
25 bacterianas coletadas por centrifugação da cultura obtida pela cultura principal mencionada acima a 8.000 rpm por 5 minutos, e as células foram suspensas novamente, de modo que O.D. (660 nm) tornou-se 60. 200 mL da suspensão e 200 mL de solução de glicose a 20% previamente esterilizada
30 foram carregados em uma jarra fermentadora de 1 L, foram misturados e a mistura resultante foi mantida a 35°C. A reação foi realizada com pH 7,6, mantido usando-se 2 M carbonato de amônia, em condição sem aeração, e agitação a 400 rpm. A reação foi concluída cerca de 47 horas após o

seu início.

Como resultado, na cepa *Brevibacterium flavum* MJ233/pODH/PC/ Δ LDH o rendimento de ácido succínico aumentou em 3,8% e a quantidade da produção de ácido acético por ácido succínico diminuiu em 27%, em comparação com a cepa MJ233/PC/ Δ LDH. Isto é, descobriu-se que o aumento da ODH teve efeitos significativos de melhora do rendimento do ácido succínico e de redução da produção de ácido acético.

Exemplo 3

10 O Efeito do Aumento da ODH em uma Cepa na qual a Produção de Ácido Acético foi Reduzida

(A) Preparação de uma Cepa ODH-Amplificada

Avaliou-se o efeito da 2-oxoglutarato desidrogenase aumentada sobre uma cepa na qual a produção de ácido acético foi reduzida. Como cepa na qual a produção de ácido acético foi reduzida, usou-se uma cepa 2256 Δ (ldh, pta, ack, ach, poxB). A cepa foi obtida diminuindo-se cada uma das atividades da lactato desidrogenase (ldh), acetil-CoA hidrolase (ach), fosfotransacetilase (pta), acetato quinase (ack), e piruvato oxidase (poxB) na *Brevibacterium lactofermentum* 2256 (*Corynebacterium glutamicum* ATCC13869) (WO 2005/113744 e WO 2005/113745).

Como plasmídeo para amplificação da ODH, foi usado o pPKS-X (WO 95/34672) contendo o gene da ODH; o plasmídeo pPK4 (WO 95/34672), que é o vetor correspondente, foi usado como controle. A cepa *Brevibacterium lactofermentum* 2256 Δ (ldh, pta, ack, ach, poxB) foi transformada pelo método de pulso elétrico. A cepa transformada foi espalhada sobre um meio agar CM-Dex contendo 25 μ g/mL de canamicina (contendo 1,5% agar em 5 g/L glicose, 10 g/L polipeptona, 10 g/L extrato de levedura, 1 g/L K_2HPO_4 , 0,4 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g/L $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, 3 g/L uréia, e 1,2 g/L hidrolisado de soja, e tendo pH 7,5 (KOH)) e foi cultivada a 31,5°C por cerca de 24 horas. Então a colônia obtida foi

purificada e o plasmídeo foi extraído por um método convencional. Como resultado, confirmou-se que o plasmídeo-alvo havia sido introduzido. Uma cepa obtida introduzindo-se o plasmídeo com ODH amplificada na cepa em que a
5 produção de ácido acético foi reduzida foi denominada 2256 Δ (ldh, pta. ack, ach, poxB)/pPKS-X. Uma cepa obtida introduzindo-se o vetor foi denominada 2256 Δ (ldh, pta. ack, ach, poxB)/pPK4.

(B) Produção de Ácido Succínico pela Cepa ODH-Amplificada

10 A cepa na qual o plasmídeo ODH-amplificado descrito acima foi introduzido (2256 Δ (ldh, pta. ack, ach, poxB)/pPKS-X) e a cepa na qual o vetor descrito acima foi introduzido (2256 Δ (ldh, pta. ack, ach, poxB)/pPK4) foram cultivadas em meio agar CM-DEX. As células bacterianas
15 obtidas foram inoculadas em 3 ml de meio semeado (20 g/L glicose, 14 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g/L KH_2PO_4 , 0,5 g/L K_2HPO_4 , 0,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4 g/L uréia, 0,02 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 200 $\mu\text{g/L}$ biotina, 200 $\mu\text{g/L}$ VB1·HCl, 1 g/L extrato de levedura e 1 g/L ácido casamino). As células
20 bacterianas foram cultivadas em tubos de teste a 31,5°C por cerca de 8 horas sob condição aeróbica com agitação.

Em seguida, em cada tubo de teste foram acrescentados 3 ml do meio principal (200 g/L de glicose foram filtrados e carbonato de magnésio esterilizado com calor seco foi
25 misturado à glicose filtrada de modo a se obter uma concentração final de 143 g/L). Os tubos de teste foram selados com rolhas de silicone para impedir aeração, e foram submetidos a cultivo para produção de ácido succínico a 31,5°C por cerca de 48 horas com agitação. A quantidade
30 de ácido succínico produzida foi analisada por cromatografia líquida. Como coluna, foram usadas duas peças de Rezex ROA-Organic Acid H+ (Phenomex Inc.) ligadas entre si em tandem, e as amostras foram eluídas com 5 mM de ácido toluenosulfônico a 50°C. O eluato foi neutralizado com 20

mM de solução aquosa Bis-Tris contendo 5 mM de ácido p-toluenosulfônico e 100 μ M de EDTA. A condutividade elétrica da mistura foi medida por CDD-10AD (Shimadzu Corporation) para medir o ácido succínico. Vários espécimes de cada cepa bacteriana foram submetidos a avaliação e os resultados médios estão na Tabela 1. A coluna "Rendimento(%)" mostra o rendimento de ácido succínico em relação à glicose e a coluna " α -KG/AS(%)" mostra a proporção da concentração de α -cetoglutarato (α -KG) em relação ao ácido succínico (AS) no meio de cultura.

Tabela 1. Produção de Ácido Succínico pela cepa ODH-Aumentada

Nome da Cepa Bacteriana	Rendimento(%)	α -KG/AS(%)
2256 Δ (ldh, pta, ack, poxB, ach)/(pPK4)	48,7	3,0
2256 Δ (ldh, pta, ack, poxB, ach)/(pPKS-X)	51,4	1,6

No caso da cepa 2256 Δ (ldh, pta, ack, poxB, ach)/(pPKS-X) usada como cepa ODH-amplificada, o rendimento aumentou em cerca de 3% na média e a quantidade de α -KG como produto secundário diminuiu para cerca da metade em comparação com a cepa 2256 Δ (ldh, pta, ack, poxB, ach)/(pPK4) como controle. Com base nesses resultados, descobriu-se que, em uma bactéria produtora de ácido succínico que foi modificada de modo que a produção de ácido acético diminuísse, o aumento da atividade da ODH contribuiu para uma diminuição da produção de α -KG como produto secundário e para um aumento da produção de ácido succínico.

25 Aplicabilidade Industrial

De acordo com o método de produção da presente invenção, um ácido orgânico como o ácido succínico pode ser produzido rapidamente, com alto grau de eficiência. O ácido

orgânico obtido, tal como o ácido succínico, pode ser usado como aditivo alimentar, ou em produtos farmacêuticos, cosméticos, e semelhantes. Além disso, um polímero contendo ácido orgânico também pode ser produzido por meio de uma

5 reação de polimerização, usando-se o ácido orgânico obtido como matéria prima.



PI0707674-6

REIVINDICAÇÕES

- 5 1. Uma bactéria capaz de produzir ácido orgânico, caracterizada por:
a dita bactéria ser modificada de modo que a atividade de 2-oxoglutarato dehidrogenização seja aumentada se comparada com a atividade de 2-oxoglutarato dehidrogenização a partir de material não modificado.
- 10 2. Uma bactéria capaz de produzir ácido orgânico, caracterizada por:
a dita bactéria ser modificada de modo que a atividade de produção de ácido acético decresça, e a atividade de 2-oxoglutarato dehidrogenização seja aumentada se comparada com a atividade de 2-oxoglutarato dehidrogenização a partir de material não modificado.
- 15 3. A bactéria de acordo com a reivindicação 2, caracterizada por:
a produção de ácido acético ser diminuída pelo decréscimo da atividade acetato quinílica e/ou da atividade fosfotransacetílica.
- 15 4. A bactéria de acordo com a reivindicação 2, caracterizada por:
a produção de ácido acético ser diminuída pelo decréscimo da atividade acetil-CoA hidroxílica.
- 20 5. A bactéria de acordo com a reivindicação 2, caracterizada por:
a produção de ácido acético ser diminuída pelo decréscimo da atividade piruvato oxidílica.
- 20 6. A bactéria de acordo com qualquer das reivindicações de 1 a 5, caracterizada por:
a dita bactéria ser posteriormente modificada de modo que a atividade lactato hidrogeneizadora seja diminuída.
- 25 7. A bactéria de acordo com qualquer das reivindicações de 1 a 6, caracterizada por:
a dita bactéria ser posteriormente modificada de modo que a atividade piruvato carboxílica seja aumentada.
- 30 8. A bactéria de acordo com qualquer das reivindicações de 1 a 7, caracterizada por:
a dita bactéria ser selecionada dentre o grupo cujos nomes científicos são: bactéria corineforme, *Bacillus bacterium*, *Rhizobium bacterium*,

Escherichia bacterium, *Lactobacillus bacterium* e *Saccinobacillus bacterium*.

- 5 9. A bactéria de acordo com qualquer das reivindicações de 1 a 8, caracterizada por:
o ácido orgânico ser o ácido succínico.
- 10 10. Um processo para produção de ácido orgânico, caracterizado por:
compreender as etapas de:
permitir à bactéria de acordo com qualquer das reivindicações de 1 a 9 ou a uma célula tratada dela derivada a agir como matéria prima numa reação de solução contendo um íon carbonato, ou um íon bicarbonato, ou gás dióxido de carbono para daí produzir um ácido orgânico; e
coletar o ácido orgânico.
- 15 11. O processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por:
à bactéria ou à célula tratada dela derivada ser permitida agir como matéria prima orgânica sob uma atmosfera anaeróbica.
- 20 12. O processo de acordo com uma das reivindicações 10 ou 11, caracterizado por:
a matéria prima orgânica ser glucose ou sucrose.
- 25 13. O processo de acordo com qualquer das reivindicações de 10 a 12, caracterizado por:
o ácido orgânico ser o ácido succínico.
14. Um processo para produzir um ácido orgânico contendo polímero, caracterizado por:
compreender as etapas de:
produzir um ácido orgânico pelo processo de acordo com qualquer das reivindicações de 10 a 13; e
sujeitar o ácido orgânico obtido com a matéria prima a uma reação de polimerização.

FIGURA 1

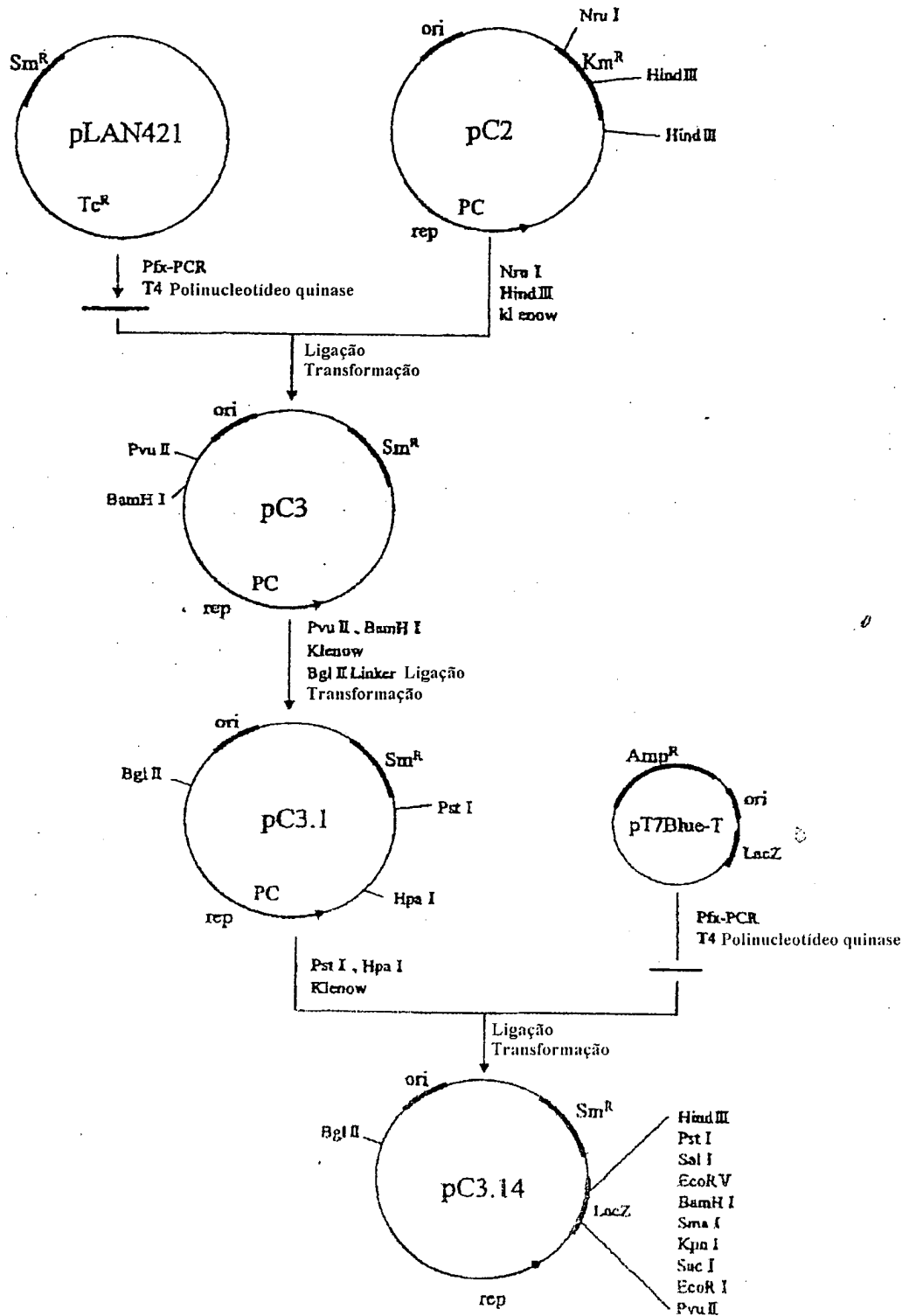
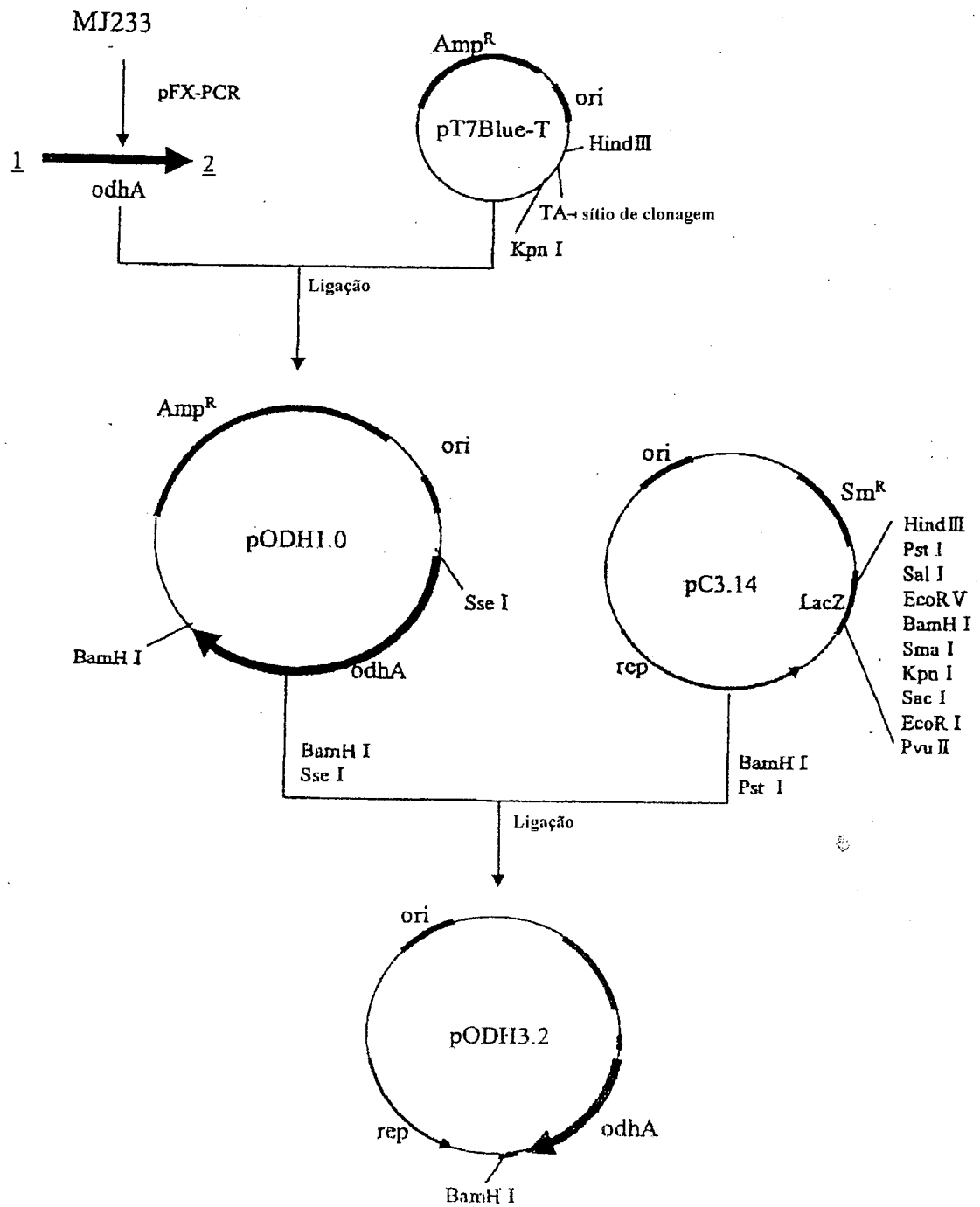


FIGURA 2



RESUMO

BACTÉRIA CAPAZ DE PRODUZIR ÁCIDO ORGÂNICO E PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DO MESMO - Provê-se uma bactéria que é capaz de produzir um ácido orgânico e que é modificada de modo a ter a atividade da 2-oxoglutarato desidrogenase aumentada em comparação com a de uma cepa não modificada. Um ácido orgânico como o ácido succínico pode ser produzido cultivando-se a bactéria.