



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1014661-0 B1



(22) Data do Depósito: 28/07/2010

(45) Data de Concessão: 15/12/2020

(54) Título: MÉTODO PARA PRODUZIR UM L-AMINOÁCIDO

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

(30) Prioridade Unionista: 29/07/2009 JP 2009-176518.

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

(72) Inventor(es): SHIGEO SUZUKI.

(86) Pedido PCT: PCT JP2010062708 de 28/07/2010

(87) Publicação PCT: WO 2011/013707 de 03/02/2011

(85) Data do Início da Fase Nacional: 29/12/2011

(57) Resumo: MÉTODO PARA PRODUZIR UM L-AMINOÁCIDO Um método para produzir um L-aminoácido caracterizado por compreender: cultivar uma microalga em um meio; permitir que o meio de cultura reaja em uma temperatura média; desta maneira preparando um produto tratado da dita microalga que é capaz de promover a produção e o acúmulo do L-aminoácido por uma bactéria tendo uma capacidade de produzir o L-aminoácido; cultivar a dita bactéria em um meio contendo o produto tratado da dita microalga; permitir que a bactéria produza e acumule o L-aminoácido no meio de cultura; e colher o L-aminoácido do meio de cultura.

“MÉTODO PARA PRODUZIR UM L-AMINOÁCIDO”

Campo Técnico

[001] A presente invenção diz respeito a um método para produzir um L-aminoácido usando-se um microorganismo. Os L-aminoácidos são usados em vários campos tais como para o uso em condimentos, aditivos alimentícios, aditivos de alimentação, produtos químicos e medicamentos.

Fundamentos da Técnica

[002] Os L-aminoácidos tais como L-treonina e L-lisina são produzidos industrialmente por fermentação usando-se bactérias que produzem aminoácido, tais como bactérias *Escherichia* tendo uma capacidade de produzir estes L-aminoácidos. Quando estas bactérias que produzem aminoácido, as cepas bacterianas isoladas da natureza, os mutantes artificiais daquelas cepas bacterianas, recombinantes daquelas cepas bacterianas em que as enzimas biossintéticas de L-aminoácido são intensificadas pela recombinação genética ou semelhante, são usados. Os exemplos dos métodos para a produção de L-treonina incluem, por exemplo, os métodos descritos em documentos de Patente de 1 a 4. Os exemplos dos métodos para a produção de L-lisina incluem, por exemplo, os métodos descritos em documentos de Patente de 5 a 8.

[003] Na produção industrial de L-aminoácidos pela fermentação, sacarídeos, isto é, glicose, frutose, sacarose, melados *blackstrap*, hidrolisado de amido e assim por diante, são usados como fontes de carbono. Frequentemente usados nos métodos para a produção de um L-aminoácido pela fermentação como uma fonte de carbono são produtos de sacarificação de amidos derivados de plantas superiores, tais como milho e cassava. Estes têm teor de umidade baixo e teor de amido alto e, portanto, isto é fácil de se obter industrialmente amidos destes. Por outro lado, embora os amidos contidos em microalgas estão presentes em uma quantidade por unidade de peso seco comparável com aquele de milho ou cassava, o peso seco de algas

por unidade de peso do meio de cultura não atinge 1 %. O processo de separar corpos de alga, sua desidratação, interrupção das células, extração de amidos e a purificação dos amidos é complicada e difícil. Embora a fermentação de etanol usando-se amidos de microalgas seja descrita em documentos de Patente 9, 10 e documento que não de patente 1, os resultados da fermentação de etanol não são descritos. Ainda, qualquer exemplo de uso de amidos sacarificados de microalgas para a produção de aminoácido não foi mostrado até agora.

[004] É conhecido que o *Escherichia coli*, que é uma bactéria que produz aminoácido típico, pode se desenvolver usando-se glicerol como uma fonte de carbono simples (Documento que não de patente 2) e podem se desenvolver usando-se os ácidos graxos de cadeia longa tendo 12 ou mais átomos de carbono como a fonte de carbono simples (Documento que não de patente 3). Portanto, isto é descrito no Documento que não de patente 4 que o *Escherichia coli* pode assimilar tanto ácidos graxos de cadeia longa quanto glicerol, que são os produtos de hidrólise de gorduras e óleos, mas o *Escherichia coli* não têm atividades de lipase e, portanto, este não pode assimilar diretamente gorduras e óleos. Além disso, também é conhecido que a solubilidade de ácidos graxos de cadeia longa é, em geral, extremamente baixa e os resultados de medição da solubilidade são descritos no Documento que não de patente 5, isto é, embora a solubilidade de ácido láurico não é menor do que 0,1 g/L ou mais, a solubilidade de ácido oleico não é maior do que 0,0003 g/L e aquela de ácido palmítico não é maior do que 0,00000003 g/L. Portanto, é difícil assimilar simultaneamente glicerol altamente solúvel em água e ácidos graxos e estes não foram relatados até hoje, produção de L-aminoácido com base em fermentação direta que utilizam hidrolisados de gorduras e óleos, que é uma mistura de ácidos graxos de cadeia longa e glicerol, como uma fonte de carbono.

[005] Como para soja e *Elaeis guineensis* (palma oleosa),

que são plantas oleosas, em geral usadas para a produção de óleo comestível, vagens ou frutas destes contém cerca de 20 % de gorduras e óleos. Assim como para microalgas, são gorduras ou óleos que produzem microalgas conhecidas e o rendimento de gorduras e óleos por área excede muito aquela obtível com as plantas oleosas como relatado no Documento que não de patente 6. Entretanto, o processo de separação de algas, desidratação destes, interrupção das células, extração de gorduras e óleos e purificação destes é complicado e difícil, como no caso de amidos. Portanto, também não foi relatado a produção de L-aminoácido com base na fermentação direta que utilize gorduras e óleos que originam-se algas.

[006] Além disso, embora os métodos para extrair as substâncias orgânicas de *chlorella* sejam relatadas (Documentos de Patente 11, 12 e 13), foi considerado que a interrupção é preferivelmente realizada por uma reação de temperatura alta. Além disso, não houve relato até hoje sobre a produção de L-aminoácidos pela fermentação direta utilizando um produto processado obtido pelos métodos já mencionados como uma fonte de carbono. Além disso, também foi conhecido como compostos relacionados com ácido nucleico podem ser aumentados pela autólise de *chlorella* (documento de Patente 14), mas não houve nenhum relato sobre a produção de L-aminoácidos pela fermentação direta que utilize um produto processado obtido por um tal método como mencionado acima como uma fonte de carbono.

Referências da técnica anterior

Documentos de patente

[007] Documento de patente 1: Patente Japonesa aberta ao público (Kokai) No. 5-304969

[008] Documento de patente 2: Publicação Internacional WO98/04715

[009] Documento de patente 3: Patente Japonesa aberta ao

público N° 05-227977

[010] Documento de patente 4: Pedido Publicado de Patente U. S. N° 2002/0110876

[011] Documento de patente 5: Patente Japonesa aberta ao público N° 10-165180

[012] Documento de patente 6: Patente Japonesa aberta ao público N° 11-192088

[013] Documento de patente 7: Patente Japonesa aberta ao público N° 2000-253879

[014] Documento de patente 8: Patente Japonesa aberta ao público N° 2001-057896

[015] Documento de patente 9: Pedido Publicado de Patente U. S. N° 2006/135308

[016] Documento de patente 10: Pedido Publicado de Patente U. S. N° 2007/0202582

[017] Documento de patente 11: Patente Japonesa aberta ao público N° 9-75094

[018] Documento de patente 12: Publicação Internacional WO2006/095964

[019] Documento de patente 13: Pedido Publicado de Patente U. S. N° 2007/0202582

[020] Documento de patente 14: Patente Japonesa aberta ao público N° 62-278977

Documentos que não de patente

[021] Documento que não de patente 1: Matsumoto, M. et al., 2003, Appl. Biochem. Biotechnol., 105-108:247-254

[022] Documento que não de patente 2: Lin, E.C.C., 1996, pp.307-342, In F. D. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and Molecular Biology/Segunda Edição, American Society for

Microbiology Press, Washington, D.C.

[023] Documento que não de patente 3: Clark, D.P. and Cronan Jr., J.E., 1996, pp.343-357, In F.D. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and Molecular Biology/Segunda Edição, American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.

[024] Documento que não de patente 4: Brenner, D.J. and Farmer III J.J. Family I., 2005, pp.587-669, In: D.J. Brenner, N.R. Krieg and J.T. Staley, Editors, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume Dois: The Proteobacteria Part B: The Gammaproteobacteria, Springer, New York

[025] Documento que não de patente 5: Vorum, H. et al., 1992, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1126:135-142

[026] Documento que não de patente 6: Chisti Y., 2007, *Biotechnol. Adv.*, 25:294-306

Sumário da Invenção

Objetivo a ser Atingido pela Invenção

[027] Um aspecto da presente invenção é fornecer um método mais eficiente para produzir um L-aminoácido, especialmente um método para produzir um L-aminoácido em um custo inferior usando-se uma fonte de carbono derivada de microalgas quando comparado com métodos convencionais para produzir um L-aminoácido pela fermentação usando-se microorganismos, que são realizados usando-se principalmente sacarídeos derivados de plantas superiores como a fonte de carbono.

Meios para Atingir o Objetivo

[028] Os inventores da presente invenção conduziram várias pesquisas a fim de atingir o objetivo já mencionado e como um resultado, observaram que os L-aminoácidos podem ser eficientemente produzidos utilizando-se, como uma fonte de carbono, um produto processado de uma cultura de uma microalga obtida pela reação da cultura uma

temperatura média, a partir da qual as substâncias orgânicas podem ser obtidas sem a adição de lipase ou amilase ou com a adição de uma quantidade pequena de lipase ou amilase. A presente invenção foi realizada na base desta descoberta.

[029] (1) Um método para produzir um L-aminoácido, que compreende:

(a) preparar um produto processado de uma microalga, que promove a produção e o acúmulo do L-aminoácido por uma bactéria tendo uma capacidade de produzir o L-aminoácido, pela cultura da microalga em um meio e processamento de sua cultura em uma temperatura média,

(b) cultivar a bactéria em um meio contendo o produto processado da microalga para produzir e acumular o L-aminoácido na cultura e

(c) coletar o L-aminoácido da cultura.

[030] (2) O método como descrito acima, em que temperatura do processamento em uma temperatura média é de 40°C ou mais alta.

[031] (3) O método como descrito acima, em que temperatura do processamento em uma temperatura média é de 70°C ou mais baixa.

[032] (4) O método como descrito acima, em que o produto processado é um precipitado obtido pela centrifugação do produto do processamento em uma temperatura média e contém um ácido graxo.

[033] (5) O método como descrito acima, em que o produto processado é um sobrenadante obtido pela centrifugação do produto do processamento em uma temperatura média e contém glicose ou glicerol.

[034] (6) O método como descrito acima, em que o produto processado é um extrato obtido pela substituição do produto do processamento em uma temperatura média a um tratamento com um álcali ou

um solvente orgânico para extrair um ácido graxo.

[035] (7) O método como descrito acima, em que o precipitado obtido pela centrifugação do produto do processamento em uma temperatura média é submetido a um tratamento com um álcali ou um solvente orgânico.

[036] (8) O método como descrito acima, em que o tratamento com um álcali é realizado em um pH de 10,5 ou mais alta.

[037] (9) O método como descrito acima, em que o tratamento com um álcali é realizado a 60°C ou mais alta.

[038] (10) O método como descrito acima, em que o tratamento com um solvente orgânico é realizado com metanol, etanol, 2-propanol, acetona, butanol, pentanol, hexanol, heptanol, octanol, clorofórmio, acetato de metila, acetato de etila, éter dimetílico, éter dietílico ou hexano.

[039] (11) O método como descrito acima, em que a temperatura é diminuída durante o processamento em uma temperatura média.

[040] (12) O método como descrito acima, em que a microalga é uma alga que pertence à divisão *Chlorophyta* ou *Heterokontophyta*.

[041] (13) O método como descrito acima, em que a microalga é uma alga que pertence à classe *Chlorophyceae*, *Trebouxiophyceae* ou *Bacillariophyceae*.

[042] (14) O método como descrito acima, em que a microalga é uma alga que pertence à classe *Chlorophyceae*.

[043] (15) O método como descrito acima, em que a bactéria é uma bactéria que pertence à família *Enterobacteriaceae* ou uma bactéria corineforme.

[044] (16) O método como descrito acima, em que a bactéria que pertence à família *Enterobacteriaceae* is *Escherichia coli*.

[045] Efeito da Invenção

[046] Utilizando-se a presente invenção, os L-aminoácidos podem ser eficientemente produzidos.

Breve Descrição dos Desenhos

[047] [Fig. 1] A Fig. 1 mostra a quantidade de ácidos graxos obtidos pelo processamento de *Chorella kessleri* em uma temperatura média.

[048] [Fig. 2] A Fig. 2 mostra a quantidade de ácidos graxos obtidos pelo processamento de *Nannochloris* sp. em uma temperatura média.

[049] [Fig. 3] A Fig. 3 mostra o curso de tempo da razão de geração de ácido graxo durante um processamento de uma alga em uma temperatura média.

[050] [Fig. 4] A Fig. 4 mostra os resultados do exame das condições de pH para um tratamento alcalino para a extração de ácidos graxos.

[051] [Fig. 5] A Fig. 5 mostra os resultados do exame das condições de temperatura para um tratamento alcalino para a extração de ácidos graxos.

[052] [Fig. 6] A Fig. 6 mostra os resultados do exame de tempo para um tratamento alcalino para a extração de ácidos graxos.

[053] [Fig. 7] A Fig. 7 mostra os resultados do exame das condições de temperatura para a primeira etapa de um processamento de duas etapas de algas em uma temperatura média.

[054] [Fig. 8] A Fig. 8 mostra os resultados do exame de tempo para a primeira etapa e tempo para a segunda etapa de um processamento de duas etapas de algas em uma temperatura média.

[055] [Fig. 9] A Fig. 9 mostra os resultados do exame do solvente usado para um tratamento de solvente orgânico para a extração de ácidos graxos.

Modos para Realizar a Invenção

[056] A seguir, a presente invenção será explicada em detalhes.

[057] <1> As microalgas usadas na presente invenção e método de cultura para estas

[058] Como uma microalga usada na presente invenção, quaisquer algas podem ser usadas. Entretanto, as microalgas que acumulam amidos e/ou gorduras e óleos em corpos de algas são preferidos.

[059] Algas referem-se a todos os organismos que realizam a fotossíntese do tipo gerador de oxigênio exceto para *Bryophyta*, *Pteridophyta* e *Spermatophyta*, que vivem principalmente no solo. As algas incluem vários organismos unicelulares e organismos multicelulares tais como cianobactérias (algas azúis-verdes), que são procariotas, bem como aqueles classificados no filo *Glaucophyta*, *Rhodophyta* (algas vermelhas), *Chlorophyta*, *Cryptophyta* (algas de caverna), *Haptophyta* (haptofitos), *Heterokontophyta*, *Dinophyta* (dinoflagellates), *Euglenophyta* ou *Chlorarachniophyta*, que são eucariotas. As microalgas referem-se a algas tendo uma estrutura microscópica entre estas algasm, exceto para algas marinhas, que são organismos multicelulares (Biodiversity Series (3) Diversity and Pedigree of Algae, edited by Mitsuo Chihara, Shokabo Publishing Co., Ltd. (1999)).

[060] Muitas plantas incluindo algas que produzem amidos como polissacarídeos de armazenagem (Ball, S.G. and Morell, M.K., 2003, Annual Review of Plant Biology, 54:207-233). Muitas algas que acumulam amidos são conhecidos e as algas típicas incluem aqueles das classes *Prasinophyceae*, *Chlorophyceae*, *Trebouxiophyceae*, *Ulvophyceae*, *Charophyceae* ou semelhante, que pertencem ao filo *Chlorophyta*. Entre estes, as algas que pertencem à classe or *Chlorophyceae* ou *Trebouxiophyceae* foram bem estudados. Os exemplos de algas que pertencem à classe

Chlorophyceae incluem aqueles do gênero *Chlamydomonas* e os exemplos de algas que pertencem à classe *Trebouxiophyceae* incluem aqueles do gênero *Chlorella*. Especificamente, os exemplos de algas que pertencem ao gênero *Chlamydomonas* incluem *Chlamydomonas reinhardtii* (Ball, S.G., 1998, The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in *Chlamydomonas*, pp.549-567, Rochaix J.-D., Goldschmidt-Clermont M., and Merchant S. (Eds), Kluwer Academic Publishers) e os exemplos de algas que pertencem ao gênero *Chlorella* incluem *Chlorella kessleri* (formerly *Chlorella vulgaris*, Izumo A. et al, 2007, Plant Science, 172:1138-1147). Mais especificamente, os exemplos de *Chlamydomonas reinhardtii* incluem a cepa *Chlamydomonas reinhardtii* CC125 e os exemplos de *Chlorella kessleri* incluem a cepa *Chlorella kessleri* 11h. Estas cepas são armazenadas em, por exemplo, The University of Texas at Austin, The Culture Collection of Algae (UTEX) (1 University Station A6700, Austin, TX 78712-0183, USA) com números de acesso de UTEX 2244 e UTEX 263, respectivamente e pode ser obtido de UTEX. A cepa *Chlorella kessleri* 11h foi armazenada na agência administrativa independente, a IAM Culture Collection, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo with a storage number of C-531, and then transferred to the Microbial Culture Collection at the National Institute for Environmental Studies (NIES). Além disso, esta cepa é armazenada na American Type Culture Collection (ATCC, P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, 1, United States of America) sob um número de acesso de ATCC 11468 e também pode ser obtidos a partir da ATCC.

[061] Ainda é conhecido que as microalgas incluem aquelas que acumulam gorduras e óleos como substâncias de armazenagem de gorduras e óleos (Chisti Y., 2007, Biotechnol. Adv., 25:294-306). Como tais algas, aquelas que pertencem ao filo *Chlorophyta* ou *Heterokontophyta* são bem conhecidos. Os exemplos das algas que pertencem ao filo *Chlorophyta* incluem aqueles que pertencem à classe *Chlorophyceae* e os exemplos de

algas que pertencem à classe *Chlorophyceae* incluem *Neochloris oleoabundans* (Tornabene, T.G. et al., 1983, Enzyme and Microb. Technol., 5:435-440), *Nannochloris* sp. (Takagi, M. et al., 2000, Appl. Microbiol. Biotechnol., 54:112-117) e assim por diante. No filo *Heterokontophyta*, as classes *Chrysophyceae*, *Dictyochophyceae*, *Pelagophyceae*, *Rhaphidophyceae*, *Bacillariophyceae*, *Phaeophyceae*, *Xanthophyceae* e *Eustigmatophyceae* são classificados. Os exemplos de algas frequentemente usadas que pertencem à classe *Bacillariophyceae* incluem *Thalassiosira pseudonana* (Tonon, T. et al., 2002, Phytochemistry, 61:15-24). Os exemplos específicos de *Neochloris oleoabundans* incluem a cepa *Neochloris oleoabundans* UTEX 1185, os exemplos específicos de *Nannochloris* sp. incluem o *Nannochloris* sp. UTEX LB 1999 strain, and os exemplos específicos de *Thalassiosira pseudonana* incluem a cepa *Thalassiosira pseudonana* UTEX LB FD2. Estas cepas podem ser obtidas a partir da University of Texas at Austin, The Culture Collection of Algae (UTEX), 1 University Station A6700, Austin, TX 78712-0183, USA.

[062] Existe muita informação sobre cultivar microalgas e aqueles do gênero *Chlorella* ou *Arthrospira* (*Spirulina*), *Dunaliella salina* e assim por diante are industrialmente cultivados em uma escala grande (Spolaore, P. et al., 2006, J. Biosci. Bioeng., 101:87-96). For *Chlamydomonas reinhardtii*, por exemplo, 0,3 x meio HSM (Oyama Y. et al., 2006, Planta, 224:646-654) podem ser usados e para *Chlorella kessleri*, 0,2 x meio de Gamborg (Izumo A. et al., 2007, Plant Science, 172:1138-1147) e assim por diante podem ser usados. *Neochloris oleoabundans* e *Nannochloris* sp. Podem ser cultivados usando-se o meio NORO modificado (Yamaberi, K. et al., 1998, J. Mar. Biotechnol., 6:44-48; Takagi, M. et al., 2000, Appl. Microbiol. Biotechnol., 54:112-117) ou o meio basal de Bold (Tornabene, T.G. et al., 1983, Enzyme and Microb. Technol., 5:435-440; Archibald, P.A. and Bold, H.C., 1970, Phytomorphology, 20:383-389). Para *Thalassiosira pseudonana*

como uma alga que pertence à classe *Bacillariophyceae*, o meio F/2 (Lie, C.-P. e Lin, L.-P., 2001, Bot. Bull. Acad. Sin., 42:207-214) e assim por diante podem ser preferivelmente usados. Além disso, um fotobiorreator também pode ser usado para cultivar microalgas (WO2003/094598).

[063] A cultura é realizada pela adição de 1 a 50 % de suspensão celular pré-cultivada com base no volume da cultura principal em muitos casos. O pH inicial está preferivelmente em torno do neutro, isto é, de 7 a 9, e o pH não é ajustado durante a cultura em muitos casos. Entretanto, o pH pode ser ajustado, se necessário. A temperatura da cultura é de, preferivelmente, 25 a 35°C e, em particular, uma temperatura em torno de 28°C é, em geral, frequentemente usada. Entretanto, a temperatura de cultura pode ser uma temperatura adequada para a alga ser usada. Ar é soprado no meio de cultura em muitos casos e como uma taxa de aeração, um volume de aeração por volume unitário de meio de cultura por minuto de 0,1 a 2 vvm (volume por volume por minuto) é frequentemente usado. Além disso, CO₂ também pode ser soprado no meio a fim de promover o desenvolvimento e é preferivelmente soprado em torno de 0,5 a 5 % da taxa de aeração. Embora a intensidade de iluminação ótima de luz também difira dependendo do tipo de microalgas, uma intensidade de iluminação de cerca de 1.000 a 10.000 lux é frequentemente usada. Como a fonte de luz, é comum usar uma lâmpada fluorescente branca interna, mas a fonte de luz não é limitada a esta. Também é possível realizar a cultura ao ar livre com luz solar. O meio de cultura pode ser agitado em uma intensidade apropriada ou circulado, se necessário. Além disso, é conhecido que as algas acumulam gorduras em óleos nos corpos de alga quando a fonte de nitrogênio é esgotada (Thompson G.A. Jr., 1996, Biochim. Biophys. Acta, 1302:17-45) e um meio de uma concentração de fonte de nitrogênio limitada também pode ser usada para a cultura principal.

[064] Na presente invenção, a cultura de microalgas inclui um meio de cultura contendo corpos de alga e os corpos de alga que foram

coletados de um meio de cultura.

[065] Os corpos de alga podem ser coletados a partir de um meio de cultura por centrifugação, filtração, precipitação gravitacional usuais usando-se um flocculante ou semelhante (Grima, E.M. et al., 2003, *Biotechnol. Advances*, 20:491-515).

[066] Na presente invenção, em particular, quando os ácidos graxos contidos no produto processado são usados como a fonte de carbono, a microalga é preferivelmente concentrada por centrifugação ou semelhante antes do processamento em uma temperatura média. A concentração de corpos de alga incluem obter uma concentração de peso seco de uma unidade de microalga por volume unitário de solução de 25 g/L ou mais alta, preferivelmente 250 g/L ou mais alta pela remoção dos componentes de solução (incluindo a separação de corpos de alga a partir de um meio de cultura pela centrifugação ou semelhante e colocando-se os corpos de alga em suspensão em um líquido em uma concentração desejada) e usando-se corpos de alga precipitados e separados do meio.

[067] <2> Método para o processamento de microalga e produto processado de microalga

[068] Na presente invenção, a cultura de uma microalga é processada em uma temperatura média e o produto processado da microalga é usado como uma fonte de nutriente para fermentação de L-aminoácido.

[069] Na presente invenção, o produto processado de microalga significa uma mistura de reação obtida pelo processamento da cultura de uma microalga em uma temperatura média. Portanto, neste relatório descritivo, os termos “processarem uma temperatura média” e “reagir em uma temperatura média” têm o mesmo significado. O produto processado inclui um obtido submetendo-se ainda a mistura de reação processada em uma temperatura média à extração ou fracionamento e/ou um outro tratamento, que contém uma mistura de substâncias orgânicas que se

originam nas células da microalga e promove a produção e o acúmulo de um L-aminoácido por uma bactéria tendo uma capacidade de produzir o L-aminoácido.

[070] A expressão “promove a produção e acúmulo de um L-aminoácido” significa que a mistura de substâncias orgânicas derivadas de células interrompidas de microalga contidas no produto processado substancialmente contribui com a proliferação de uma bactéria e produção de L-aminoácido como uma fonte de fornecimento de componentes de célula constituinte de carbono e L-aminoácidos e quaisquer produtos processados que podem contribuir de uma tal maneira como descrito acima estão incluídos no “produto processado que promove a produção e o acúmulo de um L-aminoácido” da presente invenção.

[071] Um produto processado que promove a produção e o acúmulo de um L-aminoácido pode ser confirmado pela cultura de uma bactéria sob a mesma condição na presença e ausência do produto processado e comparação da produção e acúmulo de quantidades do L-aminoácido na cultura.

[072] Embora o acúmulo de L-aminoácido possa ser melhorado em qualquer grau quando comparado com o acúmulo de L-aminoácido observado sem a adição do produto processado, o acúmulo de L-aminoácido é preferivelmente melhorado por 10 % ou mais, mais preferivelmente 20 % ou mais, ainda mais preferivelmente 30 % ou mais, quando comparado com a cultura com o produto processado não é adicionado.

[073] A melhora da taxa de desenvolvimento de um microorganismo e aumento da quantidade celular de um microorganismo em um meio de cultura pela adição do produto processado também estão incluídos nos resultados de “promover a produção e acúmulo de um L-aminoácido” de acordo com a presente invenção e a taxa de desenvolvimento e a quantidade celular são preferivelmente aumentadas por 10 % ou mais,

mais preferivelmente 20 % ou mais, ainda mais preferivelmente 30 % ou mais, quando comparado com a cultura ao qual o produto processado não é adicionando.

[074] Além disso, quando o produto processado contém uma fonte de carbono, se este puder contribuir substancialmente com o desenvolvimento de uma bactéria e produção de L-aminoácido como uma fonte de fornecimento de componentes celulares consistindo de carbono e L-aminoácidos, este está incluído no produto processado da presente invenção que promove a produção e o acúmulo de um L-aminoácido. Portanto, embora qualquer produto processado que aumenta as quantidades de produção e acúmulo de L-aminoácido quando comparado com o produto processado não é adicionado, está incluído no produto processado da presente invenção, um produto processado que melhora a produção e acúmulo de quantidades de L-aminoácido em comparação com quando uma fonte de carbono que compreende substâncias purificadas é adicionado na mesma quantidade como a fonte de carbono contida no produto processado é preferida.

[075] Ainda, se as etapas de processamento para a purificação da fonte de carbono for encurtada em comparação com aquela para o uso de uma fonte de carbono consistindo de substâncias purificadas, pode ser dito que a produção e acúmulo de L-aminoácido são melhorados. Neste caso, o tempo das etapas de processamento é preferivelmente encurtado por 10 % ou mais, mais preferivelmente 20 % ou mais, ainda mais preferivelmente 30 % ou mais.

[076] Na presente invenção, a temperatura média significa uma temperatura suficiente para aumentar a quantidade de ácidos graxos, glicerol ou glicose no produto processado e o processamento pode ser continuamente realizado na mesma temperatura ou pode ser realizado com a diminuição da temperatura no meio do processamento. Como um exemplo de diminuição da temperatura no meio do processamento, o processamento pode

ser realizado uma vez em uma temperatura média como uma primeira etapa de processamento de temperatura média e então realizado em uma temperatura constante menor do que a temperatura como um processamento de temperatura média da segunda etapa. O processamento contínuo em uma temperatura média ou o processamento de temperatura média da primeira etapa é realizado usualmente a 40°C ou mais alta, preferivelmente a 45°C ou mais alta, mais preferivelmente a 50°C ou mais alta, assim como para a temperatura mínima e usualmente a 70°C ou mais baixa, preferivelmente a 65°C ou mais baixa, mais preferivelmente a 60°C ou mais baixa, assim como para a temperatura máxima. O processamento de temperatura média da segunda etapa é realizado usualmente a 30°C ou mais alta, preferivelmente a 35°C ou mais alta, mais preferivelmente a 40°C ou mais alta, assim como para a temperatura mínima e usualmente a 55°C ou mais baixa, preferivelmente a 50°C ou mais baixa, mais preferivelmente a 45°C ou mais baixa, assim como para a temperatura máxima.

[077] Na presente invenção, embora a cultura da alga obtida pelo método de cultura já mencionado por si pode ser submetido à reação em uma temperatura média, isto pode ser concentrado como descrito acima e depois usado. Por exemplo, a cultura pode ser uma vez centrifugada e os corpos de alga precipitados podem ser usados para a reação.

[078] Além disso, antes da reação em uma temperatura média, o pH para a reação pode ser ajustado para ser fracamente ácido ou os corpos de alga podem ser uma vez congelados.

[079] O pH fracamente ácido mencionado acima é preferivelmente de 3,0 a 7,0, mais preferivelmente 4,0 a 6,0.

[080] A temperatura para o congelamento usualmente significa uma temperatura de -80 a 0°C e é preferível para conduzir a reação a -20°C ou mais baixa, mais preferivelmente -50°C ou mais baixa, por 1 hora ou mais.

[081] Na presente invenção, para o processamento contínuo em uma temperatura média, a reação é preferivelmente realizada por pelo menos 1 hora ou mais, mais preferivelmente 5 horas ou mais. A reação em uma temperatura média é usualmente realizada por 48 horas ou menos, mais preferivelmente 24 horas ou menos. Para o processamento de temperatura média da primeira etapa, a reação é preferivelmente realizada por pelo menos 1 minuto ou mais, preferivelmente 10 minutos ou mais, mais preferivelmente 20 minutos ou mais. O processamento de temperatura média da primeira etapa é, usualmente, realizada preferivelmente por 120 minutos ou menos, mais preferivelmente 60 minutos ou menos. O processamento de temperatura média da segunda etapa é preferivelmente realizada por pelo menos 1 hora ou mais, mais preferivelmente 4 horas ou mais, assim como para o tempo de reação mínimo e usualmente preferível 20 horas ou menos, mais preferivelmente 15 horas ou menos, assim como para o tempo de reação máximo.

[082] Quando um tratamento alcalino ou tratamento com solvente orgânico é realizado após o processamento em uma temperatura média, a solução processada em uma temperatura média como esta tendo o mesmo volume pode ser submetido ao tratamento, a solução pode ser submetida ao tratamento após a diluição ou um precipitado separado do sobrenadante. O tratamento é, usualmente, realizado preferivelmente em uma concentração de precipitado por volume único da solução de 250 g/L ou mais baixa, mais preferivelmente 125 g/L ou mais baixa. No caso do tratamento alcalino, este é preferivelmente realizado em uma concentração de 125 g/L ou mais baixa e, no caso do tratamento com solvente orgânico, é preferível separar os precipitados do sobrenadante.

[083] Na presente invenção, o pH para o tratamento alcalino é realizado após o processamento em uma temperatura média é usualmente de 10,5 ou mais alta e 14 ou mais baixa, preferivelmente 11,5 ou

mais alta, mais preferivelmente 12,5 ou mais alta.

[084] Na presente invenção, a temperatura do tratamento alcalino é usualmente 60°C ou mais alta, preferivelmente 80°C ou mais alta, mais preferivelmente 90°C ou mais alta. A temperatura do tratamento alcalino é de preferivelmente 120°C ou mais baixa.

[085] Na presente invenção, o tempo do tratamento alcalino é de pelo menos 10 minutos ou mais, preferivelmente 30 minutos ou mais, mais preferivelmente 60 minutos ou mais. O tempo do tratamento alcalino é de preferivelmente 150 minutos ou menos.

[086] Na presente invenção, o produto processado obtido pelo processamento em uma temperatura média pode ser submetido ao tratamento com solvente orgânico para a extração após a secagem ou pode ser extraído sem secagem. Os exemplos do solvente orgânico mencionado acima incluem metanol, etanol, 2-propanol, acetona, butanol, pentanol, hexanol, heptanol, octanol, clorofórmio, acetato de metila, acetato de etila, éter dimetílico, éter dietílico, hexano e assim por diante.

[087] Após o processamento em uma temperatura média, a mistura de reação é preferivelmente separada em precipitado e sobrenadante pela centrifugação. Além disso, após o processamento em uma temperatura média, o produto processado por si pode ser usado como um componente de meio para a fermentação de L-aminoácido.

[088] O precipitado contém muitos ácidos graxos e estes são preferivelmente submetidos a um tratamento alcalino a fim de formar micelas dos ácidos graxos em água. Além disso, a fim de obter assimilação eficiente como a fonte de carbono, o precipitado é preferivelmente submetido a um tratamento de emulsificação. Os exemplos do tratamento de emulsificação incluem a adição de um intensificador de emulsão, agitação, homogeneização, ultrassonificação e assim por diante. É considerado que o tratamento de emulsificação o torna mais fácil para a bactéria assimilar os

ácidos graxos e a fermentação de L-aminoácido torna-se mais eficaz. O tratamento de emulsificação pode ser de qualquer tipo, contanto que este seja um tratamento que torne mais fácil para as bactérias tendo uma capacidade de produzir L-aminoácido assimilar os ácidos graxos. Como o método de emulsificação, por exemplo, a adição de um intensificador de emulsificação ou um tensoativo ou um tensoático etc. Pode ser considerado. Os exemplos do intensificador de emulsão requerido aqui incluem fosfolipídeos e esteróis. Os exemplos do tensoativo incluem, como tensoativos não iônicos, ésteres de ácido graxo de polioxietileno sorbitano, tais como éster de ácido monooleico poli(oxietileno) sorbitano (Tween 80), alquil glicosídeos, tais como n-octil β -D-glicosídeo, ésteres de ácido graxo de sacarose, tais como estearato de sacarose, ésteres de ácido graxo de poliglicerila, tais como ácido esteárico de poliglicerina e assim por diante. Os exemplos do tensoático incluem, como tensoativos anfólicos, N,N-dimetil-N-dodeciliglicina betaína, que é uma alquilbetaína e assim por diante. Além destes, os tensoativos em geral usados no campo da biologia, tais como Triton X-100, éter cetílico de polioxietileno(20) (Brij-58) e nonilfenol etoxilado (Tergitol NP-40) podem ser usados.

[089] Além disso, uma operação para promover a emulsificação e a homogeneização de substâncias dificilmente solúveis, isto é, ácidos graxos também é eficaz. Esta operação pode ser qualquer operação que promova a emulsificação e a homogeneização de uma mistura de um ácido graxo e glicerol. Os exemplos específicos incluem agitação, tratamento com homogeneizador, tratamento com homomisturador, ultrasonificação, tratamento com pressão alta, tratamento com temperatura alta e assim por diante e agitação, tratamento com homogeneizador, ultrasonificação e uma combinação destes são mais preferidos.

[090] É particularmente preferível usar o tratamento com o intensificador de emulsão já mencionado e agitação, tratamento de

homogeneizador e/ou ultrassonificação em combinação e estes tratamentos são desejavelmente realizados sob condições alcalinas, sob as quais os ácidos graxos são mais estáveis. Assim como a condição alcalina, o pH de 9 ou mais alto é preferido e pH de 11 ou mais alto é mais preferido.

[091] Quando o precipitado contém gorduras e óleos produzidos por microalgas, um hidrolisado deste também pode ser adicionado ao meio como uma fonte de carbono. Uma solução mista de substâncias orgânicas extraídas com um solvente tal como etanol, uma mistura de metanol e clorofórmio ou acetona também pode ser submetida à hidrólise. Estas soluções podem ser usadas como são ou estas também podem ser concentradas por um processamento, tal como liofilização e evaporação. Esta solução contém componentes que podem ser usados como uma fonte de nitrogênio orgânico, tal como aminoácidos e componentes eficazes para o desenvolvimento de bactérias tendo uma capacidade de produzir aminoácido, tais como metais e também podem ser usados como um outro componente de meio que não a fonte de carbono.

[092] As gorduras e óleos são os ésteres formados a partir de ácidos graxos e glicerol e também são denominados triglicerídeos. As gorduras e óleos produzidos por microalgas são preferivelmente aquelas espécies de ácido graxo gerados pela hidrólise podem ser utilizados por uma bactéria usada no método da presente invenção como uma fonte de carbono e seus teores mais altos são mais preferidos. Os exemplos de espécies de ácido graxo de cadeia longa assimiláveis por bactérias tendo uma capacidade de produzir L-aminoácido incluem ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico e assim por diante. Ainda, além de gorduras e óleos, os organismos, em geral, contém lipídeos, que liberam ácidos graxos por hidrólise e ácidos graxos produzidos pela hidrólise de lipídeos também podem ser usados como uma fonte de carbono. Os exemplos do lipídeo incluem ceras e ceramidas, que são lipídeos, bem como

fosfolipídeos e glicolipídeos, que são lipídeos complexos e assim por diante.

[093] A fim de ainda hidrolisar as gorduras e óleos, o precipitado pode ser reagido com uma lipase. As lipases são enzimas que hidrolisam gordura ou óleo em ácidos graxos e glicerol e também são denominados triacilglicerol lipases ou triacilglicerídeo lipases.

[094] As lipases são encontradas em vários organismos e as lipases derivadas de quaisquer espécies podem ser usadas contanto que a lipase que catalisa a reação já mencionada é usada. Em anos recentes, várias tentativas também foram realizadas para a produção de combustível biodiesel, sendo ésteres de ácido graxo, de gordura ou óleo e um álcool usando-se uma enzima lipase (Fukuda, H., Kondo, A., and Noda, H., 2001, J. Biosci. Bioeng., 92, 405-416).

[095] Como lipases típicas derivadas de microorganismos, muitas lipases derivadas daquelas do gênero *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* ou *Staphylococcus* são conhecidos (Jaeger, K.E., and Eggert, T., 2002, Curr. Opin. Biotechnol., 13:390-397).

[096] Como os exemplos, a sequência de nucleotídeo do gene que codifica quanto a LipA derivado de *Bacillus subtilis* (Acessão GenBank N° M74010) e a sequência de aminoácido deste são mostradas em SEQ ID N°: 1 e 2, respectivamente.

[097] A sequência de nucleotídeo do gene que codifica quanto a LipA derivado de *Burkholderia glumae* (N° de Acesso GenBank X70354) e a sequência de aminoácido deste são mostradas em SEQ ID N°: 3 e 4, respectivamente.

[098] A sequência de nucleotídeo do gene que codifica quanto a LipA derivado de *Pseudomonas aeruginosa* (N° de Acesso GenBank D50587) e a sequência de aminoácido deste são mostradas em SEQ ID N°: 5 e 6, respectivamente.

[099] A sequência de nucleotídeo do derivado de lipase de

Staphylococcus aureus (Nº de Acesso GenBank M12715) e a sequência de aminoácido deste são mostradas em SEQ ID Nº: 7 e 8, respectivamente.

[0100] O derivado de lipase da levedura, *Candida antarctica* (Nº de Acesso GenBank Z30645) também é uma das lipases geralmente usadas (Breivik, H., Haraldsson, G.G., and Kristinsson, B., 1997, J. Am. Oil Chem. Soc., 74, 1425-1429). A sequência de nucleotídeo do gene que codifica quanto a esta lipase e a sequência de aminoácido deste são mostradas em SEQ ID Nº: 9 e 10, respectivamente.

[0101] Além disso, assim como para a levedura, *Candida rugosa* (*Candida cylindracea*), cinco ou mais tipos de lipases codificadas por genes separados são conhecidos estarem presentes (Alberghina, L. e Lotti, M., 1997, Methods Enzymol., 284:246-260). Como as lipases principais, LIP1 e LIP2 são mostrados e a sequência de nucleotídeo do gene *lip1* (Nº de Acesso GenBank X64703) que codifica quanto ao LIP1 e a sequência de aminoácido deste são mostradas em SEQ ID Nº: 11 e 12, respectivamente. A sequência de nucleotídeo do gene *lip2* (Nº de Acesso GenBank X64703) codifica quanto LIP2 e a sequência de aminoácido deste são mostrados na SEQ ID Nº: 13 e 14, respectivamente. Além disso, é conhecido que, nas leveduras do gênero *Candida* tais como *Candida cylindracea*, o códon CTG, que codifica quanto à leucina de acordo com os códigos universais, códigos para serina (Kawaguchi, Y. et al., 1989, Nature, 341:164-166; Ohama, T. et al., 1993, Nucleic Acids Res., 21:4039-4045). Na SEQ ID Nº: 11 a 14, embora os aminoácidos correspondentes ao CTG são indicados como Leu para conveniência, estes são realmente Ser.

[0102] Além disso, as lipases derivadas de bactérias *Cryptococcus*, por exemplo, a lipase produzida por *Cryptococcus* sp. S-2 e as lipases tendo uma estrutura primária similar àquela das lipases precedentes também podem ser usadas (Patente Japonesa aberta ao público Nº 2004-73123). Como um gene que codifica quanto a uma lipase derivada de uma

bactéria *Cryptococcus*, o gene de lipase CS2 de *Cryptococcus* sp. S-2 (FERM P-15155) é conhecido (Patente Japonesa aberta ao público N° 2004-73123). A sequência de nucleotídeo deste gene CS2 é mostrado na SEQ ID N°: 18 e a sequência de aminoácido do precursor da lipase codificada por este gene CS2 é mostrado na SEQ ID N°: 19. é esperado que, na sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 2, a sequência das posições de -34 a -1 é um peptídeo sinalizador e a sequência das posições de 1 a 205 correspondem à proteína madura. *Cryptococcus* sp. O S-2 foi depositado em 5 de setembro de 1995 no National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology (presentemente, a agência administrativa independente, o International Patent Organism Depository, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japan)) e designado um número de acesso do FERM P-15155. O depósito foi convertido a um depósito internacional com base no Budapest Treaty em 25 de abril de 2008 e designado um número de acesso do FERM BP-10961.

[0103] Como as lipases já mencionadas, aquelas preparadas das células ou cultura dos microorganismos já mencionados podem ser usadas ou podem ser aquelas preparadas pela expressão de um gene que codifica quanto a cada lipase em um outro microorganismo hospedeiro usando-se as técnicas de engenharia genética. Quando um gene derivado de levedura em que o códon CTG codifica quanto a serina, tal como *Candida rugosa* (*Candida cylindracea*), é expressado em um outro hospedeiro, é necessário mudar o CTG em um outro códon universal que codifica quanto à serina (Schmidt-Dannert, C., 1999, Bioorg. Med. Chem., 7:2123-2130).

[0104] Os exemplos das características das sequências de lipase incluem a presença do motivo GX SXG denominado caixa de lipase próximo ao Ser do centro ativo e conservação de três resíduos de Ser, Asp e His denominada a tríade catalítica, que são comuns a lipases, esterases e

serina proteases. Por exemplo, na sequência de aminoácido de LipA derivado de *Bacillus subtilis* mostrado na SEQ ID N°: 2, a caixa de lipase corresponde às posições 106 a 110 e a tríade catalítica corresponde aos três resíduos, Ser na posição 108, Asp na posição 164 e His na posição 187.

[0105] Além disso, a fim de reduzir o custo da enzima, uma lipase modificada de modo que a sua atividade e estabilidade sejam melhoradas também podem ser usados. Os exemplos incluem o lipase A de *Bacillus subtilis* modificado pelo método de apresentação de fago (Droge et al., ChemBioChem, 2006, 7:149-157), uma lipase modificada cuja atividade e estabilidade são melhoradas pela mistura de DNA (Suen et al., Protein Eng. Design & Selection, 2004, 17:133-140), a *C. antartica* lipase B modificada pelo método CALB (Zhang et al., Protein Eng., 2003, 16:599-605), a lipase de *Pseudomonas aeruginosa* modificada pelo método CAST (Reets et al., Angew. Chem. Int. Ed., 2005, 44:4192-4196) e assim por diante.

[0106] Na presente invenção, se as gorduras e óleos contidos no precipitado obtido pela centrifugação do produto processado obtido pela reação em uma temperatura média são decompostos, estes são decompostos em ácidos graxos e glicerol. Portanto, este glicerol pode ser usado como uma fonte de carbono para a fermentação de aminoácido.

[0107] Na presente invenção, o sobrenadante obtido pela centrifugação do produto processado obtido pela reação em uma temperatura média também pode ser usado como o produto processado. O sobrenadante obtido pela centrifugação do produto processado contém fragmentos de amidos e glicose bem como glicerol, que são produzidos através da decomposição de amidos e óleos e gorduras, respectivamente, pelo processamento em uma temperatura média de acordo com a presente invenção. Portanto, esta glicose e glicerol podem ser usados como a fonte de carbono.

[0108] Na presente invenção, o sobrenadante obtido pela

centrifugação do produto processado obtido na reação em uma temperatura média contém fragmentos de amidos. Portanto, um produto processado obtido pela sacarificação dos fragmentos de amidos no sobrenadante com uma amiloglicosidase ou semelhante para ainda aumentar a quantidade de glicose também pode ser usado.

[0109] Os amidos são polissacarídeos de peso molecular alto que consiste de amilose feito de resíduos de glicose linearmente ligados pelas ligações de α -1,4-glicosídeo e amilopectina que consiste de resíduos de glicose linearmente ligado pelas ligações α -1,4-glicosídeo e ramificação por ligações α -1,6-glicosídeo. Amilase é um nome genérico para enzimas que hidrolisam as ligações de glicosídeo de amidos etc. Por causa da diferença no local de ação, estes são brutalmente classificados em α -amilase (EC 3.2.1.1), β -amilase (EC 3.2.1.2) e glucoamilase (EC 3.2.1.3) ou amiloglicosidase (amilo-alfa-1,6-glucosidase, EC: [HYPERLINK http://www.genome.jp/dbget-bin/www#bget?3.2.1.33](http://www.genome.jp/dbget-bin/www#bget?3.2.1.33)) 3.2.1.33. α -Amilase é uma enzima tipo endo que aleatoriamente cliva as ligações α -1,4-glicosídeo de amidos, glicogênio e assim por diante. β -Amilase é uma enzima tipo exo que cliva a ligação α -1,4-glicosídeo para taxar uma unidade de maltose um por um a partir do final de não redução de amidos. A glucoamilase ou amiloglicosidase é uma enzima de tipo exo que cliva α -ligações 1,4-glicosídeo para taxar uma unidade de glicose um por um a partir do final de não redução de amidos e também cliva-se ligações α -1,6-glicosídeo contido uma amilopectina. A fim de diretamente produzir a glicose a partir do amidos, glucoamilase ou amiloglicosidase é amplamente usado para a produção de glicose e é também uma enzima preferida pela presente invenção.

[0110] Existem quaisquer exemplos de reações de sacarificação de amidos derivados de sementes, que também são industrialmente implementados (Robertson, G.H. et al., 2006, J. Agric. Food Chem., 54:353-365). Na mesma maneira como aqueles destes exemplos, um

produto de sacarificação pode ser obtido a partir de corpos de algas por uma enzima enzimática. Quando uma solução contendo os corpos de algas interrompidos é submetido a um tratamento de enzima, é preferível para usar, como um pré-tratamento, ebulição, ultrassonicação, um tratamento alcalino e assim por diante em combinação (Izumo A. et al., 2007, Plant Science, 172:1138-1147).

[0111] As condições da reação enzimáticas podem ser adequadamente determinadas de acordo com as características da enzima a ser usada. Por exemplo, pela amiloglucosidase (Sigma Aldrich, A-9228), uma concentração de enzima de 2 a 20 U/mL, a temperatura de 40 a 60°C e pH 4 a 6 são preferidos. Se um ácido orgânico que pode ser assimilado por uma bactéria usada pela produção de L-aminoácido é usado para o ajuste de pH como um tampão, o ácido orgânico pode ser usado como uma fonte de carbono junto com o produto de sacarificação de amidos. Por exemplo, o produto de reação de enzima como este pode ser adicionado ao meio.

[0112] <4> Bactéria usada nas presentes invenções

[0113] Na presente invenção, uma bactéria tendo uma capacidade que produz L-aminoácido é usada. A bactéria não é particularmente limitada, contanto que pode eficientemente produzir um L-aminoácido a partir de substâncias orgânicas produzidas por microalgas, em particular, um produto de sacarificação de amidos ou um hidrolisado de gordura ou óleo. Os exemplos de uma bactéria incluem, por exemplo, bactéria que pertence à família *Enterobacteriaceae* tal como aquele do gênero *Escherichia*, *Pantoea*, *Enterobacter* e assim por diante e denominado bactéria corineforme tal como aquele pertencente ao gênero *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium* ou outros, mas uma bactéria não é limitada a estes.

[0114] A bactéria que produz L-aminoácido usada na presente invenção pode ser modificada para aumentar uma capacidade de

utilizar o hidrolisado de gorduras e óleos ou ácidos graxos. Os exemplos de tal modificação incluem, por exemplo, anulação do gene codificado quanto ao fator de transcrição FadR tendo uma capacidade de ligação DNA para controle do metabolismo de ácido graxo observado em enterobactéria (DiRusso, C.C. et al., 1992, J. Biol. Chem., 267:8685-8691; DiRusso, C.C. et al., 1993, Mol. Microbiol., 7:311-322). Especificamente, o gene *fadR* de *Escherichia coli* é um gene que localiza os números de nucleotídeos 1.234.161 a 1.234.880 da sequência de genoma da cepa *Escherichia coli* MG1655 registrada com Acesso Genbank N°. U00096 e codificada pela proteína registrada com Acesso Genbank N°. AAC74271. A sequência do gene *fadR* de *Escherichia coli* é mostrado na SEQ ID N°: 16.

A fim de intensificar a capacidade de assimilar os hidrolisados de gorduras e óleos ou ácidos graxos, quantidades de expressão de um ou mais dos genes selecionados de *fadA*, *fadB*, *fadI*, *fadJ*, *fadL*, *fadE* e *fadD* podem ser aumentados.

[0115] O gene “*fadL*” referido na presente invenção significa um gene que codifica um transportador da membrana externa tendo uma capacidade de absorver o ácido graxo de cadeia longa, que é observado na bactéria da família *Enterobacteriaceae* (Kumar, G.B. and Black, P.N., 1993, J. Biol. Chem., 268:15469-15476; Stenberg, F. et al., 2005, J. Biol. Chem., 280:34409-34419). Os exemplos específicos do gene que codifica FadL incluem o gene localizado nos números de nucleotídeos 2459322 a 2460668 da sequência genômica *Escherichia coli* (Acesso Genbank N°. U00096) como o gene *fadL* de *Escherichia coli*.

[0116] O “gene *fadD*” referido na presente invenção significa um gene codificado por uma enzima tendo a atividade de sintetase acil-CoA graxo, que gera acil-CoA graxo a partir de um ácido graxo de cadeia longa e absorvido através da membrana inerte, que é observado na bactéria da família *Enterobacteriaceae* (Dirusso, C.C. and Black, P.N., 2004, J. Biol.

Chem., 279:49563-49566; Schmelter, T. et al., 2004, J. Biol. Chem., 279: 24163-24170). Os exemplos específicos do gene que codifica FadD incluem o gene localizado nos números de nucleotídeos 1887770 a 1886085 (filamento complementar) da sequência genômica *Escherichia coli* (Acessão Genbank N°. U00096) como o gene *fadD* de *Escherichia coli*.

[0117] O “gene *fadE*” referido na presente invenção significa um gene que codifica uma enzima tendo a atividade de desidrogenase acil-CoA, que oxidiza acil-CoA graxo e é observado na bactéria da família *Enterobacteriaceae* (O'Brien, W.J. and Frerman, F.E. 1977, J. Bacteriol., 132:532-540; Campbell, J.W. and Cronan, J.E., 2002, J. Bacteriol., 184:3759-3764).

[0118] Os exemplos específicos do gene codificado quanto ao FadE incluem o gene localizado nos números de nucleotídeos 243303 a 240859 (filamento complementar) da sequência genômica *Escherichia coli* (Acessão Genbank N°. U00096) e tendo a sequência de nucleotídeo mostrado na SEQ ID N°: 7 como o gene *fadE* de *Escherichia coli*. A sequência de aminoácido codificado por este gene é mostrado na SEQ ID N°: 8.

[0119] O “gene *fadB*” referido na presente invenção significa um gene codificado quanto uma enzima que é um componente α de um complexo de oxidação de ácido graxo observado na bactéria da família *Enterobacteriaceae* e tem quatro grupos de atividades de enoil-CoA hidratase, 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase, 3-hidroxiacil-CoA epimerase e Δ^3 -cis- Δ^2 -trans-enoil-CoA isomerase (Pramanik, A. et al., 1979, J. Bacteriol., 137:469-473; Yang, S.Y. and Schulz, H., 1983, J. Biol. Chem., 258:9780-9785). Os exemplos específicos do gene codificado quanto FadB incluem o gene localizado nos números de nucleotídeos 4028994 a 4026805 (filamento complementar) da sequência genômica *Escherichia coli* (Acessão Genbank N°. U00096) como o gene *fadB* de *Escherichia coli*.

[0120] O “gene *fadA*” referido na presente invenção

significa um gene codificado quanto uma enzima que é um componente β do complexo de oxidação de ácido graxo observado na bactéria *Enterobacteriaceae* da família e mostra a atividade 3-quetoacil-CoA tiolase (Pramanik, A. et al., 1979, J. Bacteriol., 137: 469-473). Os exemplos específicos do gene codificado quanto FadA incluem o gene localizado nos números de nucleotídeos 4026795 a 4025632 (filamento complementar) da sequência genômica *Escherichia coli* (Acesso Genbank N°. U00096) como o gene *fadA* de *Escherichia coli*.

[0121] É conhecido que FadB e FadA formam um complexo no complexo de oxidação de ácido graxo observado na bactéria da família *Enterobacteriaceae* e os genes também formam o operon *fadBA* (Yang, S.Y. et al., 1990, J. Biol. Chem., 265:10424-10429). Portanto, como o operon *fadBA*, o operon total também pode ser amplificado.

[0122] A capacidade de assimilar o hidrolisado de gorduras e óleos ou ácidos graxos também podem ser intensificados para intensificar o operon *cyo* (*cyoABCDE*). O “*cyoABCDE*” referido na presente invenção significa um grupo de genes codificado quanto as subunidades do citocromo ao complexo de oxidase terminal como uma das oxidases terminais observadas na bactéria *Enterobacteriaceae* da família. O *cyoB* é um gene codificado quanto a subunidade I, *cyoA* é um gene que codifica a subunidade II, *cyoC* é um gene que codifica a subunidade III, *cyoC* é um gene que codifica a subunidade IV e *cyoE* é um gene que codifica uma enzima mostrando a atividade de sintase heme O (Gennis, R.B. and Stewart, V., 1996, pp.217-261, In F.D. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and Molecular Biology/Second Edition, American Society for Microbiology Press, Washington, D.C; Chepuri et al., 1990, J. Biol. Chem., 265:11185-11192).

[0123] Os exemplos específicos do gene codificado quanto *cyoA* incluem o gene localizado nos números de nucleotídeos 450834 a

449887 (filamento complementar) da sequência genômica *Escherichia coli* (Acessão Genbank N°. U00096) como o gene *cyoA* de *Escherichia coli*. Os exemplos específicos do gene codificado quanto *cyoB* incluem o gene localizado nos números de nucleotídeos 449865 a 447874 (filamento complementar) da sequência genômica *Escherichia coli* (Acessão Genbank N°. U00096) como o gene *cyoB* de *Escherichia coli*. Os exemplos específicos do gene codificado quanto *cyoC* incluem o gene localizado nos números de nucleotídeos 447884 a 447270 (filamento complementar) da sequência genômica *Escherichia coli* (Acessão Genbank N°. U00096) como o gene *cyoC* de *Escherichia coli*. Os exemplos específicos do gene codificado quanto *cyoD* incluem o gene localizado nos números de nucleotídeos 447270 a 446941 (filamento complementar) da sequência genômica *Escherichia coli* (Acessão Genbank N°. U00096) como gene *cyoD* de *Escherichia coli*. Os exemplos específicos do gene codificado quanto *cyoE* incluem o gene localizado nos números de nucleotídeos 446929 a 446039 (filamento complementar) da sequência genômica *Escherichia coli* (Acessão Genbank N°. U00096) como o gene *cyoE* de *Escherichia coli*.

[0124] A bactéria usada para a presente invenção pode ser uma bactéria modificada de modo que a atividade da sintase de piruvato ou piruvato:NADP⁺ oxidoreductase é intensificado (refere-se ao WO2009/031565).

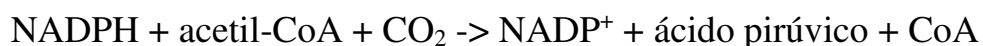
[0125] A “sintase de piruvato” referido na presente invenção significa uma enzima reversível catalisando a reação seguinte, que gera o ácido pirúvico de acetil-CoA e CO₂ na presença de um doador de elétron tal como ferredoxina e flavodoxina (EC 1.2.7.1). Sintase de piruvato pode ser abreviada como PS e pode ser piruvato oxidoreductase projetado, piruvato ferredoxina oxidoreductase, piruvato flavodoxina oxidoreductase ou piruvato oxidoreductase. Como o doador de elétron, ferredoxina ou flavodoxina pode ser usado.

[0126] Ferredoxina reduzida + acetil-CoA + CO₂ -> ferredoxina oxidizada + ácido pirúvico + CoA

[0127] A intensificação da atividade da sintase de piruvato pode ser confirmada pela preparação das soluções de enzima bruta a partir do microorganismo antes da intensificação e o microorganismo após a intensificação e comparando a síntese de atividades de piruvato destes. A atividade de sintase de piruvato pode ser medido por, por exemplo, o método de Yoon et al. (Yoon, K.S. et al., 1997, Arch. Microbiol. 167:275-279). Por exemplo, a medição pode ser ligada pela adição de ácido pirúvico a uma mistura de reação contendo metilviologênio oxidizado como um aceitador de elétron, CoA e uma solução de enzima bruta e espectroscopicamente medindo a quantidade de metilviologênio reduzido, com aumento devido à descarboxilação de ácido pirúvico. Uma unidade (U) da atividade enzimática é definida como uma atividade de redução de 1 µmol de metilviologênio por 1 minuto. Quanto a cepa precursora tem a atividade de sintase de piruvato, a atividade desejável aumenta, por exemplo, preferivelmente 1,5 vezes ou mais, mais preferivelmente 2 vezes ou mais, ainda mais preferivelmente 3 vezes ou mais, comparado com aquele da cepa precursora. Quando a cepa precursora não tem a atividade de sintase de piruvato, embora seja suficiente que a sintase de piruvato é produzida pela introdução da sintase de gene piruvato, a atividade é preferivelmente intensificado em uma tal extensão que a atividade enzimática pode ser medida e a atividade é preferivelmente 0,001 U/mg (proteína da célula) ou mais alta, mais preferivelmente 0,005 U/mg ou mais alta, ainda mais preferivelmente 0,01 U/mg ou mais alta. Sintase de piruvato é sensível ao oxigênio e expressão de atividade e medição são geralmente frequentemente difíceis (Buckel, W. and Golding, B.T., 2006, Ann. Rev. of Microbiol., 60:27-49). Portanto, quando a atividade enzimática é medida, é preferível para realizar a reação enzimática com redução da concentração de oxigênio em um recipiente de reação.

[0128] Como o gene que codifica a sintase de piruvato, é possível para usar os genes da sintase de piruvato a partir da bactéria tendo um ciclo TCA redutivo tal como a sintase de genes piruvato a partir de *Chlorobium tepidum* e *Hydrogenobacter thermophilus*. Além disso, também é possível usar a sintase de genes piruvato de bactéria pertencente a bactéria *Eenterobacteriaceae* da família incluindo *Escherichia coli*. Além disso, como o gene codificado quanto a sintase de piruvato, sintase de genes piruvato de metanogênicos autotróficos tal como *Methanococcus maripaludis*, *Methanocaldococcus jannaschii* e *Methanothermobacter thermautotrophicus*.

[0129] A “piruvato:NADP⁺ oxidoreductase” referido na presente invenção significa um enzima reversivelmente catalisando a seguinte reação, que gera o ácido pirúvico a partir de acetil CoA e CO₂, na presença de um doador de elétron tal como NADPH ou NADH (EC 1.2.1.15). O piruvato:NADP⁺ oxidoreductase pode ser abreviado como PNO e pode ser projetado piruvato desidrogenase. Entretanto, a “atividade piruvato desidrogenase” referido na presente invenção é uma atividade de catalização da descarboxilação oxidativa de ácido pirúvico para gerar acetil-CoA, como descrito por último e piruvato desidrogenase (PDH) que catalisa esta reação é uma enzima diferente de piruvato:NADP⁺ oxidoreductase. Piruvato:NADP⁺ oxidoreductase pode usar NADPH ou NADH como o doador de elétron.



[0130] A intensificação de atividade piruvato:NADP⁺ oxidoreductase pode ser confirmado pela preparação de soluções de enzima bruta a partir do microorganismo antes da intensificação e o microorganismo após a intensificação e comparação de atividades piruvato:NADP⁺ oxidoreductase destes. A atividade de piruvato:NADP⁺ oxidoreductase pode ser medida por, por exemplo, o método de Inui et al. (Inui, H., et al., 1987, J. Biol. Chem., 262:9130-9135). Por exemplo, a medição pode ser ligada pela adição de ácido pirúvico a uma mistura de reação contendo metilviologênio

oxidizado como um aceitador de elétron, CoA e uma solução de enzima bruta e espectroscopicamente medindo a quantidade de metilviologênio reduzido, que aumenta devido a descarboxilação de ácido pirúvico. Uma unidade (U) da atividade enzimática é definida como uma atividade de redução de 1 μ mol de metilviologênio por 1 minuto. Quando a cepa precursora tem a atividade piruvato:NADP⁺ oxidoreductase, a atividade desejavelmente aumenta 1,5 vezes ou mais, mais preferivelmente 2 vezes ou mais, ainda mais preferivelmente 3 vezes ou mais, comparado com aquele da cepa precursora. Quando a cepa precursora não tem a atividade de piruvato:NADP⁺ oxidoreductase, embora é suficiente que o piruvato:NADP⁺ oxidoreductase seja produzido pela introdução do gene piruvato:NADP⁺ oxidoreductase, a atividade é preferivelmente intensificada tal que uma extensão daquela atividade enzimática pode ser medida e a atividade é preferivelmente 0,001 U/mg (proteína da célula) ou mais alta, mais preferivelmente 0,005 U/mg ou mais alta, ainda mais preferivelmente 0,01 U/mg ou mais alta. Piruvato:NADP⁺ oxidoreductase é sensível ao oxigênio e expressão de atividade e medição são geralmente frequentemente difíceis (Inui, H., et al, 1987, J. Biol. Chem., 262: 9130-9135; Rotte, C. et al., 2001, Mol. Biol. Evol., 18:710-720).

[0131] Como para o gene codificado quanto piruvato:NADP⁺ oxidoreductase, é conhecido que, além do gene piruvato:NADP⁺ oxidoreductase de *Euglena gracilis*, que é um microorganismo eucariótico fotossintético e também é classificado nos protozoários (Nakazawa, M. et al., 2000, FEBS Lett., 479:155-156) e o gene piruvato:NADP⁺ oxidoreductase de um protista, *Cryptosporidium parvum* (Rotte, C. et al., 2001, Mol. Biol. Evol., 18:710-720), um gene homólogo também existe em Bacillariophyta, *Tharassiosira pseudonana* (Ctrnacta, V. et al., 2006, J. Eukaryot. Microbiol., 53:225-231).

[0132] Especificamente, o gene piruvato:NADP⁺

oxidoreductase de *Euglena gracilis* pode ser usado (Acesso Genbank N°. AB021127).

[0133] O microorganismo da presente invenção pode ser um microorganismo modificado de modo que a atividade da sintase de piruvato é aumentada por uma tal modificação que a atividade para a reciclagem do doador de elétron oxidizado pelo doador de elétron reduzido, que é requerido pela atividade de sintase de piruvato, o aumento comparado com uma cepa precursora, por exemplo, uma cepa do tipo selvagem ou uma cepa não modificada. Exemplos da atividade para a reciclagem do doador de elétron oxidizado para reduzir o doador de elétron inclui a atividade ferredoxina NADP⁺ redutase. Ainda, o microorganismo pode ser um microorganismo modificado de modo que a atividade de sintase de piruvato é aumentada de modo que a atividade de sintase de piruvato aumenta, além disso à intensificação da atividade de reciclagem de doador de elétron. A cepa precursora anteriormente mencionada pode ser uma cepa inerentemente tendo um gene codificado quanto a atividade de reciclagem doadora de elétron ou uma cepa que não inerentemente tem a atividade de reciclagem doadora de elétron, mas essa atividade pode ser concedida pela introdução de um gene codificado quanto a atividade, de modo que a capacidade que produz L-aminoácido é melhorado.

[0134] A “ferredoxina NADP⁺ redutase” significa uma enzima que reversivelmente catalisa a seguinte reação (EC 1.18.1.2).



[0135] Esta reação é uma reação reversível e pode gerar a ferredoxina reduzida na presença de NADPH e a ferredoxina oxidizada. Ferredoxina é substituído com flavodoxina e a enzima projetada flavodoxina NADP⁺ redutase também tem uma função equivalente. A existência de ferredoxina NADP⁺ redutase é confirmada em uma ampla variedade de organismos que varia de microorganismos aos organismos mais altos (refere-

se ao Carrillo, N. and Ceccarelli, E.A., 2003, Eur. J. Biochem., 270:1900-1915; Ceccarelli, E.A. et al., 2004, Biochim. Biophys. Acta., 1698:155–165) e alguma das enzimas também são nomeadas ferredoxina NADP⁺ oxidoreductase ou NADPH-ferredoxina oxidoreductase.

[0136] A intensificação de atividade ferredoxina NADP⁺ redutase pode ser confirmada pela preparação das soluções de enzima bruta a partir do microorganismo antes da modificação e o microorganismo após a modificação e comparação da atividade de ferredoxina NADP⁺ redutase deste. A atividade de ferredoxina NADP⁺ redutase pode ser medida por, por exemplo, o método de Blaschkowski et al. (Blaschkowski, H.P. et al., 1982, Eur. J. Biochem., 123:563-569). Por exemplo, a atividade pode ser medida pelo uso de ferredoxina como um substrato para medir espectroscopicamente a quantidade de NADPH. Uma unidade (U) da atividade enzimática é definida como a atividade para a oxidação 1 µmol de NADPH por 1 minuto. Quando a cepa precursora tem a atividade ferredoxina NADP⁺ redutase e a atividade da cepa precursora é suficientemente alta, não é necessário para intensificar a atividade. Entretanto, a atividade enzimática é desejavelmente aumentada 1,5 vezes ou mais, mais preferivelmente 2 vezes ou mais, ainda mais preferivelmente 3 vezes ou mais, comparado com aquele da cepa precursora.

[0137] Os genes que codifica a ferredoxina NADP⁺ redutase são observados em muitas espécies biológicas e qualquer um deste que mostra a atividade na cepa que produz L-aminoácido objetivo pode ser usado. Como para *Escherichia coli*, o gene *fpr* foi identificado como o gene para flavodoxina NADP⁺ redutase (Bianchi, V. et al., 1993, 175:1590-1595). Além disso, é conhecido que, em *Pseudomonas putida*, um gene NADPH-putidaredoxina redutase e um gene de putidaredoxina existe como um operon (Koga, H. et al., 1989, J. Biochem. (Tokyo), 106:831-836).

[0138] Exemplos do gene flavodoxina NADP⁺ redutase de *Escherichia coli* incluem o gene *fpr* que é localizado nos números de

nucleotídeos 4111749 a 4112495 (filamento complementar) da sequência genômica da cepa *Escherichia coli* K-12 (Acesso Genbank N°. U00096). Além disso, um gene ferredoxina NADP⁺ redutase (Acesso Genbank N°. BAB99777) também é observado nos números de nucleotídeos 2526234 a 2527211 da sequência genômica de *Corynebacterium glutamicum* (Acesso Genbank N°. BA00036).

[0139] A sintase de atividade de piruvato requer a presença de ferredoxina ou flavodoxina como um doador de elétron. Portanto, o microorganismo pode ser um microorganismo modificado de modo que a atividade de sintase de piruvato é aumentada por uma tal modificação daquela capacidade de produção por ferredoxina ou flavodoxina é melhorado.

[0140] Além disso, o microorganismo também pode ser modificado contando que a capacidade de produção para ferredoxina ou flavodoxina é melhorado, além disso sendo modificado de modo que a atividade de sintase de piruvato ou flavodoxina NADP⁺ redutase e atividades de sintase de piruvato são intensificadas.

[0141] Na presente invenção, a “ferredoxina” refere-se a uma proteína contendo átomos de ferro não heme (Fe) e átomos de enxofre, ligados com um agrupador de enxofre de ferro denominado agrupadores 4Fe-4S, 3Fe-4S ou 2Fe-2S e funcionando como um carregador de elétron. A “flavodoxina” refere-se a uma proteína contendo FMN (flavin-mononucleotídeo) como um grupo protético e funcionamento como um ou dois carregadores de elétron. Ferredoxina e flavodoxina são descritos na referência de McLean et al. (McLean K.J. et al., 2005, Biochem. Soc. Trans., 33:796-801).

[0142] A cepa precursora a ser submetida pela modificação pode ser as cepas que inerentemente tem um gene endógeno que codifica ferredoxina ou flavodoxina. Alternativamente, as cepas precursoras podem ser cepas que não inerentemente tem um gene que codifica ferredoxina ou

flavodoxina, mas que pode ser concedido com a atividade pela introdução de um gene de ferredoxina ou flavodoxina para mostrar a capacidade de produção de ácido L-glutâmico melhorado.

[0143] O melhoramento de ferredoxina ou capacidade de produção de flavodoxina comparado com a cepa precursora tal como uma cepa ou tipo selvagem não modificada pode ser confirmada por, por exemplo, SDS-PAGE, eletroforese bidimensional ou Western blotting usando os anticorpos (Sambrook, J. et al., 1989, Molecular Cloning A Laboratory Manual/Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York). O grau de aumento da quantidade de produção não é particularmente limitado de modo que o aumento comparado com aquele de uma cepa do tipo selvagem ou cepa não modificada. Entretanto, é desejável aumentar, por exemplo, 1,5 vezes ou mais, preferivelmente 2 vezes ou mais, mais preferivelmente 3 vezes ou mais, comparado com aquele de uma cepa do tipo selvagem ou cepa não modificada.

[0144] As atividades de ferredoxina e flavodoxina podem ser medidas pela adição destes a um sistema de reação de redução de oxidação apropriada. Por exemplo, um método que compreende a redução de ferredoxina produzida com ferredoxina NADP⁺ redutase e quantificação da redução de citocromo C pela ferredoxina reduzida produzida é divulgada por Boyer et al. (Boyer, M.E. et al., 2006, Biotechnol. Bioeng., 94:128-138). Além disso, a atividade de flavodoxina pode ser medida pelo mesmo método usando flavodoxina NADP⁺ redutase.

[0145] Os genes que codificam ferredoxina ou flavodoxina são amplamente distribuídos e qualquer um daquele pode ser usado de modo que a ferredoxina ou flavodoxina codificadas pelos genes podem ser utilizadas pela sintase de piruvato e um sistema de reciclagem doador de elétron. Por exemplo, em *Escherichia coli*, o gene *fdx* existe como uma ferredoxina que codifica o gene que tem um agrupador 2Fe-2S (Ta, D.T. and

Vickery, L.E., 1992, J. Biol. Chem., 267:11120-11125) e o gene *yfhL* é esperado como um gene que codifica ferredoxina que tem um agrupador 4Fe-4S. Além disso, como o gene de flavodoxina, o gene *fldA* (Osborne C. et al., 1991, J. Bacteriol., 173:1729-1737) e o gene *fldB* (Gaudu, P. and Weiss, B., 2000, J. Bacteriol., 182:1788-1793) são conhecidos. Na sequência genômica de *Corynebacterium glutamicum* (Acessão Genbank N°. BA00036), genes de ferredoxina múltiplos, *fdx* (Acessão Genbank N°. BAB97942) foram observados nos números de nucleotídeos de 562643 a 562963 e o gene *fer* gene foi observado nos números de nucleotídeos de 1148953 a 1149270 (Acessão Genbank N°. BAB98495). Além disso, em *Chlorobium tepidum*, muitos genes de ferredoxina existem e a ferredoxina I e ferredoxina II foi identificada como os gene de ferredoxina para o tipo 4Fe-4S que serve como o aceitador de elétron de sintase de piruvato (Yoon, K.S. et al., 2001, J. Biol. Chem., 276:44027-44036). O gene de ferredoxina ou flavodoxina de bactéria tendo um ciclo TCA redutivo tal como *Hydrogenobacter thermophilus* também pode ser usado.

[0146] Os exemplos específicos do gene de ferredoxina de *Escherichia coli* incluem o gene *fdx* localizado nos números de nucleotídeos de 2654770 a 2655105 (filamento complementar) da sequência genômica da cepa *Escherichia coli* K-12 (Acessão Genbank N°. U00096) e o gene *yfhL* localizado nos números de nucleotídeos de 2697685 a 2697945 do mesmo.

[0147] Na bactéria que produz L-aminoácido usado na presente invenção, um gene envolvido em metabolismo de glicerol pode ser modificado.

[0148] Como para os genes envolvidos no metabolismo de glicerol, a fim de intensificar a assimilabilidade de glicerol, a expressão do gene *glpR* (EP 1715056) pode ser atenuado ou a expressão dos genes de metabolsimo de glicerol (EP 1715055 A) tal como genes *glpA*, *glpB*, *glpC*, *glpD*, *glpE*, *glpF*, *glpG*, *glpK*, *glpQ*, *glpT*, *glpX*, *tpiA*, *gldA*, *dhaK*, *dhaL*,

dhaM, *dhaR*, *fsa* e *talC* genes podem ser intensificados.

[0149] Em particular, a fim de intensificar a assimilabilidade de glicerol, é preferido que as expressões do gene de desidrogenase glicerol (*gldA*) e o gene cinase de diidroxiacetona dependente de PEP (*dhaKLM*) ou o gene de cinase diidroxiacetona dependente por ATP (*dak*) são intensificadas em combinação. Além disso, a expressão de frutose-6-fosfato aldolase (*fsaB*) pode ser intensificado (WO2008/102861).

[0150] Ainda, como para a cinse glicerol (*glpK*), é preferido ao uso de um gene *glpK* dessensibilizado à inibição de regeneração pela frutose-1,6-fosfato (WO2008/081959, WO2008/107277)

[0151] A família *Enterobacteriaceae* inclui a bactéria que pertence ao gênero *Escherichia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Photorhabdus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Morganella*, *Yersinia* e outros. Em particular, a bactéria classificada em uma família *Enterobacteriaceae* de acordo com a taxonomia usada pelos bancos de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=91347>) são preferidos.

[0152] A bactéria que pertence ao gênero *Escherichia* que pode ser usado na presente invenção não é particularmente limitado. Entretanto, exemplos incluem, por exemplo, a bactéria dos grupos filéticos descritos no trabalho de Neidhardt et al. (Neidhardt F.C. Ed., 1996, *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology/segunda edição, pp.2477-2483, tabela 1, American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.). Os exemplos específicos incluem o *Escherichia coli* W3110 (ATCC 27325), *Escherichia coli* MG1655 (ATCC 47076) e outros derivados da cepa de tipo selvagem de prototipo, cepa K12.

[0153] Estas cepas são disponíveis de, por exemplo, the American Type Culture Collection (endereço: P.O. Box 1549, Manassas, VA

20108, United States of America). Isto é, números de registro são dados em cada uma das cepas e as cepas podem ser ordenadas pelo uso destes números. Os números de registro das cepas são listados no catálogo de American Type Culture Collection. O mesmo deve aplicar as cepas mencionadas abaixo com os números ATCC.

[0154] A bactéria que pertence ao gênero *Pantoea* significa que a bactéria é classificada no gênero *Pantoea* de acordo com a classificação conhecida à pessoa habilitada na técnica de microbiologia. Algumas espécies de *Enterobacter agglomerans* foram recentemente re-classificadas em *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea stewartii* ou outros, com base na análise da sequência de nucleotídeo de 16S rRNA, etc. (Int. J. Syst. Bacteriol., 1993, 43, 162-173). Na presente invenção, a bactéria que pertence ao gênero *Pantoea* inclui tal bactéria re-classificada no gênero *Pantoea* como descrito acima.

[0155] As cepas típicas de bactéria *Pantoea* inclui *Pantoea ananatis*, *Pantoea stewartii*, *Pantoea agglomerans* e *Pantoea citrea*. Os exemplos específicos incluem as seguintes cepas:

Pantoea ananatis AJ13355 (FERM BP-6614, Patente Européia Aberta ao público N°. 0952221)

Pantoea ananatis AJ13356 (FERM BP-6615, Patente Européia Aberta ao público N°. 0952221)

[0156] Embora estas cepas são descritas como *Enterobacter agglomerans* na Patente Européia Aberta ao público N°. 0952221, estes são correntemente classificados como *Pantoea ananatis* na base da análise da sequência de nucleotídeo de 16S rRNA etc., como descrito acima.

[0157] Os exemplos de bactéria *Enterobacter* incluem *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes* e outros. Especificamente, as cepas exemplificadas no Pedido de Patente Européia Aberta ao público N°. 952221 pode ser usado. As cepas típicas do gênero

Enterobacter incluem a cepa *Enterobacter agglomerans* ATCC 12287.

[0158] Exemplos da bactéria *Erwinia* incluem *Erwinia amilovora* e *Erwinia carotovora* e exemplos da bactéria *Klebsiella* incluem *Klebsiella planticola*. Os exemplos específicos incluem as seguintes cepas:

Cepa *Erwinia amilovora* ATCC 15580

Cepa *Erwinia carotovora* ATCC 15713

Cepa *Klebsiella planticola* AJ13399 (FERM BP-6600, Patente Européia Aberta ao público N°. 955368)

Cepa *Klebsiella planticola* AJ13410 (FERM BP-6617, Patente Européia Aberta ao público N°. 955368)

[0159] Na presente invenção, a bactéria corineforme também inclui a bactéria que foram previamente classificados no gênero *Brevibacterium* mas são presentemente unidos no gênero *Corynebacterium* (Liebl and W. et al, 1991, Int. J. Syst. Bacteriol., 41:255-260) e bactéria que pertence ao gênero *Brevibacterium*, que são próximo relacionados ao gênero *Corynebacterium*. Os exemplos específicos de tal bactéria corineforme incluem os seguintes:

Corynebacterium acetoacidophilum

Corynebacterium acetoglutamicum

Corynebacterium alkanolyticum

Corynebacterium callunae

Corynebacterium glutamicum

Corynebacterium lilium

Corynebacterium melassecola

Corynebacterium thermoaminogenes (*Corynebacterium efficiens*)

Corynebacterium herculis

Brevibacterium divaricatum

Brevibacterium flavum

Brevibacterium immariophilum

Brevibacterium lactofermentum (*Corynebacterium glutamicum*)

Brevibacterium roseum

Brevibacterium saccharolyticum

Brevibacterium tiogenitalis

Corynebacterium ammoniagenes

Brevibacterium album

Brevibacterium cerinum

Microbacterium ammoniaphilum

Os exemplos específicos desta bactéria incluem as seguintes cepas:

Corynebacterium acetoacidophilum ATCC 13870

Corynebacterium acetoglutamicum ATCC 15806

Corynebacterium alkanolyticum ATCC 21511

Corynebacterium callunae ATCC 15991

Corynebacterium glutamicum ATCC 13020, ATCC 13032, ATCC 13060

Corynebacterium lilium ATCC 15990

Corynebacterium melassecola ATCC 17965

Corynebacterium thermoaminogenes AJ12340 (FERM BP-1539)

Corynebacterium herculis ATCC 13868

Brevibacterium divaricatum ATCC 14020

Brevibacterium flavum ATCC 13826, ATCC 14067

Brevibacterium immariophilum ATCC 14068

Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869
(*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869)

Brevibacterium roseum ATCC 13825

Brevibacterium saccharolyticum ATCC 14066

Brevibacterium tiogenitalis ATCC 19240

Brevibacterium ammoniagenes ATCC 6871, ATCC 6872

Brevibacterium album ATCC 15111

Brevibacterium cerinum ATCC 15112

Microbacterium ammoniaphilum ATCC 15354

[0160] Na presente invenção, a bactéria tendo uma capacidade de produção de aminoácido refere-se a uma bactéria tendo uma capacidade para produzir um L-aminoácido e secretar em um meio quando este é cultivado no meio, preferivelmente tal como uma bactéria que acumula-se ao L-aminoácido objetivo no meio em uma quantidade de 0,5 g/L ou mais, mais preferivelmente 1,0 g/L ou mais. O L-aminoácido inclui L-alanina, L-arginina, L-asparagina, ácido L-asparático, L-cisteína, ácido L-glutâmico, L-glutamina, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L-tirosina, e L-valina. L-Treonina, L-lisina, e ácido L-glutâmico são particularmente preferidos.

[0161] Os métodos para transmitir uma capacidade que produz L-aminoácido em tal bactéria como mencionado acima e os métodos para intensificação de uma capacidade que produz L-aminoácido de tal bactéria como mencionado acima são descritos abaixo.

[0162] Para transmitir a capacidade de produzir um L-aminoácido, os métodos convencionalmente utilizados na criação de bactéria corineforme que produz aminoácido do gênero *Escherichia* (ver “Amino Acid Fermentation”, Gakkai Shuppan Center (Ltd.), 1º edição, publicado em 30 de Maio de 1986, pp.77-100) pode ser usado. Tais métodos incluem para adquirir as propriedades de um mutante auxotrófico, uma cepa resistente ao análogo de L-aminoácido ou um mutante de regulação metabólica ou pela construção de uma cepa recombinante de modo que este super expressa uma enzima de

biossíntese de L-aminoácido. Visto que na criação da bactéria que produz L-aminoácido, uma ou mais das propriedades descritas acima tal como auxotrofia, resistência de análogo e mutação de regulação metabólico pode ser concedido. A expressão de enzimas de biossíntese de L-aminoácido pode ser intensificada sozinho ou em combinações de dois ou mais. Além disso, os métodos de conceder as propriedades tal como uma auxotrofia, resistência de análogo ou mutação de regulação metabólico pode ser combinado com a intensificação das enzimas de biossíntese.

[0163] Uma cepa mutante auxotrófica, cepa resistente de análogo L-aminoácido ou cepa mutante de regulação metabólica com a capacidade para produzir um L-aminoácido pode ser obtido por submeter uma cepa precursora ou tipo selvagem à mutagênese convencional, tal como exposição no raio X ou irradiação UV ou tratamento com um mutagênio tal como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, então selecionado aquele que exibe autotrofia, resistência ao análogo ou uma mutação de regulação metabólica e que também tem a capacidade para produzir um L-aminoácido.

[0164] Além disso, a capacidade que produz L-aminoácido também pode ser concedido ou intensificado pelo aumento da atividade enzimática pela recombinação do gene. Um exemplo do método para o aumento da atividade enzimática inclui a modificação da bactéria de modo que a expressão de um gene codificado quanto uma enzima envolvida na biossíntese de um L-aminoácido é intensificado. A expressão do gene também pode ser aumentado pela introdução de um plasmídeo de amplificação preparado pela introdução de um fragmento DNA contendo o gene em um plasmídeo apropriado que contém, por exemplo, pelo menos um gene responsável pela replicação e proliferação do plasmídeo no microorganismo, aumento no número de cópias do gene no cromossomo pela conjugação, transferência ou outros ou introdução de uma mutação na região promotora do gene (refere-se a Publicação Internacional WO95/34672).

[0165] Quando um gene objetivo é introduzido no plasmídeo de amplificação anteriormente mencionado ou cromossomo, qualquer promotor pode ser usado para expressar o gene deste modo as funções promotoras escolhidas na bactéria corineforme. O promotor pode ser o promotor natural pelo gene ou um promotor modificado. A expressão de um gene também pode ser controlado pela escolha adequada de um promotor que fortemente funciona na bactéria corineforme ou pela fabricação das regiões -35 e -10 do promotor mais próximo à sequência consenso. Estes métodos para a intensificação da expressão dos genes de enzima são totalmente descritos na Publicação Internacional WO00/18935, Publicação de Patente Européia N°. 1010755 e assim por diante.

[0166] Os métodos específicos para a transmissão da capacidade que produz L-aminoácido a bactéria e a bactéria transmitida com a capacidade que produz L-aminoácido são exemplificados abaixo.

[0167] Bactéria que produz L-Treonina

[0168] Exemplos preferidos de microorganismos tendo a capacidade de produzir L-treonina incluem a bactéria em que uma ou mais atividades de enzimas de sistema de biossíntese de L-treonina são intensificadas. Os exemplos de enzimas de biossíntese de L-treonina incluem aspartocinase III (*lysC*), aspartato semialdeído desidrogenase (*asd*), aspartocinase I (*thrA*), homoserina cinase (*thrB*), treonina sintase (*thrC*) codificado por *thr* operon e aspartato aminotransferase (aspartato transaminase) (*aspC*). Os nomes dos genes codificados quanto as enzimas respectivas são mencionadas no parêntese após os nomes das enzimas (o mesmo deve aplicar em toda parte esta especificação). Entre estas enzimas, aspartato semialdeído desidrogenase, aspartocinase I, homoserina cinase, aspartato aminotransferase e treonina sintase são particularmente exemplos preferidos. Os genes codificados quanto as enzimas biossintéticas de L-treonina podem ser introduzidos em uma bactéria *Escherichia* que tem uma

capacidade reduzida para decompor a treonina. Um exemplo de uma tal bactéria *Escherichia* tendo uma capacidade reduzida para decompor a treonina é a cepa TDH6 que é deficiente na atividade de desidrogenase treonina (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 2001-346578).

[0169] As atividades enzimáticas das enzimas biossintéticas de L-treonina são inibidas pelo produto final, L-treonina. Portanto, para a construção das cepas que produz L-treonina, é desejado que os genes para as enzimas biossintéticas de L-treonina são modificadas de modo que as enzimas são dessensibilizadas pela inibição de regeneração pela L-treonina nas cepas de produção de L-treonina. Os genes *thrA*, *thrB* e *thrC* anteriormente mencionados constituem a treonina operon, que formam uma estrutura atenuadora. A expressão de treonina operon é inibida por isoleucina e treonina no meio de cultura e também suprimido pela atenuação. Portanto, a treonina operon pode ser modificado pela remoção da sequência líder na região de atenuação ou atenuador (refere-se ao Lynn, S.P., et al., J. Mol. Biol. 194:59-69 (1987); WO02/26993; WO2005/049808).

[0170] O promotor natural de treonina operon está presente a montante de treonina operon e pode ser substituído com um promotor não natural (refere-se ao WO98/04715) ou uma treonina operon que foi modificado de modo que a expressão do gene de biossíntese é controlado pelo repressor e promotor de fago λ pode ser construído (EP 0593792). Além disso, a fim de modificar a bactéria de modo que é dessensibilizado a inibição de regeneração por L-treonina, uma cepa resistente ao ácido α -amino- β -hidroxiiisovalérico (AHV) pode ser selecionado.

[0171] É preferível que o número de cópia de treonina operon que é modificado para dessensibilizar a inibição de regeneração por L-treonina pode ser aumentado ou a expressão de treonina operon pode ser aumentado pela ligação ao promotor potente. O número de cópia também pode ser aumentado por, além disso, a amplificação usando um plasmídeo,

transferindo a treonina operon a um genoma usando um transposon, fago Mu ou outros.

[0172] Outro do que o aumento da expressão dos genes biossintéticos L-treonina, expressão dos genes envolvidos no caminho glicolítico, ciclo TCA ou cadeia respiratória, os genes que regulam a expressão destes genes ou os genes envolvidos na absorção de açúcar também pode ser preferivelmente aumentado. Os exemplos de tais genes efetivos pela produção L-treonina incluem os genes codificados por transidrogenase (*pntAB*, EP 733712 B), fosfoenolpiruvato carboxilase (*pepC*, WO95/06114), fosfoenolsintase de piruvato (*pps*, EP 877090 B) e um gene que codifica o piruvato carboxilase a partir da bactéria corineforme ou bactéria *Bacillus* (WO99/18228, EP 1092776 A).

[0173] A resistência a L-treonina, L-homoserina ou ambos pode ser preferivelmente concedido ao hospedeiro por, por exemplo, intensificando a expressão de um gene que concede a resistência a L-treonina ou L-homoserina. Os exemplos destes genes incluem o gene *rhtA* (Livshits, V.A. et al., 2003, Res. Microbiol., 154:123-135), *rhtB* (EP 0994190 A), gene *rhtC* (EP 1013765 A), *yfiK* e genes *yeaS* (EP 1016710 A). Os métodos para a transmissão da resistência à L-treonina a um hospedeiro são descritos em EP 0994190 A e WO90/04636.

[0174] Os exemplos de bactéria que produz L-treonina e as cepas precursoras que podem ser usadas para derivar tal bactéria inclui, mas não são limitados a, cepas que pertencem ao gênero *Escherichia*, tal como *E. coli* TDH-6/pVIC40 (VKPM B-3996) (Patente U.S. N°. 5.175.107, Patente U.S. N°. 5.705.371), *E. coli* 472T23/pYN7 (ATCC 98081) (Patente U.S. N°. 5.631.157), *E. coli* NRRL-21593 (Patente U.S. N°. 5.939.307), *E. coli* FERM BP-3756 (Patente U.S. N°. 5.474.918), *E. coli* FERM BP-3519 e FERM BP-3520 (Patente U.S. N°. 5.376.538), *E. coli* MG442 (Gusyatiner et al., Genetika (in Russian), 14, 947-956 (1978)), *E. coli* VL643 e VL2055 (EP

1149911 A) e assim por diante.

[0175] A cepa TDH-6 é deficiente no gene *thrC*, bem como sendo sacarose-assimilativa e o gene *ilvA* tem uma mutação *leaky*. Esta cepa também tem uma mutação no gene *rhtA*, que concede a resistência a concentração alta de treonina ou homoserina. A cepa B-3996 contém o plasmídeo pVIC40, que foi obtido pela inserção de *thrA*BC* operon, incluindo um gene mutante *thrA*, no vetor derivado de RSF1010. Este gene mutante *thrA* codifica um aspartocinase homoserina desidrogenase I que é substancialmente dessensibilizado pela inibição de regeneração por treonina. A cepa B-3996 foi depositada em 19 de Novembro de 1987 in the All-Union Scientific Center of Antibiotics (Nagatinskaya Street 3-A, 117105 Moscow, Russia) sob o número de acesso RIA 1867. A cepa também foi depositada na Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Russia) em 7 de Abril de 1987 son o número de acesso VKPM B-3996.

[0176] *E. coli* VKPM B-5318 (EP 0593792 B) também pode ser usado como uma bactéria que produz L-treonina ou uma cepa precursora para a derivação deste. A cepa B-5318 é prototrófica com relação a isoleucina e um repressor CI de fago de lambda sensível à temperatura e promotor PR substitui a região reguladora de treonina operon no plasmídeo pVIC40. A cepa VKPM B-5318 foi depositada como um depósito internacional na Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Russia) e 3 de Maio de 1990 sob o número de acesso de VKPM B-5318.

[0177] O gene *thrA* que codifica aspartocinase homoserina desidrogenase I de *Escherichia coli* é um gene localizando nos números de nucleotídeos 337 a 2.799 na sequência de genoma da cepa *Escherichia coli* MG1655 registrada sob Acesso Genbank N°. U00096 e codificada pela proteína registradas sob Acesso Genbank N°. AAC73113. O gene *thrB* que

codifica a homoserina cinase de *Escherichia coli* é um gene localizado nos números de nucleotídeos 2.801 a 3.733 na sequência de genoma da cepa *Escherichia coli* MG1655 registrado sob Acesso Genbank N°. U00096 e codificada pela proteína registrada sob Acesso Genbank N°. AAC73114. O gene *thrC* que codifica treonina sintase de *Escherichia coli* é um gene localizando nos números de nucleotídeos 3.734 a 5.020 na sequência de genoma da cepa *Escherichia coli* MG1655 registrada sob Acesso Genbank N°. U00096 e codificada pela proteína registrado sob Acesso Genbank N°. AAC73115. Estes três genes são codificados como a treonina operon que consiste de *thrLABC* a jusante do gene *thrL* codificado quanto o peptídeo líder. Para intensificar a expressão de treonina operon, a região atenuadora que afeta a transcrição é desejavelmente removida a partir do operon (WO2005/049808, WO2003/097839).

[0178] Um gene mutante *thrA* que codifica para a aspartocinase homoserina desidrogenase I resistente a inibição de regeneração por treonina, bem como os genes *thrB* e *thrC* podem ser obtidos como um operon a partir do plasmídeo pVIC40 bem conhecido, que é presente na treonina que produz a cepa *E. coli* VKPM B-3996. O pVIC40 é descrito em detalhe na Patente U.S. N°. 5.705.371.

[0179] O gene *rhtA* é um gene obtido como um gene que concede a resistência a homoserina e treonina (*rht*: resistente a treonina/homoserina), localizando nos números de nucleotídeos 848.433 a 849.320 (filamento complementar) na sequência de genoma da cepa *Escherichia coli* MG1655 registrado sob Acesso Genbank N°. U00096 e codificada pela proteína registrado sob Acesso Genbank N°. AAC73900. Também, foi relevado que a mutação *rhtA23* é uma substituição A-for-G na posição -1 com relação ao códon de partida ATG (Livshits, V.A. et al., 2003, Res. Microbiol., 154:123-135, EP 1013765 A).

[0180] O gene *asd* de *E. coli* é um gene localizando nos

números de nucleotídeos 3.571.798 a 3.572.901 (filamento complementar) na sequência de genoma da cepa *Escherichia coli* MG1655 registrada sob Acesso Genbank N°. U00096 e codificada pela proteína registrado sob Acesso Genbank N°. AAC76458. Este pode ser obtido por PCR (refere-se ao White, T.J. et al., Trends Genet, 5, 185 (1989)) utilizando os iniciadores preparados com base na sequência de nucleotídeo do gene. Os genes *asd* de outros microorganismos também podem ser obtidos de uma maneira similar.

[0181] O gene *aspC* de *E. coli* é um gene localizando nos números de nucleotídeos 983.742 a 984.932 (filamento complementar) na sequência de genoma da cepa *Escherichia coli* MG1655 registrado sob Acesso Genbank N°. U00096 e codificada pela proteína registrado sob Acesso Genbank N°. AAC74014 e pode ser obtido por PCR. Os genes *aspC* de outros microorganismos também podem ser obtidos em uma maneira similar.

[0182] Bactéria que produz L-Lisina

[0183] A bactéria que produz L-Lisina e os métodos para a construção destes são exemplificados abaixo.

[0184] Os exemplos de cepas tendo capacidade que produz L-lisina incluem, por exemplo, cepas resistentes ao análogo de L-lisina e cepas mutantes de regulação metabólica. Os exemplos de análogo L-lisina incluem, mas não são limitados a, oxalisina, lisina hidroxamato, S-(2-aminoetil)-L-cisteína (também abreviado como “AEC” em seguida), γ -metillisina, α -clorocaprolactam e assim por diante. As cepas mutantes tendo a resistência destes análogos de lisina podem ser obtidos por submeter uma bactéria que pertence à família *Enterobacteriaceae* ou uma bactéria corineforme a um tratamento de mutagênese artificial convencional. Os exemplos específicos de bactéria que produz L-lisina incluem *Escherichia coli* AJ11442 (FERM BP-1543, NRRL B-12185, ver Patente Japonesa Aberta ao público N°. 56-18596 e Patente U.S. N°. 4.346.170), cepa *Escherichia coli*

VL611 (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 2000-189180) e assim por diante. Como uma *Escherichia coli* que produz L-lisina, a cepa WC196 também pode ser usada (ver Publicação Internacional WO96/17930).

[0185] Ainda, uma bactéria que produz L-lisina também pode ser construída pelo aumento da atividade de uma enzima de sistema de biossíntese L-lisina. O aumento da atividade de uma tal enzima pode ser ligada pelo aumento de número de cópias do gene codificado quanto a enzima nas células ou pela modificação de uma sequência de controle de expressão destes.

[0186] Um gene pode ser modificado para intensificar a expressão por, por exemplo, aumentando o número de cópias do gene nas células por meio das técnicas de recombinação genética. Por exemplo, um DNA recombinante pode ser preparado pela ligação de um fragmento de DNA contendo o gene *gapA* com um vetor, tal como um vetor multi-cópias, que é capaz de funcionar em um microorganismo hospedeiro e introduzindo em uma bactéria para transformá-la.

[0187] O aumento do número de cópias de um gene também pode ser atingido pela introdução de cópias múltiplas do gene em um DNA genômico de uma bactéria. A fim de introduzir as cópias múltiplas de um gene em um DNA genômico de uma bactéria, recombinação homóloga é realizada pelo uso de uma sequência que está presente em cópias múltiplas no DNA genômico como alvos. Como as sequências que está presente em cópias múltiplas no DNA genômico, o DNA repetitivo e as repetições invertidas presentes no final de um elemento transponível podem ser usados. Outro gene pode ser introduzido próximo ao gene *gapA* em um genoma em tandem, ou suas cópias múltiplas podem ser introduzidas em um gene desnecessário em um genoma. Tal transferência de gene pode ser ligada pelo uso de um vetor sensível à temperatura ou um vetor de integração.

[0188] Alternativamente, como divulgado na Patente

Japonesa Aberta ao público N°. 2-109985, também é possível incorporar o gene em um transposon e o transfere, cujos resultados na introdução de cópias múltiplas dos genes no DNA genômico. A transferência do gene ao genoma pode ser confirmada pela realização da hibridização Southern usando uma parte do gene como uma sonda.

[0189] Ainda, além disso, o aumento anteriormente mencionado do número de cópia do gene, expressão do gene pode ser intensificada pela substituição de uma sequência de controle de expressão tal como um promotor do gene em um DNA de genoma ou plasmídeo com um mais forte, pela fabricação das regiões -35 e -10 dos gene mais próximo da sequência de consenso, pela amplificação de um regulador que aumenta a expressão do gene, ou pela anulação ou atenuando um regulador que diminui a expressão do gene de acordo com os métodos descritos na Publicação Internacional WO00/18935. Por exemplo, o promotor lac, promotor trp, promotor trc, promotor tac, promotor araBA, promotor lambda fago PR e promotor PL, promotor tet, promotor T7, promotor Φ 10 e assim por diante são conhecidos como promotores fortes. Um promotor ou região SD do gene *gapA* também pode ser modificado de modo a tornar-se mais forte pela introdução de uma substituição de nucleotídeo ou outros. Os exemplos do método para avaliação de força de um promotor e promotores fortes são descritos no papel de Goldstein et al. (promotores procarióticos em biotechnology, Biotechnol. Annu. Rev., 1995, 1, 105-128) e assim por diante. Além disso, é conhecido que a substituição de diversos nucleotídeos em um espaçador entre o local de ligação de ribossomo (RBS) e códon de iniciação de tradução, especialmente uma sequência imediatamente a montante a parti do códon de iniciação, afeta muito a eficiência de tradução de mRNA e portanto esta sequência pode ser modificada. As regiões de controle de expressão tal como promotor de um gene também pode ser identificado pelo uso de um vetor de busca de promotor ou software de análise do gene tal

como GENETYX. Por tal substituição ou modificação do promotor como descrito acima, expressão de um gene é intensificado. A substituição de uma sequência de controle de expressão também pode ser ligado por, por exemplo, um método usando um plasmídeo sensível à temperatura ou integração conduzida vermelha (WO2005/010175).

[0190] Exemplos dos genes codificados pelas enzimas biossintéticas L-lisina incluem genes codificados quanto a enzimas de caminho de diaminopimelato tal como gene de sintase diidro-dipicolinato (*dapA*), gene de aspartocinase (*lysC*), gene redutase de diidro-dipicolinato (*dapB*), gene descarboxilase diaminopimelato (*lysA*), gene desidrogenase diaminopimelato (*ddh*) (WO96/40934 para todos os genes precedentes), gene carboxilase fosfoenolpiruvato (*ppc*) (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 60-87788), gene aminotransferase aspartato (*aspC*) (Publicação de Patente Japonesa (Kokoku) N°. 6-102028), gene epimerase diaminopimelato (*dapF*) (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 2003-135066) e gene de desidrogenase aspartato semialdeído (*asd*) (WO00/61723) e genes codificados quanto a enzimas de caminho do ácido aminoadípico tal como gene hidratase homoaconitato (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 2000-157276). Além disso, a cepa precursora pode mostrar um nível aumentado de expressão do gene envolvido na eficiência de energia (*cyo*) (EP 1170376 A), o gene codificado por transidrogenase de nicotinamida nucleotídeo (*pntAB*) (Patente U.S. N°. 5.830.716), o gene *ybjE* codificado pela proteína tendo atividade de excreção de L-lisina (WO2005/073390), o gene codificado por glutamato desidrogenase (*gdhA*) (Valle F. et al., 1983, Gene 23:199-209), ou uma combinação arbitrária destes. As abreviações para os genes são mostradas em parênteses.

[0191] É conhecido que a sintase diidro-dipicolinato de tipo selvagem derivado de *Escherichia coli* sofre de inibição de regeneração por L-lisina e é conhecido que o aspartocinase de tipo selvagem derivado de

Escherichia coli sofre de supressão e inibição de regeneração por L-lisina. Portanto, quando o gene *dapA* e o gene *lysC* são usados, estes genes são preferivelmente genes codificados pelas enzimas mutantes dessensibilizadas pela inibição de regeneração por L-lisina.

[0192] Os exemplos de DNA que codificam uma sintetase diidrodipicolinato mutante dessensibilizado pela inibição de regeneração por L-lisina inclui um DNA que codifica uma tal proteína tendo uma sequência de aminoácido em que o resíduo de histidina na posição 118 é substituído pelo resíduo de tirosina. Os exemplos de DNA que codifica um aspartocinase mutante dessensibilizado pela inibição de regeneração por L-lisina inclui um DNA que codifica um AKIII tendo uma sequência de aminoácido em que o resíduo de treonina na posição 352, o resíduo de glicina na posição 323 e o resíduo de metionina na posição 318 são substituídos por resíduos de isoleucina, asparagina e isoleucina, respectivamente (para estes mutantes, ver Patente U.S. N°. 5.661.012 e 6.040.160). Tais DNAs mutantes podem ser obtidos pela mutagênese específica por local usando PCR ou outros.

[0193] Os plasmídeos de faixa hospedeira amplos RSFD80, pCAB1 e pCABD2 são conhecidos como plasmídeos contendo um gene mutante *dapA* que codifica uma sintetase diidrodipicolinato mutante e um gene *lysC* mutante que codifica um aspartocinase mutante (Patente U.S. N°. 6.040,160). A cepa *Escherichia coli* JM109 transformada com o plasmídeo foi nomeada AJ12396 (Patente U.S. N°. 6.040,160) e a cepa foi depositado no National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry (correntemente National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary) em 28 de Outubro de 1993 e denominado um número de acesso de FERM P-13936 e e depósito foi então convertido a um depósito internacional sob as provisões de Budapest Treaty em 1 de Novembro de 1994 e denominado um número de acesso de

FERM BP-4859. RSFD80 pode ser obtido a partir de uma cepa AJ12396 por um método convencional.

[0194] Os exemplos de tais enzimas envolvidas na produção de L-lisina incluem homoserina desidrogenase, lisina descarboxilase (*cadA*, *ldcC*), enzima málica e assim por diante e as cepas em que as atividades destas enzimas são diminuídas ou anuladas são divulgadas em WO95/23864, WO96/17930, WO2005/010175 e assim por diante.

[0195] É preferido que as expressões tanto dos genes *cadA* quanto dos *ldcC* codificam a lisina descarboxilase e são diminuídos a fim de diminuir ou anular a atividade de lisina descarboxilase. A expressão de ambos os genes pode ser diminuída por, por exemplo, os métodos descritos na WO2006/078039.

[0196] A fim de reduzir ou eliminar as atividades destas enzimas, uma mutação pode ser introduzida nos genes que codificam as enzimas no genoma pelo método de mutagênese usual ou técnica de recombinação de gene de modo que as atividades intracelulares das enzimas são reduzidas ou eliminadas. Tal introdução de uma mutação pode ser atingida por, por exemplo, usando recombinação genética para eliminar os genes codificados pelas enzimas no genoma ou para modificar uma sequência de controle de expressão tal como um promotor ou a sequência Shine-Dalgarno (SD). Também pode ser atingido pela introdução de uma mutação para a substituição de aminoácido (mutação *missense*), um códon de interrupção (mutação não sentido), ou uma mutação de mudança de estrutura pela adição ou anulação de um ou mais nucleotídeos nas regiões codificadoras para as enzimas no genoma, ou parcialmente ou totalmente anulação dos genes (Wang, J.P. et al., 2006, J. Agric. Food Chem., 54:9405-9410; Winkler W.C., 2005, Curr. Opin. Chem. Biol., 9:594-602; Qiu Z. and Goodman M.F., 1997, J. Biol. Chem., 272:8611-8617; Wentz, S.R. and Schachman, H.K., 1991, J. Biol. Chem., 266:20833-20839). As atividades enzimáticas também

podem ser diminuídas ou eliminadas pela construção de um gene codificado por uma enzima mutante, em que a região codificadora é totalmente ou parcialmente anulada e substituindo pelo gene no genoma pela recombinação homóloga ou outros, ou pela introdução de um transpososomo ou fator IS no gene.

[0197] Por exemplo, a fim de introduzir uma mutação que diminui ou elimina as atividades das enzimas mencionadas acima pela recombinação genética, os seguintes métodos são usados. Um gene mutante é preparado pela modificação de uma sequência parcial de um gene objetivo de modo que este não codifica uma enzima que pode funcionar normalmente e então a bactéria pertence à família *Enterobacteriaceae* e pode ser transformado com um DNA contendo o gene mutante para causar a recombinação de um gene correspondente no genoma com o gene mutante para substituir o gene mutante para o gene objetivo no genoma. Os exemplos de tal substituição de gene usando a recombinação homóloga incluem os métodos de uso de um DNA linear tal como o método denominado integração *Red-driven* (Datsenko, K.A e Wanner, B.L., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:6640-6645) e o método utilizando a integração *Red driven* em combinação com um sistema taxado de fago λ (Cho, E.H., Gumport, R.I., Gardner, J.F., 2002, J. Bacteriol., 184:5200-5203) (refere-se a WO2005/010175), um método de uso de um plasmídeo contendo uma origem de replicação sensível à temperatura (Patente U.S. N°. 6.303.383, Patente Japonesa Aberta ao público N°. 05-007491) e assim por diante. Ainda, tal mutagênese específica por local com base na substituição do gene usando a recombinação homóloga também pode ser realizado pelo uso de um plasmídeo que não é capaz de replicar em um hospedeiro.

[0198] Exemplos preferidos de bactéria que produz L-lisina inclui *Escherichia coli* WC196 Δ cadA Δ ldc/pCABD2 (WO2006/078039). A cepa foi construída pela introdução do plasmídeo pCABD2 contendo genes de

biosíntese de lisina (Patente U.S. N°. 6.040,160) na cepa WC196 tendo genes *cadA* e *ldcC* interrompidos, que codifica lisina descarboxilase. A cepa WC196 foi *bred* a partir da cepa W3110, que foi derivado de *Escherichia coli* K-12, pela substituição do gene *lysC* de tipo selvagem no cromossomo da cepa W3110 com um gene mutante *lysC* que codifica um aspartocinase mutante III em que treonina na posição 352 foi substituído com isoleucina, resultando na dessensibilização da inibição de regeneração deste por L-lisina (Patente U.S. N°. 5.661.012) e conferindo a resistência AEC à cepa resultante (Patente U.S. N°. 5.827.698). A cepa WC196 foi projetada *Escherichia coli* AJ13069, depositado no National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology (correntemente National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukubashi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japan) em 6 de Dezembro de 1994 e denominado um número de acesso de FERM P-14690. Então, foi convertido a um depósito internacional sob as provisões de Budapest Treaty em 29 de Setembro de 1995 e denominado um número de acesso de FERM BP-5252 (Patente U.S. N°. 5.827.698). A cepa WC196 Δ *cadA* Δ *ldc* por si só também é uma bactéria que produz L-lisina preferida. O WC196 Δ *cadA* Δ *ldc* foi projetado AJ110692 e depositado na 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, 305-8566, Japan) em 7 de Outubro de 2008 como um depósito internacional e denominado um número de acesso de FERM BP-11027.

[0199] O plasmídeo pCABD2 contém um gene mutante *dapA* derivado de *Escherichia coli* e codificado por uma sintase diidrodipicolinato (DDPS) tendo uma mutação para a dessensibilização da inibição de regeneração por L-lisina, um gene mutante *lysC* derivado de

Escherichia coli e codificado por aspartocinase III tendo uma mutação para a dessensibilização da inibição de regeneração por L-lisina, o gene *dapB* derivado de *Escherichia coli* e codificado pela redutase diidrodpicolinato e o gene *ddh* derivado de *Brevibacterium lactofermentum* e codificado por diaminopimelato desidrogenase (Publicação Internacional WO95/16042 e WO01/53459).

[0200] Os procedimentos descritos acima para a intensificação da expressão do gene das enzimas envolvidas na biossíntese L-lisina e os métodos para a redução das atividades enzimáticas pode ser similarmente aplicados aos genes codificados quanto a outras enzimas de biossíntese de L-aminoácido.

[0201] Os exemplos de bactéria corineforme que produz L-lisina inclui as cepas mutantes resistentes a cepa aEC (*Brevibacterium lactofermentum* AJ11082 (NRRL B-11470) etc., refere-se a Publicação de Patente Japonesa N°. 56-1914, 56-1915, 57-14157, 57-14158, 57-30474, 58-10075, 59-4993, 61-35840, 62-24074, 62-36673, 5-11958, 7-112437 e 7-112438); cepas mutantes requerendo um aminoácido tal como L-homoserina por seu desenvolvimento (refere-se a Publicação de Patente Japonesa N°. 48-28078 e 56-6499); cepas mutantes que mostram a resistência a AEC e ainda requer um aminoácido tal como L-leucina, L-homoserina, L-prolina, L-serina, L-arginina, L-alanina e L-valina (refere-se a Patente U.S. N°. 3.708.395 e 3.825.472); cepas mutantes que produz L-lisina mostrando a resistência ao DL- α -amino- ϵ -caprolactam, α -amino-laurillactam, análogo de ácido aspártico, medicamento sulfa, quinoid e N-lauroilleucina; cepas mutantes que produz L-lisina mostrando a resistência ao oxaloacetato descarboxilase ou um inibidor de enzima de trato respiratório (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 50-53588, 50-31093, 52-102498, 53-9394, 53-86089, 55-9783, 55-9759, 56-32995, 56-39778, Publicação de Patente Japonesa N°. 53-43591 e 53-1833); cepas mutantes que produz L-lisina requerindo inositol ou ácido acético

(Patente Japonesa Aberta ao público N°s. 55-9784 e 56-8692); cepas mutantes que produz L-lisina que são susceptíveis ao ácido fluoropirúvico ou uma temperatura de 34°C ou mais (Patente Japonesa Aberta ao público N°s. 55-9783 e 53-86090); cepas mutantes que produzem L-lisina da bactéria *Brevibacterium* ou *Corynebacterium* mostrando a resistência ao etileno glicol (Patente U.S. N°. 4.411.997) e assim por diante.

[0202] Bactéria que produz L-Cisteína

[0203] Os exemplos de bactéria que produz L-cisteína e as cepas precursoras que são usadas para a derivação de tais bactérias incluem, mas não limitado a, bactéria *Escherichia* tal como *E. coli* JM15 transformado com os grupos múltiplos dos alelos do gene *cysE* que codificam serina acetiltransferase resistente à inibição de regeneração (Patente U.S. N°. 6.218.168, Pedido de Patente Russa N°. 2003121601), *E. coli* W3110 em que um gene que codifica uma proteína adequada para a excreção das substâncias citotóxicas é super expressada (Patente U.S. N°. 5.972.663), a cepa *E. coli* tendo atividade de cisteína dessulfidrase diminuída (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 11-155571) e *E. coli* W3110 em que a atividade do fator de controle transcripcional positivo da cisteína regulon codificado pelo gene *cysB* é aumentado (WO 01/27307).

[0204] Bactéria que produz L-Leucina

[0205] Os exemplos de bactéria que produz L-leucina e as cepas precedentes que podem ser usadas para atingir que pode ser usado para derivar a bactéria que produz L-leucina incluem, mas não são limitados a, cepas bacterianas *Escherichia*, tal como cepas *E. coli* resistentes a leucina (por exemplo, a cepa 57 (VKPM B-7386, Patente U.S. N°. 6.124.121)) ou análogos de leucina incluindo β -2-tienilalanina, 3-hidroxileucina, 4-azaleucina, 5,5,5-trifluoroleucina e assim por diante (Publicação de Patente Japonesa N°. 62-34397 e Patente Japonesa Aberta ao público N°. 8-70879), cepas *E. coli* obtidas pelo método de projeção genética descrito no

WO96/06926, *E. coli* H-9068 (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 8-70879) e assim por diante.

[0206] A bactéria usada para a presente invenção pode ser melhorada pela intensificação da expressão de um ou mais genes envolvidos na biossíntese de L-leucina. Os exemplos preferidos de tais genes incluem os genes de *leuABCD* operon, um exemplo típico de que é o gene mutante *leuA* codificado pela sintase de isopropil malato que foi mutado a ser dessensibilizado pela inibição de regeneração por L-leucina (Patente U.S. N°. 6.403.342). Além disso, a bactéria usada pela presente invenção pode ser melhorada pela intensificação da expressão de um ou mais genes codificados pelas proteínas que aumenta a exportação de L-aminoácido a partir da células bacterianas. Os exemplos de tais genes incluem os genes *b2682* e *b2683* (os genes *ygaZH*) (EP 1239041 A2).

[0207] Os exemplos de cepas que produzem L-isoleucina de bactéria corineforme incluem a bactéria corineforme em que o gene *brnE* codificado por uma proteína de excreção de aminoácido de cadeia ramificada é amplificada (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 2001-169788), a bactéria corineforme concedida com a capacidade de produzir L-isoleucina pela fusão de protoplasto com uma bactéria que produz L-lisina (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 62-74293), a bactéria corineforme de que homoserina desidrogenase é intensificada (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 62-91193), a cepa resistente de *hidroxamete* de treonina (Patente Japonesa Aberta ao público N° 62-195293), cepa resistente do ácido α -quetomalônico (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 61-15695) e a cepa resistente a metil lisina (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 61-15696).

[0208] Bactéria que produz L-Histidina

[0209] Os exemplos de bactéria que produz L-Histidina e cepas precursoras que podem ser usadas para derivar a bactéria que produz L-Histidina incluem, mas não limitado a, cepas bacterianas de *Escherichia*, tal

como cepa de *E. coli* 24 (VKPM B-5945, RU2003677), cepa de *E. coli* 80 (VKPM B-7270, RU2119536), *E. coli* NRRL B-12116 - B 12121 (Patente U.S. N°. 4,388,405), *E. coli* H-9342 (FERM BP-6675), *E. coli* H-9343 (FERM BP-6676) (Patente U.S. N°. 6.344.347), *E. coli* H-9341 (FERM BP-6674) (EP 1085087 A), *E. coli* AI80/pFM201 (Patente U.S. N°. 6.258.554) e assim por diante.

[0210] Os exemplos de bactéria que produz L-Histidina e as cepas precursoras que podem ser usadas para derivar a bactéria que produz L-Histidina também incluem cepas em que a expressão de um ou mais genes que codificam enzimas biossintéticas de L-histidina são intensificados. Os exemplos de tais genes incluem os genes que codificam aTP fosforibosiltransferase (*hisG*), fosforibosil AMP cicloidrolase (*hisI*), fosforibosil-ATP pirofosfoidrolase (*hisI*), fosforibosilformimino-5-aminoimidazol carboxamida ribotida isomerase (*hisA*), amidotransferase (*hisH*), histidinol fosfato aminotransferase (*hisC*), histidinol fosfatase (*hisB*), histidinol desidrogenase (*hisD*) e assim por diante.

[0211] É conhecido que as enzimas biossintéticas de L-histidina codificada por *hisG* e *hisBHAFI* são inibidas por L-histidina e portanto a capacidade de produzir L-histidina também pode ser eficientemente intensificado pela introdução de uma mutação que confere resistência à inibição de regeneração ao gene codificado por ATP fosforibosiltransferase (*hisG*) (Patente Russa N°. 2003677 e 2119536).

[0212] Os exemplos específicos das cepas que são capazes de produzir L-histidina incluem *E. coli* FERM-P 5038 e 5048 que foram transformados com um vetor que realiza um DNA que codifica uma Enzima biossintética de L-histidina (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 56-005099), cepa de *E. coli* transformada com um gene que codifica uma proteína envolvida na exportação do aminoácido (EP 1016710 A), a cepa *E. coli* 80 que é resistente a sulfaguanidina, DL-1,2,4-triazol-3-alanina e

estreptomicina (VKPM B-7270, Patente Russa N°. 2119536) e assim por diante.

[0213] Bactéria que produz ácido L-Glutâmico

[0214] Os exemplos de bactéria que produz ácido L-Glutâmico e as cepas precursoras que podem ser usadas para derivar a bactéria que produz ácido L-Glutâmico incluem, mas não limitado a, cepas bacterianas de *Escherichia*, tal como *E. coli* VL334thrC⁺ (EP 1172433). *E. coli* VL334 (VKPM B-1641) é auxotrófico por L-isoleucina e L-treonina e contém genes mutantes *thrC* e *ilvA* (Patente U.S. N°. 4.278.765). Um alelo de tipo selvagem do gene *thrC* foi transferido pela transdução geral usando o bacteriófago PI desenvolvido em células de *E. coli* K12 (VKPM B-7) de tipo selvagem, resultando em cepa que produz ácido glutâmico auxotrófico de L-isoleucina VL334thrC⁺ (VKPM B-8961).

[0215] Os exemplos de bactéria que produz ácido L-Glutâmico e as cepas precursoras que podem ser usadas para derivar a bactéria que produz ácido L-Glutâmico também incluem, mas não limitado a, cepas no qual a expressão de um ou mais genes que codifica uma enzima biossintética de ácido L-glutâmico é intensificado. Os exemplos de tais genes incluem os genes que codificam glutamato desidrogenase (*gdhA*), glutamina sintetase (*glnA*), glutamato sintetase (*gltAB*), isocitrato desidrogenase (*icdA*), aconitato hidratase (*acnA*, *acnB*), citrato sintase (*gltA*), metil citrato sintase (*prpC*), fosfoenolpiruvato carboxilase (*ppc*), piruvato desidrogenase (*aceEF*, *lpdA*), piruvato cinase (*pykA*, *pykF*), fosfoenolpiruvato sintase (*ppsA*), enolase (*eno*), fosfogliceromutase (*pgmA*, *pgmI*), fosfoglicerato cinase (*pgk*), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gapA*), triose fosfato isomerase (*tpiA*), frutose bisfosfato aldolase (*fbp*), fosfofrutocinase (*pfkA*, *pfkB*), glicose fosfato isomerase (*pgi*) e assim por diante. Entre estas enzimas, glutamato desidrogenase, citrato sintase, fosfoenolpiruvato carboxilase e metil citrato sintase são preferidos.

[0216] Os exemplos de cepas que foram modificadas de modo que a expressão do gene citrato sintetase, o gene fosfoenolpiruvato carboxilase e/ou o gene glutamato desidrogenase é intensificado e inclui aquele divulgado em EP 1078989 A, EP 955368 A e EP 952221 A.

[0217] Os exemplos de bactérias que produzem ácido L-Glutâmico e as cepas precursoras que podem ser usadas para derivar a bactéria que produz ácido L-Glutâmico também incluem cepas em que a atividade de uma ou mais enzimas que catalisam uma ou mais reações que direcionam a síntese de um ou mais compostos outros do que ácido L-glutâmico, por exemplo, pela direção da síntese sempre do caminho biossintético de ácido L-glutâmico, é reduzido ou eliminado. Os exemplos destas enzimas incluem isocitrato liase (*aceA*), α -quetoglutarato desidrogenase (*sucA*), fosfotransacetilase (*pta*), acetate cinase (*ack*), ácido acetohidróxi sintase (*ilvG*), acetolactato sintase (*ilvI*), formato acetiltransferase (*pfl*), lactato desidrogenase (*ldh*), glutamato descarboxilase (*gadAB*) e assim por diante. A bactéria *Escherichia* sem a atividade α -quetoglutarato desidrogenase ou com atividade de α -quetoglutarato desidrogenase reduzida e métodos para obter tal bactéria são descritos na Patente U.S. N°. 5.378.616 e 5.573.945.

[0218] Especificamente, estas cepas incluem o seguinte:

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

E. coli AJ12624 (FERM BP-3853)

E. coli AJ12628 (FERM BP-3854)

E. coli AJ12949 (FERM BP-4881)

E. coli W3110*sucA::Km^r* é obtido pelo rompimento do gene α -quetoglutarato desidrogenase (em seguida também referido como o “gene *sucA*”) de *E. coli* W3110. Esta cepa é completamente deficiente em α -quetoglutarato desidrogenase.

[0219] Os exemplos de bactéria corineforme com atividade

α -quetoglutarato desidrogenase diminuída incluem, por exemplo, as seguintes cepas:

Cepa *Brevibacterium lactofermentum* L30-2 (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 2006-340603)

Cepa *Brevibacterium lactofermentum* Δ S (WO95/34672)

Brevibacterium lactofermentum AJ12821 (FERM BP-4172, Patente Francesa N°. 9401748)

Brevibacterium flavum AJ12822 (FERM BP-4173, Patente Francesa N°. 9401748)

Corynebacterium glutamicum AJ12823 (FERM BP-4174, Patente Francesa N°. 9401748)

Cepa *Corynebacterium glutamicum* L30-2 (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 2006-340603)

[0220] Outros exemplos de bactéria que produz ácido L-glutâmico incluem bactéria *Escherichia* que são resistentes a um antimebalótico de ácido aspártico. Estas cepas também podem ser deficientes em α -quetoglutarato desidrogenase e incluem, por exemplo, *E. coli* AJ13199 (FERM BP-5807) (Patente U.S. N°. 5.908.768), FFRM P-12379, que adicionalmente é diminuído em uma atividade para decompor o ácido L-glutâmico (Patente U.S. N°. 5.393.671); AJ13138 (FERM BP-5565) (Patente U.S. N°. 6.110.714) e assim por diante.

[0221] Um exemplo de uma bactéria que produz ácido L-glutâmico que pertence a *Pantoea ananatis* é a cepa *Pantoea ananatis* AJ13355. esta cepa foi isolada a partir do solo em Iwata-shi, Shizuoka-ken, Japão e foi identificado como sendo capaz de proliferar em um meio contendo o ácido L-glutâmico em uma fonte de carbono em um pH baixo. A cepa *Pantoea ananatis* AJ13355 foi depositada no 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-

8566, Japan) em 19 de Fevereiro de 1998 e denominado um número de acesso de FERM P-16644. Este foi então convertido a um depósito internacional sob as provisões de Budapest Treaty em 11 de Janeiro de 1999 e denominado um número de acesso de FERM BP-6614. Esta cepa foi originalmente identificada como *Enterobacter agglomerans* quando este foi isolado e depositado como *Enterobacter agglomerans* AJ13355. Entretanto, foi recentemente classificado novamente como *Pantoea ananatis* na base do sequenciamento de nucleotídeo de 16S rRNA e assim por diante.

[0222] Além disso, exemplos de uma bactéria que produz ácido L-glutâmico de *Pantoea ananatis* também incluem bactéria deficiente *Pantoea* na atividade α -quetoglutarato desidrogenase (α KGDH) ou tendo atividade α KGDH reduzida. Os exemplos de uma tal cepa inclui um J13356 (Patente U.S. N°. 6.331.419), que foi derivado pela anulação do gene de subunidade α KGDH-E1 (*sucA*) em AJ13355 e a cepa SC17*sucA* (Patente U.S. N°. 6.596.517), que é uma cepa deficiente do gene *sucA* derivado da cepa SC17, selecionado de AJ13355 para suas propriedades de produção *phlegm* baixa. A cepa AJ13356 foi depositada no National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology (correntemente, a agência administrativa independente, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary (Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukubashi, Ibaraki-ken, Japan, código postal: 305-8566)) em 19 de fevereiro de 1998 e denominado um número de acesso de FERM P-16645. Então, o depósito foi convertido em um depósito internacional sob as provisões de Budapest Treaty em 11 de Janeiro de 1999 e denominado um número de acesso de FERM BP-6616. Embora as cepas AJ13355 e AJ13356 foram depositadas no depósito anteriormente mencionado como *Enterobacter agglomerans*, estes são referidos como *Pantoea ananatis* na especificação. A cepa SC17*sucA* foi projetada ao número privado de AJ417 e depositado no National Institute of

Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary em 26 de Fevereiro de 2004, sob um número de acesso de FERM BP-08646.

[0223] Os exemplos de bactéria *Pantoea ananatis* que produz ácido L-glutâmico ainda incluem cepas SC17sucA/RSFCPG+pSTVCB, AJ13601, NP106 e NA1. A cepa SC17sucA/RSFCPG+pSTVCB foi obtida pela introdução do plasmídeo RSFCPG contendo o gene citrato sintase (*gltA*), gene fosfoenolpiruvato carboxilase (*ppsA*) e gene glutamato desidrogenase (*gdhA*) derivado de *Escherichia coli* e o plasmídeo pSTVCB contendo o gene citrato sintase (*gltA*) derivado de *Brevibacterium lactofermentum*, na cepa SC17sucA. A cepa AJ13601 foi selecionada da cepa SC17sucA/RSFCPG+pSTVCB para sua resistência a alta concentração de ácido L-glutâmico em um pH baixo. Além disso, a cepa NP106 foi derivada da cepa AJ13601 pela eliminação do plasmídeo RSFCPG+pSTVCB. A cepa AJ13601 foi depositada no National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary (Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japan, código postal: 305-8566) em 18 de Agosto de 1999 e denominado número de acesso FERM P-17516. Então, o depósito foi convertido em um depósito internacional sob as provisões de the Budapest Treaty em 6 de Julho de 2000 e denominado um número de acesso FERM BP-7207.

[0224] Além disso, a capacidade de produzir ácido L-glutâmico também pode ser concedido à bactéria corineforme por um método de amplificação do gene *yggB* codificado pelo canal mecanossensível (WO2006/070944) e um método de introduzir um gene mutante *yggB* em que uma mutação é introduzida na região codificadora. O gene *yggB* é um gene que localiza-se nos números de nucleotídeos 1.337.692 a 1.336.091 (filamento complementar) da sequência genoma da cepa de *Corynebacterium*

glutamicum ATCC 13032 registrada com Acesso Genbank N°. NC_003450 e codificado por uma proteína de membrana também denominada NCgl1221 e registrada com Acesso Genbank N°. NP_600492.

[0225] Os exemplos de outros métodos para conceder ou intensificar a capacidade de produzir ácido L-glutâmico também inclui um método de conceder a resistência a um análogo ácido orgânico, um inibidor de cadeia respiratória, etc. e um método de conceder a sensibilidade de um inibidor de síntese da parede celular. Os exemplos de tais métodos incluem os métodos de conceder a resistência ao ácido monofluoroacético (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 50-113209), o método de conceder a resistência a adenina ou timina (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 57-065198), o método de atenuar a urease (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 52-038088), o método de conceder a resistência ao ácido malônico (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 52-038088), o método de conceder a resistência a benzopironas ou naftoquinonas (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 56-1889), o método de conceder a resistência ao HOQNO (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 56-140895), o método de conceder a resistência a ácido α -quetomalônico (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 57-2689), o método de conceder a resistência por guanidina (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 56-35981), o método concede a sensibilidade à penicilina (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 4-88994) e assim por diante.

[0226] Os exemplos específicos de tais cepas resistentes incluem as seguintes cepas:

Brevibacterium flavum AJ3949 (FERM BP-2632; Patente Japonesa Aberta ao público N°. 50-113209)

Corynebacterium glutamicum AJ11628 (FERM P-5736; Patente Japonesa Aberta ao público N°. 57-065198)

Brevibacterium flavum AJ11355 (FERM P-5007; Patente

Japonesa Aberta ao público N°. 56-1889)

Corynebacterium glutamicum AJ11368 (FERM P-5020;

Patente Japonesa Aberta ao público N°. 56-1889)

Brevibacterium flavum AJ11217 (FERM P-4318; Patente

Japonesa Aberta ao público N°. 57-2689)

Corynebacterium glutamicum AJ11218 (FERM P-4319;

Patente Japonesa Aberta ao público N°. 57-2689)

Brevibacterium flavum AJ11564 (FERM BP-5472; Patente

Japonesa Aberta ao público N°. 56-140895)

Brevibacterium flavum AJ11439 (FERM BP-5136; Patente

Japonesa Aberta ao público N°. 56-35981)

Corynebacterium glutamicum H7684 (FERM BP-3004;

Patente Japonesa Aberta ao público N°. 04-88994)

Brevibacterium lactofermentum AJ11426 (FERM P-5123;

Patente Japonesa Aberta ao público N°. 56-048890)

Corynebacterium glutamicum AJ11440 (FERM P-5137;

Patente Japonesa Aberta ao público N°. 56-048890)

Brevibacterium lactofermentum AJ11796 (FERM P-6402;

Patente Japonesa Aberta ao público N°. 58-158192)

Bactéria que produz L-fenilalanina

[0227] Os exemplos de bactéria que produz L-fenilalanina e as cepas precursoras que podem ser usadas para derivar a bactéria que produz L-fenilalanina incluem, mas não limitado a, cepas bacterianas de *Escherichia*, tal como *E. coli* AJ12739 (tyrA::Tn10, tyrR) (VKPM B-8197) que necessitam de corismato mutase-prefenato desidrogenase e o repressor de tirosina (WO03/044191), *E. coli* HW1089 (ATCC 55371) que contém o gene *pheA34* codificado para corismato mutase-prefenato desidratase que foram mutados a serem dessensibilizados pela inibição de regeneração (Patente U.S. N°. 5.354.672), *E. coli* MWEC101-b (KR8903681), *E. coli* NRRL B-12141,

NRRL B-12145, NRRL B-12146 e NRRL B-12147 (Patente U.S. N°. 4.407.952). Também, as seguintes cepas podem ser usadas para derivar a bactéria que produz L-fenilalanina: *E. coli* K-12 [W3110(*tyrA*)/pPHAB (FERM BP-3566) que contém os genes codificados quanto a corismato mutase-prefenato desidratase que foram mutados a serem dessensibilizados pela inibição de regeneração, *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] (também conhecido como AJ12604 (FERM BP-3579) (EP 488424 B1). Além disso, bactéria *Escherichia* que produz L-fenilalanina com atividade intensificada da proteína codificada pelo gene *yedA* ou o gene *yddG* também pode ser usado (Pedidos Publicados de Patente U.S. N°. 2003/0148473 e 2003/0157667, WO03/044192).

[0228] Como bactéria corineforme que produz fenilalanina, o *Cornebacterium glutamicum* BPS-13 (FERM BP-1777), K77 (FERM BP-2062) e K78 (FERM BP-2063) (Patente Européia Aberta ao público N°. 331145, Patente Japonesa Aberta ao público N°. 02-303495), de que a atividade fosfoenolpiruvato carboxilase ou piruvato cinase é reduzida, cepa de tirosina-auxotrófica (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 05-049489) e assim por diante pode ser usado.

[0229] Uma bactéria que eficientemente produz fenilalanina também pode ser obtida pela modificação de uma bactéria de modo que a bactéria incorpora sub-produtos, por exemplo, pelo aumento da quantidade de expressão do gene de absorção de L-triptofano, *tnaB* ou *mtr*, ou o gene de absorção de L-tirosina, *tyrP* (Patente Européia N°. 1484410).

[0230] Bactéria que produz L-Triptofano

[0231] Os exemplos de bactéria que produz L-Triptofano e as cepas precursoras que podem ser usadas para derivar a bactéria que produz L-Triptofano incluem, mas não limitado a, cepas bacterianas de *Escherichia*,

tal como *E. coli* JP4735/pMU3028 (DSM10122) e *E. coli* JP6015/pMU91 (DSM10123) que necessitam de triptofanil-tRNA sintetase codificada por um gene mutante *trpS* (Patente U.S. N°. 5.756.345), *E. coli* SV164 (pGH5) que contém o alelo *serA* que codifica fosfoglicerato desidrogenase e o alelo *trpE* que codifica antranilato sintase, que são dessensibilizados pela inibição de regeneração por serina e triptofano, respectivamente (Patente U.S. N°. 6.180.373), *E. coli* AGX17 (pGX44) (NRRL B-12263) e *E. coli* AGX6(pGX50)aroP (NRRL B-12264) que necessitam de triptofanase (Patente U.S. N°. 4.371.614) e *E. coli* AGX17/pGX50,pACKG4-pps em que a capacidade de produzir fosfoenolpiruvato é intensificado (WO97/08333, Patente U.S. N°. 6.319.696). A bactéria que produz L-Triptofano pertence ao gênero *Escherichia* com atividade intensificada da proteína codificada pelo gene *yedA* ou o gene *yddG* também pode ser usado (Pedido Publicado de Patente U.S. N°. 2003/0148473 e 2003/0157667).

[0232] Os exemplos de bactéria que produz L-Triptofano e as cepas precursoras que podem ser usadas para derivar a bactéria que produz L-Triptofano também incluem cepas em que uma ou mais atividades das seguintes enzimas são intensificados: antranilato sintase (*trpE*), fosfoglicerato desidrogenase (*serA*), 3-desóxi-D-arabinoeptulose-7-fosfato sintase (*aroG*), 3-desidroquinato sintase (*aroB*), chiquimato desidrogenase (*aroE*), chiquimato cinase (*aroL*), 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (*aroA*), corismato sintase (*aroC*), prefenato desidratase, corismato mutase e triptofan sintase (*trpAB*). Prefenato desidratase e corismato mutase são codificados pelo gene *pheA* como uma enzima bifuncional (corismato mutase/prefenato desidratase, CM/PDH). Entre estas enzimas, fosfoglicerato desidrogenase, 3-desóxi-D-arabinoeptulose-7-fosfato sintase, 3-desidroquinato sintase, chiquimato desidratase, chiquimato cinase, 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase, corismato sintase, prefenato desidratase e corismato mutase-prefenato desidratase são particularmente preferidos. Antranilato sintase e fosfoglicerato

desidrogenase ambos sofrem a partir da inibição de regeneração por L-triptofano e L-serina e portanto uma dessensibilização da mutação pela inibição de regeneração pode ser introduzida nos genes que codificam estas enzimas. Os exemplos específicos de cepas tendo uma tal mutação incluem *E. coli* SV164 tendo uma sintase antranilato de tipo dessensibilizada e uma cepa transformante obtida pela introdução pGH5 (WO94/08031) contendo um gene mutante *serA* codificado por fosfoglicerato desidrogenase dessensibilizado pela inibição de regeneração em *E. coli* SV164.

[0233] Os exemplos de bactéria que produz L-Triptofano e as cepas precursoras que podem ser usadas para derivar a bactéria que produz L-Triptofano também incluem cepas que foram transformadas com o triptofan operon, que contém um gene que codifica antranilato sintase dessensibilizado por inibição (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 57-71397, 62-244382, Patente U.S. N°. 4.371.614). Além disso, capacidade de produzir L-triptofano pode ser concedido pela intensificação da expressão de um gene que codifica o triptofan sintase no triptofan operon (*trpBA*). O triptofan sintase inclui tanto subunidades α quanto β , que são codificadas por *trpA* e *trpB*, respectivamente. Além disso, a capacidade de produzir L-triptofan pode ser melhorada pela intensificação da expressão do isocitrato liase-malato sintase operon (WO2005/103275).

[0234] Como bactéria coryneform, *Corynebacterium glutamicum* AJ12118 (FERM BP-478, Patente Japones N°. 01681002), que é resistente a sulfaguanidina, a bactéria corineforme introduzida com o triptofan operon (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 63-240794) e a bactéria corineforme introduzida com um gene codificado por chiquimato cinase derivado de uma bactéria corineforme (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 01-994749) pode ser usado.

[0235] Bactéria que produz L-Prolina

[0236] Os exemplos de bactéria que produz L-Prolina e as

cepas precursoras que podem ser usadas para derivar a bactéria que produz L-Prolina incluem, mas não limitado a, cepas bacterianas de *Escherichia*, tal como *E. coli* 702ilvA (VKPM B-8012) que necessitam do gene *ilvA* e podem produzir L-prolina (EP 1172433).

[0237] A bactéria usada para a presente invenção pode ser melhorada pela intensificação da expressão de um ou mais genes envolvidos na biossíntese de L-prolina. Exemplos dos genes preferidos para a bactéria que produz L-Prolina incluem o gene *proB* codifica quanto ao glutamato cinase que é dessensibilizado pela inibição de regeneração por L-prolina (Patente DE 3127361). Além disso, a bactéria usada para a presente invenção pode ser melhorada pela intensificação da expressão de um ou mais genes codificados quanto as proteínas responsáveis pela secreção de L-aminoácidos a partir da célula bacteriana. Os exemplos de tais genes são os genes *b2682* e *b2683* (genes *ygaZH*) (EP 1239041 A2).

[0238] A bactéria de *Escherichia* que produz L-prolina incluem o seguinte cepa de *E. coli*: NRRL B-12403 e NRRL B-12404 (Patente GB 2075056), VKPM B-8012 (Pedido de Patente Russa 2000124295), mutantes de plasmídeos descritos na Patente DE 3127361, mutantes de plasmídeos descritos por Bloom F.R. et al. (The 15° Miami Winter Symposium, 1983, p. 34) e assim por diante.

[0239] Bactéria que produz L-Arginina

[0240] Os exemplos de bactéria que produz L-Arginina e as cepas precursoras que podem ser usadas para derivar a bactéria que produz L-Arginina incluem, mas não limitado a, cepas bacterianas de *Escherichia*, tal como cepa de *E. coli* 237 (VKPM B-7925) (Pedido Publicado de Patente U.S. N°. 2002/058315 A1) e suas cepas derivadas que protege N-acetilglutamato sintase mutante (Pedido de Patente Russa N°. 2001112869), cepa de *E. coli* 382 (VKPM B-7926) (EP 1170358 A1) e uma cepa que produz arginina transformada com um gene *argA* que codifica N-acetilglutamato sintetase (EP

1170361 A1).

[0241] Os exemplos de bactéria que produz L-Arginina e as cepas precursoras que podem ser usadas para derivar a bactéria que produz L-Arginina também incluem cepas em que a expressão de um ou mais genes que codifica uma enzima biossintética de L-arginina são intensificados. Os exemplos de tais genes incluem os genes N-acetilglutamil fosfato redutase (*argC*), gene ornitina acetil transferase (*argJ*), gene N-acetilglutamato cinase (*argB*), gene acetilornitina transaminase (*argD*), gene ornitina carbamoil transferase (*argF*), gene sintetase de ácido argininossucínico (*argG*), gene do ácido argininossucínico liase (*argH*) e gene carbamoil fosfato sintetase (*carAB*).

[0242] Bactéria que produz L-Valina

[0243] Os exemplos de bactéria que produz L-Valina e as cepas precursoras que podem ser usadas para derivar a bactéria que produz L-Valina incluem, mas não limitado a, cepas que foram modificadas para super expressar o *ilvGMEDA* operon (Patente U.S. N°. 5.998.178). é desejável remover a região no *ilvGMEDA* operon que é requerido pela atenuação de modo que a expressão do operon não é atenuado pela L-valina produzida. Além disso, o gene *ilvA* no operon é desejavelmente interrompido de modo que uma atividade de treonina deaminase é diminuída.

[0244] Os exemplos de bactéria que produz L-Valina e as cepas precursoras que podem ser usadas para derivar a bactéria que produz L-Valina também incluem mutantes tendo mutações acilamino t-RNA sintetase (Patente U.S. N°. 5.658.766). Um exemplo é *E. coli* VL1970, que tem uma mutação no gene *ileS* que codifica isoleucina tRNA sintetase. *E. coli* VL1970 foi depositada no Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Russia) em 24 de Junho de 1988 sob o número de acesso VKPM B-4411.

[0245] Além disso, as cepas mutantes que requerem ácido

lipóico para o desenvolvimento e/ou necessidade de H⁺-ATPase (WO96/06926) também são efetivos para derivar a bactéria que produz L-Valina.

[0246] Os exemplos de bactéria que produz L-Valina de bactéria corineforme incluem, por exemplo, cepas modificadas de modo que a expressão de um gene que codifica uma enzima biossintética de L-valina é intensificada. Exemplos da enzima de biossíntese de L-valina incluem enzimas codificadas por genes presentes no *ilvBNC* operon, isto é, sintetase do ácido acetohidróxi por *ilvBN* e isomero-redutase codificada por *ilvC* (WO00/50624). Visto que o *ilvBNC* operon é submetido a regulação de expressão por L-valina e/ou L-isoleucina e/ou L-leucina, é desejável eliminar a atenuação para evitar a supressão da expressão por L-valina que é produzido.

[0247] A comunicação da capacidade de produção de L-valina à bactéria corineforme pode ser realizado pela diminuição ou eliminação da atividade de pelo menos um grupo de enzima que é envolvido no caminho metabólico que diminui a produção de L-valina. Por exemplo, diminuição da atividade de treonina desidratase envolvida na síntese L-leucina, ou atividade de uma enzima envolvida na síntese D-pantotenato é considerado (WO00/50624).

[0248] Os exemplos de métodos para comunicar a capacidade de produção de L-valina também incluem comunicar resistência a um análogo de aminoácido ou outros.

[0249] Os exemplos incluem, por exemplo, cepas mutantes que são auxotrófico por L-isoleucina e L-metionina e resistente a D-ribose, ribonucleosídeo purina ou ribonucleosídeo pirimidina e tendo uma capacidade de produzir L-valina (FERM P-1841, FERM P-29, Publicação de Patente Japonesa No. 53-025034), cepas mutantes resistente a policetídeos (FERM P-1763, FERM P-1764, Publicação de Patente Japonesa N°. 06-065314) e cepas

mutantes resistente a L-valina em um meio contendo ácido acético como uma fonte de carbono único e sensível aos análogos de ácido pirúvico (análogos de fluoropirúvico etc.) em um meio contendo glicose como uma fonte de carbono único (FERM BP-3006, BP-3007, Patente Japonesa N°. 3006929).

[0250] Bactéria que produz L-Isoleucina

[0251] Os exemplos de bactéria que produz L-isoleucina e as cepas precursoras que podem ser usadas para derivar a bactéria que produz L-Isoleucina incluem, mas não limitado a, mutantes que são resistente a 6-dimetilaminopurina (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 5-304969), mutantes que são resistentes a análogos de isoleucina tal como tiaisoleucina e isoleucina hidroxamato e mutantes que são adicionalmente resistentes a DL-etionina e/ou arginina hidroxamato (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 5-130882). Além disso, cepas recombinantes transformadas com genes que codificam proteínas envolvidas na biossíntese de L-isoleucina, tal como treonina desaminase e acetohidroxato sintase, também são efetivos para derivar a bactéria que produz L-Isoleucina (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 2-458, FR 0356739 e Patente U.S. N°. 5.998.178).

[0252] Os exemplos de cepas de produzem L-isoleucina de bactéria corineforme incluem a bactéria corineforme de que o gene *brnE* codifica quanto a proteína de excreção do aminoácido de cadeia ramificada é amplificada (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 2001-169788), a bactéria corineforme concedida com a capacidade de produzir L-isoleucina pela fusão de protoplasto com uma bactéria L-lisina que produz (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 62-74293), a bactéria corineforme em que homoserina desidrogenase é intensificada (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 62-91193), a cepa resistente de hidroxamato de treonina (Patente Japonesa Aberta ao público N° 62-195293), cepa resistente a α -cetoácido malônico (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 61-15695) e a cepa resistente metil lisina (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 61-15696).

[0253] Bactéria que produz L-Metionina

[0254] Os exemplos de Bactéria que produz L-Metionina e as cepas precursoras que são usadas para derivar bactéria que produz L-metionina incluem, mas não limitado a, cepa mutante auxotrófica L-treonina e cepa mutante resistente à norleucina (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 2000-139471). Além disso, uma cepa deficiente repressora de metionina e as cepas recombinantes transformadas com genes que codificam proteínas envolvidas na biossíntese de L-metionina tal como homoserina transsuccinilase e cistationina γ -sintase (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 2000-139471) também pode ser usado as cepas precursoras.

[0255] Quando a bactéria que produz L-aminoácido anteriormente mencionado são criados pela recombinação do gene, os genes a serem usados não são limitados aos genes tendo a informação genética descrita acima ou genes tendo sequências conhecidas, mas também incluem genes tendo mutações conservativas, tal como homólogos ou genes artificialmente modificados, também pode ser usado contanto que as funções das proteínas codificadas não são degradados. Isto é, estes podem ser os genes que codificam uma sequência de aminoácido conhecida contendo uma ou mais substituições, anulações, inserções, adições ou outros ode um ou mais resíduos de aminoácidos em uma ou diversas posições.

[0256] Embora o número de resíduos de aminoácidos “um ou diversos” referidos neste podem diferenciar dependendo na posição na estrutura tri-dimensional ou os tipos de resíduos de aminoácidos da proteína, especificamente, este pode ser preferivelmente 1 a 20, mais preferivelmente 1 a 10, ainda mais preferivelmente 1 a 5. A mutação conservativa é uma mutação em que uma substituição acontece mutualmente entre Phe, Trp e Tyr, se o local de substituição é um aminoácidos aromático; entre Leu, Ile e Val, se este é um aminoácido hidrofóbico; entre Gln e Asn, se este é um aminoácido polar; entre Lys, Arg e His, se este é um aminoácido básico; entre Asp e Glu,

se este é um aminoácido ácido; e entre Ser e Thr, se este é um aminoácido tendo um grupo hidroxila. A mutação conservativa é tipicamente uma substituição conservativa e as 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, anulações, inserções, adições, inversões de aminoácido anteriormente mencionados ou outros podem ser um resultado de uma mutação de ocorrência natural ou uma variação devido a uma diferença individual ou diferença das espécies de um microorganismo de que os genes são derivados (mutante ou variante). Tais genes podem ser obtidos por, por exemplo, modificando uma sequência de nucleotídeo de um gene pela mutagênese específica por local de modo que os resíduos de aminoácidos nos locais específicos da proteína codificado incluem substituições, anulações, inserções ou adições dos resíduos de aminoácido.

[0257] Além disso, tais genes tendo mutações conservativas como descrito 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, à sequência codificada inteira de aminoácido e tendo uma função equivalente aquela da proteína de

tipo selvagem.

[0258] Além disso, códons nas sequências dos genes podem ser substituídos com outros códons que são facilmente usados no hospedeiro em que os genes são introduzidos.

[0259] Os genes tendo as mutações conservativas podem ser obtidos pelos métodos usualmente usados nos tratamentos de mutagênese tal como tratamentos com os agentes de mutagênese.

[0260] Além disso, os genes podem ser um DNA que pode hibridizar com uma sequência complementar de uma sequência do gene conhecido de uma sequência de gene conhecida ou uma sonda que pode ser preparada a partir da sequência complementar sob as condições estridentes e codifica tendo uma função equivalente aquela do produto do gene. As “condições estridentes” referidas são as condições sob o qual um híbrido específico denominado é formado em um híbrido não específico não é formado. Exemplos das condições estridentes incluem aqueles sob o qual os DNAs altamente homólogos hibridizam a cada outro, por exemplo, DNAs não menos do que 80 % de homólogos, preferivelmente não menos do que 90 % de homólogos, mais preferivelmente não menos do que 95 % de homólogos, particularmente preferivelmente não menos do que 97 % de homólogos, hibridizam a cada outro e DNAs menos homólogos do que o acima não hibridizam a cada outro, ou condições de lavagem uma vez, preferivelmente 2 ou 3 vezes, em uma concentração salina e temperatura correspondente a lavagem típica de hibridização Southern, isto é, 1 x SSC, 0,1 % de SDS a 60°C, preferivelmente 0,1 x SSC, 0,1 % de SDS a 60°C, mais preferivelmente 0,1 x SSC, 0,1 % de SDS a 68°C.

[0261] Como a sonda, uma parte da sequência que é complementar ao gene também pode ser usada. Uma tal sonda pode ser preparada por PCR usando oligonucleotídeos preparados na base da sequência do gene conhecido como iniciadores e um fragmento de DNA contendo as

sequências 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 pode ser 50°C, 2 x SSC e 0,1 % de SDS.

[0262] As descrições anteriormente mencionadas relativas ao homólogo do gene e mutação conservativa são similarmente aplicados aos genes de lipase anteriormente mencionados.

[0263] <3> Método para a produção de L-aminoácido

[0264] O método para a produção de L-aminoácido da presente invenção é um método para a produção de L-aminoácido, que compreende a preparação de um produto processado de uma microalga, que promove a produção e acúmulo de L-aminoácido por uma bactéria tendo uma capacidade de produzir o L-aminoácido, pela cultura de microalga em um meio e processamento da cultura em uma temperatura média, cultivando a bactéria em um meio contendo o produto processado da microalga produzindo e acumulando o L-aminoácido na cultura e coleta do L-aminoácido a partir da cultura. Visto que o produto processado é uma mistura de reação em que a cultura de microalga é processada em uma temperatura média ou um produto obtido ainda por submeter a mistura de reação à extração ou fracionamento e/ou outro tratamento como descrito acima, é considerado que o produto processado contém substâncias orgânicas produzidas pela reação da microalga em uma temperatura média, ou substâncias orgânicas obtidas pela conversão adicional da substância orgânica precedente por outro tratamento.

[0265] O produto processado (daqui em diante também referido como “produto processado em temperatura média”) é preferivelmente contido como uma fonte de carbono e neste caso, é particularmente preferido que os ácidos graxos, glicose e glicerol sejam contidos como a fonte de carbono.

[0266] A expressão “como uma fonte de carbono”

mencionada acima significa que o produto processado pode substancialmente contribuir como uma fonte de abastecimento de carbono constituindo os componentes celulares e L-aminoácidos na proliferação da bactéria e produção L-aminoácido. Se o desenvolvimento bacteriano ou produção de L-aminoácido e acúmulo são mais favoráveis em cultura em um meio em que o produto processado em temperatura média são adicionados comparados com a cultura em um meio o qual o produto processado em temperatura média não são adicionados, o produto processado em temperatura média são estimados serem uma fonte de carbono. O meio pode conter apenas o produto processado em temperatura média como uma fonte de carbono, ou pode conter outras fonte de carbonos.

[0267] Para o método da presente invenção, cultura de batelada, cultura de batelada-alimentação e cultura contínua pode ser usada. O produto processado em temperatura média no meio pode ser contida no meio de partida ou meio de alimentação ou pode ser contida em ambos.

[0268] A cultura de batelada-alimentação refere-se ao método de cultura em que um meio é continuamente ou intermitentemente alimentado em um recipiente de cultura e o meio não é extraído até o final da cultura. A cultura contínua significa um método em que um meio é continuamente ou intermitentemente alimentado em um recipiente de cultura e o meio é extraído a partir do recipiente (usualmente em um volume equivalente ao volume do meio de alimentação) ao mesmo tempo. O meio de partida significa o meio usado na cultura de batelada na cultura de batelada-alimentação ou cultura contínua antes da alimentação do meio livre (meio usado no tempo de início da cultura) e o meio de alimentação significa um meio que é fornecido em um tanque de fermentação na cultura de batelada-alimentação ou cultura contínua. A cultura de batelada significa um método em que um o meio fresco é preparado para cada cultura e uma cepa é inoculado no meio, no qual o meio não é mudado até a coleta.

[0269] O produto processado em temperatura média pode ser usado em qualquer concentração contanto que este é usado em uma concentração adequada para a produção de L-aminoácido. As concentrações dos componentes do produto processado em temperatura média são como seguem. A concentração de glicose como um produto de sacarificação de amido no meio é preferivelmente cerca de 0,05 a 50 p/v %, mais preferivelmente cerca de 0,1 a 40 p/v %, particularmente preferivelmente cerca de 0,2 a 20 p/v %. Como para a quantidade de glicerol e ácidos graxos como um hidrolisado de gordura ou óleo, o meio preferivelmente contém estes em uma quantidade de cerca de 0,01 a 10 p/v %, mais preferivelmente cerca de 0,02 a 5 p/v %, ainda mais preferivelmente cerca de 0,05 a 2 p/v %. O produto processado em temperatura média podem ser independentemente usados, ou também podem ser usados em combinação com outras fontes de carbonos tal como glicose, frutose, sacarose, melados *blackstrap* e hidrolisado de amido. Neste caso, embora o produto processado em temperatura média e outras fontes de carbonos podem ser misturados em uma razão arbitrária, é desejável que a razão do produto processado em temperatura média na fonte de carbono é 10 % em peso ou mais, mais preferivelmente 50 % em peso ou mais, ainda mais preferivelmente 70 % em peso ou mais. Preferido como outras fontes de carbonos são sacarídeos tal como glicose, frutose, sacarose, lactose, galactose, melados *blackstrap*, hidrolisado de amido e uma solução de açúcar obtida pela hidrólise de biomassa, alcoóis tal como etanol e glicerol e ácidos orgânicos tal como ácido fumárico, ácido cítrico e ácido succínico.

[0270] Na presente invenção, o produto processado em temperatura média pode ser contida em uma certa concentração constante em toda parte do período de cultura, este pode ser adicionado apenas no meio de alimentação ou o meio de partida, ou se outras fontes de carbonos são suficientes, podem ser um período onde o produto processado em temperatura média temporariamente de funcionamento breve. O termo “temporariamente”

significa que, por exemplo, o produto processado em temperatura média pode funcionar brevemente por um período correspondente a 10 %, 20 %, ou 30 % no máximo, no período de fermentação total. Um tal caso como descrito acima onde a concentração do produto processado em temperatura média pode temporariamente tornar-se 0 é incluído no escopo da expressão “o meio contém a produto processado em temperatura média como uma fonte de carbono” de acordo com a presente invenção, enquanto existe um período de cultura em um meio contendo o produto processado em temperatura média.

[0271] Como o meio a ser usado, o meio convencional usado media na produção de L-aminoácidos pela fermentação usando microorganismos pode ser usada, contanto que o meio contém o produto processado em temperatura média. Isto é, meio convencional contendo, além de uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio, íons inorgânicos e opcionalmente outros componentes orgânicos como requerido podem ser usados. Como a fonte de nitrogênio, sais de amônio inorgânicos tal como sulfato de amônio, cloreto de amônio, fosfato de amônio, acetato de amônio e uréia, nitratos, nitrogênio orgânico tal como hidrolisado de soja, gás de amônia, amônia aquosa e assim por diante pode ser usada. Além disso, peptona, extrato de levedura, extrato de alimento, extrato de malte, líquido da maceração do milho, hidrolisado de soja e assim por diante também podem ser utilizados. O meio pode conter um ou mais tipos destas fontes de nitrogênio. Estas fontes de nitrogênio também podem ser usadas tanto para o meio de partida quanto para o meio de alimentação. Além disso, a mesma fonte de nitrogênio pode ser usada tanto para o meio de partida quanto para o meio de alimentação, ou a fonte de nitrogênio do meio de alimentação pode ser diferente daquele do meio de partida.

[0272] O meio da presente invenção preferivelmente contém uma fonte de ácido fosfórico e uma fonte de enxofre em adição à fonte de carbono e a fonte de nitrogênio. Como a fonte de ácido fosfórico,

diidrogenofosfato de potássio, hidrogenofosfato dipotássio, polímeros de fosfato tal como ácido pirofosfórico e assim por diante pode ser utilizado. Embora a fonte de enxofre pode ser qualquer substância contendo os átomos de enxofre, sais de ácido sulfúrico tal como sulfatos, tiosulfatos e sulfetos e aminoácidos contendo enxofre tal como cisteína, cistina e glutatona são desejados e sulfato de amônio é especialmente desejável.

[0273] Além disso, o meio pode conter um fator que promove o desenvolvimento (nutriente tendo um efeito que promove o desenvolvimento) além disso aos componentes anteriormente mencionados. Como o fator que promove o desenvolvimento, metais traço, aminoácidos, vitaminas, ácidos nucleicos bem como peptona, casaminoácido, extrato de levedura, produto de degradação de proteína de soja e assim por diante contendo as substâncias precedentes podem ser usadas. Exemplos dos metais traço metais traço incluem ferro, manganês, magnésio, cálcio e assim por diante. Os exemplos de vitaminas incluem vitamina B₁, vitamina B₂, vitamina B₆, ácido nicotínico, nicotinamida, vitamina B₁₂ e assim por diante. Estes fatores que promovem o desenvolvimento podem ser contidos no meio de partida ou o meio de alimentação.

[0274] Além disso, quando um mutante auxotrófico que requer um aminoácido ou outros para o desenvolvimento destes é usado, é preferível suplementar um nutriente requerido ao meio. Em particular, visto que o caminho biossintético L-lisina é intensificado e capacidade de degradação de L-lisina é frequentemente atenuado na bactéria que produz L-lisina que pode ser usada pela presente invenção como descrito abaixo, um ou mais tipos de substâncias selecionadas de L-treonina, L-homoserina, L-isoleucina e L-metionina são preferivelmente adicionadas. O meio de partida e o meio de alimentação pode ter o mesmo ou composição de meio diferente. Além disso, o meio de partida e o meio de alimentação pode ter o mesmo ou concentração de enxofre diferente. Além disso, quando o meio de alimentação

é alimentado em estágios múltiplos, as composições do meio de alimentação alimentado nos estágios pode ser o mesmo ou diferente.

[0275] Além disso, o meio usado na presente invenção pode ser um meio natural ou meio sintético, de modo que este contém uma fonte de carbono, a fonte de nitrogênio e outros componentes como requerido.

[0276] O produto processado em temperatura média pode conter componentes usados por aminoácidos em adição à fonte de carbono. A fonte de nitrogênio e outros componentes no meio usado na presente invenção pode ser reduzido comparado com o meio usual como requerido.

[0277] A cultura é preferivelmente realizada por 1 a 7 dias sob as condições aeróbicas. A temperatura de cultura é 20 a 45°C, preferivelmente 24 a 45°C, particularmente preferivelmente 33 a 42°C. A cultura é preferivelmente realizada como cultura de aeração, com controle a concentração de oxigênio a ser cerca de 5 a 50 %, desejavelmente cerca de 10 %, da concentração de saturação. Além disso, pH é preferivelmente controlado ser 5 a 9 durante a cultura. Para ajuste de pH, ácido orgânico ou inorgânico ou substâncias alcalinas, tal como carbonato de cálcio, gás de amônia e amônia aquosa, pode ser usada.

[0278] Se a cultura é realizada sob tais condições como descrito acima preferivelmente por cerca de 10 a 120 horas, uma quantidade marcadora de L-aminoácido é acumulado no meio de cultura. Embora a concentração de L-aminoácido acumulado não é limitado contanto que este capacita o isolamento e coleta de L-aminoácido a partir do meio ou células, é preferivelmente 1 g/L ou mais, mais preferivelmente 50 g/L ou mais, ainda mais preferivelmente 100 g/L ou mais.

[0279] Quando um aminoácido básico tal como L-lisina é produzido, a produção pode ser realizada por um método em que a fermentação é realizadas pelo controle de pH do meio durante a cultura a ser 6,5 a 9,0 e pH do meio na extremidade da cultura a ser 7,2 a 9,0 e controle da

pressão no tanque de fermentação a ser positivo durante a cultura, ou pelo fornecimento de gás dióxido de carbono ou um gás misturado contendo gás dióxido de carbono ao meio para fornecer um período de cultura onde o meio contém 2 g/L 20 mM ou mais de íons de bicarbonato e/ou íons de carbonato, de modo que a estes íons de bicarbonato e/ou íons de carbonato servem como íons contadores de cátions principalmente que consiste de um aminoácido básico e o aminoácido objetivo é então coletado (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 2002-65287, Pedido Publicado de Patente U.S. N°. 2002/0025564, EP 1813677 A).

[0280] Ainda, na fermentação de ácido L-glutâmico, a cultura pode ser realizada com a precipitação de L-glutâmico no meio pelo uso de um meio líquido ajustado ter uma condição sob o qual ácido L-glutâmico é precipitado. A condição sob o qual ácido L-glutâmico é precipitado, por exemplo, pH 5,0 a 4,0, preferivelmente pH 4,5 a 4,0, mais preferivelmente pH 4,3 a 4,0, particularmente preferivelmente pH 4,0 (Patente Européia Aberta ao público N°. 1078989)

[0281] A coleta de L-aminoácido a partir do meio de cultura pode ser usualmente ligado por uma combinação de métodos conhecidos tal como uma resina trocadora de íon e método de precipitação. Quando o L-aminoácido acumula nas células, as células podem ser interrompidas com, por exemplo, microondas supersônicas ou outros e o L-aminoácido pode ser coletado pelo método de resina trocadora de íon ou outros a partir do sobrenadante pela remoção das células a partir da suspensão interrompida pela célula pela centrifugação. O L-aminoácido a ser coletado pode ser um L-aminoácido livre, ou pode ser um sal tal como sulfato, cloridreto, carbonato, sal de amônio, sal de sódio e sal de potássio.

[0282] O L-aminoácido coletado de acordo com a presente invenção pode conter as células bacterianas, componentes médios, umidade e metabólitos de sub-produtos da bactéria além disso ao L-aminoácido objetivo.

A pureza do L-aminoácido coletado é 50 % ou mais, preferivelmente 85 % ou mais, particularmente preferivelmente 95 % ou mais (Patente Japonesa N°. 1214636, Patente U.S. N°. 5.431.933, 4.956.471, 4.777.051, 4.946.654, 5.840.358, 6.238.714, Pedido Publicado de Patente U.S. N°. 2005/0025878).

[0283] Exemplos 1

[0284] À seguir, a presente invenção será explicada mais especificamente com referência aos exemplos. Nos exemplos, foram usados a cepa *Chlorella kessleri* 11H (UTEX 263) e a cepa *Nannochloris* sp. UTEX LB 1999 obtidas de University of Texas at Austin, The Culture Collection de algas (UTEX) (1 University Station A6700, Austin, TX 78712-0183, USA).

[0285] <Exemplo 1> Cultura de cepa de microalga *Chlorella kessleri* 11H

[0286] A cepa *Chlorella kessleri* 11H foi cultivada a 30°C e uma intensidade de luz de 7,000 lux (mecanismo de cultura: CL-301, TOMY) por 7 dias com agitação em 100 mL do meio 0,2 x Gamborg's B5 (NIHON PHARMACEUTICAL) contido em um frasco cônico de volume de 500 ml e a cultura resultante foi usada como uma pré-cultura. A pré-cultura em um volume de 30 mL foi adicionado a 1,5 L do meio 0,2 x Gamborg's B5 contido em um fermentador de mini jarro de volume de 5 L (ABLE) e cultura foi realizada em uma temperatura de cultura de 30°C e uma intensidade de luz de 20,000 lux por 14 dias com sopro 500 mL/minuto de um gás misturado de ar e 3 % de CO₂ no meio. Como a fonte de luz, enquanto a luz a partir de uma lâmpada fluorescente foi usada.

(meio 0,2 x Gamborg's B5)

KNO ₃	500 mg/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	50 mg/L
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	30 mg/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	30 mg/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	26,8 mg/L

Na ₂ -EDTA	7,46 mg/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5,56 mg/L
MnSO ₄ ·H ₂ O	2 mg/L
H ₃ BO ₃	0,6 mg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,4 mg/L
KI	0,15 mg/L
Na ₂ MoO ₂ ·2H ₂ O	0,05 mg/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,005 mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,005 mg/L

[0287] O meio foi esterilizado por submeter à autoclave a 120°C por 15 minutos.

[0288] <Exemplo 2> Decomposição de óleos e gorduras e amido derivado de alga pelo processamento em temperatura média

[0289] Os corpos de alga contido em 9 L de um meio de cultura obtido pela cultura de acordo com o método do Exemplo 1 foram precipitados centrifugação e armazenado a -80°C por 24 horas. Ao precipitado, 1 L de um sobrenadante de cultura foi adicionado novamente e 2 ml da suspensão foi colocado em um tubo testado e incubado a 50°C e 150 rpm por 18 horas. O procedimento acima também foi realizado pelo grupo em que 10 unidades de amiloglucosidase (Sigma Aldrich, A-9228) foi adicionado à suspensão. Cada amostra foi centrifugada para a precipitação para separar o precipitado e sobrenadante e então as substâncias orgânicas contidas nestes foram medidos. Os resultados das medições são mostrados na tabela 1. Na amostra processada em uma temperatura média, as quantidades de óleos e gorduras e amido diminuído, considerando as quantidades de ácidos graxos e glicerol ou glicose, que são produtos de decomposição de óleos e gorduras ou amido, aumentado quando comparado com a amostra não processada. Ainda, os ácidos graxos localizados no precipitado, considerando glicose e glicerol foram liberados no sobrenadante. Além disso, com o tratamento de

amiloglucosidase durante o processamento em uma temperatura média, a quantidade de produção de glicose foi aumentada.

Tabela 1

Substância orgânica	Não processado (g/L)	Processado na temperatura média (g/L)
Óleo e gordura (precipitado)	6,6	2,4
Amido (precipitado)	2,5	0,5
Glicerol (sobrenadante)	0,6	1,3
Ácido graxo (precipitado)	1,6	7,2
Glicose (sobrenadante)	0	1,3
Glicose (sobrenadante) + tratamento de amiloglucosidase		2,6

[0290] <Exemplo 3> Produção do ácido graxo a partir dos corpos de alga

[0291] Os corpos de alga contido em 9 L de um meio de cultura obtido pela cultura de acordo com o método do Exemplo 1 foram precipitados centrifugação e armazenado a -80°C por 24 horas. Ao precipitado, 500 mL de um sobrenadante de cultura foi adicionado novamente e 250 ml da suspensão foi colocado em um fermentador de jarra de volume de 500 ml (ABLE) e incubado a 50°C e 100 rpm por 18 horas. A amostra obtida foi centrifugada pela precipitação e o precipitado foi recolocado em suspensão em 40 mL de água ultrapura. A 12,5 ml da suspensão, 12,5 ml de água ultrapura e 25 ml de 0,2 N de NaOH foram adicionados e então a mistura foi agitado em 95°C por 3 horas. O extrato de ácido graxo obtido foi filtrado pelo uso do filtro de papel. A concentração de ácido graxo do extrato foi medido e cada um foi usado como uma fonte de carbono pela fermentação de aminoácido.

[0292] <Exemplo 4> Cultura de produção de L-Lisina usando ácidos graxos derivados de alga como fonte de carbono

[0293] <4-1> Construção de cepa *Escherichia coli* que produz L-lisina deficiente por *fadR*

[0294] O fator de transcrição FadR que controla o metabolismo de ácido graxo de *Escherichia coli* é codificado pelo *fadR* (SEQ ID N°: 15, DiRusso, C.C. et al., 1992, J. Biol. Chem., 267:8685-8691). Como

uma cepa precursora usada pelo rompimento do gene neste exemplo, a cepa WC196 Δ cadA Δ ldc descrita na Publicação Internacional WO2006/078039 foi usado como uma Cepa que produz L-lisina de *Escherichia coli*.

[0295] Anulação do gene *fadR* codifica quanto ao fator de transcrição que controla o metabolismo de ácido graxo foi realizado pelo método denominado “integração *Red-driven*”, primeiro desenvolvido por Datsenko and Wanner (Datsenko, K.A. and Wanner, B.L., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:6640-6645) e um sistema de excisão derivado de fago λ (Cho E.H., Gumpert R.I. e Gardner J.F., 2002, J. Bacteriol., 184:5200-5203). De acordo com um método “integração *Red-driven*”, usando um produto PCR obtido pelo uso de oligonucleotídeos sintéticos em que uma parte de um gene alvo é projetado no local 5' e uma parte de gene de resistência antibiótico é projetado no local 3', respectivamente, como iniciadores, uma cepa de rompimento do gene pode ser construído em uma etapa. Ainda pelo uso do sistema de excisão derivado de fago λ em combinação, o gene de resistência ao antibiótico incorporado na cepa de rompimento do gene pode ser removido (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 2005-058227, WO2005/010175).

[0296] Como o modelo por PCR, o plasmídeo pMW118-attL-kan-attR (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 2005-058227, WO2005/010175) foi usado. pMW118-attL-kan-attR é um plasmídeo obtido pela inserção dos locais de ligação do fago λ , os genes attL e attR e os genes kan como um gene de resistência ao antibiótico em pMW118 (Takara Bio) e estes são inseridos a fim de attL-kan-attR.

[0297] O PCR foi realizado pelo uso de oligonucleotídeos sintéticos mostrados na SEQ ID N°S: 16 e 17 como iniciadores, que tem sequências correspondentes aos ambos finais de attL e attR nos finais 3' dos iniciadores e uma sequência correspondente a uma parte do gene *fadR* como o gene objetivo nos finais 5' dos iniciadores.

[0298] O produto PCR amplificado em agarose gel e

introduzida na cepa *Escherichia coli* WC196 Δ cadA Δ ldcC contendo o plasmídeo pKD46 tendo capacidade de replicação sensível a temperatura pela eletroporação. O plasmídeo pKD46 (Datsenko, K.A. and Wanner, B.L., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 97:6640-6645) contém o fragmento DNA de 2154 nucleotídeos no total de fago λ (GenBank/EMBL número de acesso J02459, 31088° aos 33241° nucleotídeos) contendo os genes codificados quanto a recombinase Red de sistema de recombinação homóloga Red λ (genes γ , β e exo) controlado pelo promotor ParaB indutível arabinose. O plasmídeo pKD46 é requerido a fim de incorporar o produto PCR no cromossomo da cepa WC196 Δ cadA Δ ldcC.

[0299] As células competentes para a eletroporação foram preparadas como seguem. Isto é, a cepa *Escherichia coli* WC196 cultivada durante a noite a 30°C no meio LB (10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de NaCl) contendo 100 mg/L de ampicilina foi diluído 100 vezes com 5 mL do meio LB contendo ampicilina (100 mg/L) e L-arabinose (1 mM). A cepa foi proliferada na cultura a 30°C com aeração até o OD600 atingiu cerca de 0,6, então a cultura foi concentrada 100 vezes e as células foram lavadas três vezes com 10 % de glicerol e portanto feito pronto pelo uso na eletroporação. A eletroporação foi realizada pelo uso 70 μ L das células compententes e cerca de 100 ng do produto PCR. As células após a eletroporação foram adicionados 1 mL do meio SOC (Sambrook, J. e Russell, D.W., 2001, Molecular Cloning A Laboratory Manual/Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) e as células foram cultivadas a 37°C por 1 hora e então cultivada a 37°C no meio de ágar LB contendo Km (canamicina, 40 mg/L) como cultura de placa para selecionar um recombinante resistente à Km. Então, para remover o plasmídeo pKD46, o recombinante foi subcultivado duas vezes em 42°C no meio de ágar LB contendo Km e a resistência de ampicilina das colônias obtidas foi examinado para obter uma cepa sensível por ampicilina de que o pKD46 foi eliminado.

[0300] A anulação do gene *fadR* no mutante identificado com o gene resistente à canamicina foi confirmado por PCR. A cepa deficiente *fadR* obtido foi projetado pela cepa WC196 Δ cadA Δ ldcC Δ fadR::att-kan.

[0301] Então, para remover o gene att-kan que foi introduzido no gene *fadR*, um plasmídeo auxiliar, pMW-intxis-ts (Patente Japonesa Aberta ao público N°. 2005-058227, WO2005/010175) foi usado. pMW-intxis-ts é um plasmídeo que realiza um gene codifica quanto a integrase de fago λ (Int) e um gene codifica quanto ao excisionase (Xis) e tendo capacidade de replicação sensível a temperatura.

[0302] As células competentes da cepa WC196 Δ cadA Δ ldcC Δ fadR::att-kan obtida como descrito acima foram preparadas em uma maneira convencional, transformada com o plasmídeo auxiliar pMW-intxis-ts e cultivado a 30°C em uma placa do meio de ágar LB contendo 100 mg/L de ampicilina para selecionar uma cepa resistente à ampicilina.

[0303] Então, para remover o plasmídeo pMW-intxis-ts, o transformante resistente à ampicilina foi subcultivado duas vezes a 42°C no meio de ágar LB, resistência à ampicilina e resistência à canamicina das colônias obtidas foram examinadas para obter uma cepa sensível a canamicina e ampicilina que foi uma cepa de rompimento *fadR* de que o att-kan e pMW-intxis-ts foram eliminados. Esta cepa foi projetada a cepa WC196 Δ cadA Δ ldcC Δ fadR.

[0304] A cepa WC196 Δ cadA Δ ldcC Δ fadR foi transformada com o plasmídeo pCABD2 (WO95/16042) para a produção de lisina realizando os genes *dapA*, *dapB*, *lysC* e *ddh* em uma maneira convencional para obter a cepa WC196 Δ cadA Δ ldcC Δ fadR/pCABD2.

[0305] A cepa preparada acima foi cultivada a 37°C no meio LB contendo 25 mg/L de estreptomicina até OD₆₀₀ tornar-se cerca de

0,6, então uma solução de glicerol a 40 % no mesmo volume como aquele de um meio de cultura foi adicionado ao meio e a mistura foi agitada, então dividida nos volumes apropriados e armazenado a -80°C como estoques de glicerol.

[0306] <4-2> Cultura de produção L-Lisina pela cepa *Escherichia coli* que produz L-lisina usando ácidos graxos derivados de alga como fonte de carbono

[0307] Como uma bactéria que produz L-lisina, a cepa *Escherichia coli* WC196 Δ cadA Δ ldc Δ fadR/pCABD2 construída em <4-1> mencionada acima (esta cepa é referido como “WC196LCR/pCABD2”) foi usado. O estoque de glicerol da cepa WC196LCR/pCABD2 foi descongelado, 100 μ L do estoque congelado foi uniformemente aplicado a uma L-placa contendo 25 mg/L de estreptomicina e cultura foi realizada a 37°C por 20 horas. Cerca de 1/8 das células obtidas a partir de uma placa foram inoculados em 20 mL do meio de fermentação descrito abaixo e contendo 25 mg/L de estreptomicina, que foi contido em um frasco Sakaguchi e cultivado a 37°C por 48 horas em um mecanismo de cultura reciprocamente de agitação. Como a amostra derivado da alga que serve como a fonte de carbono, Tween 80 foi adicionado em uma concentração de 1 % ao extrato de ácido graxo derivado de alga e a mistura foi agitada, então ajustada ao pH 7,0 com 1 N de HCl, submetido à autoclave a 120°C por 20 minutos e usados como uma solução de fonte de carbono. A composição do meio usada para a cultura é mostrado abaixo.

[0308] [Meio de produção de L-Lisina pela bactéria *Escherichia*]

[0309] Ácido oleico reagente ou ácidos graxos	
derivado de alga	9,9 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	24 g/L
KH ₂ PO ₄	1,0 g/L

MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,0 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 g/L
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,01 g/L
Extrato de levedura	2,0 g/L
PIPES (pH 7,0)	20 g/L

[0310] O meio foi ajustado a pH 7,0 com KOH e submetido à autoclave em 110°C por 10 minutos, contanto que a fonte de carbono, MgSO₄·7H₂O e o tampão PIPES (pH 7.0) foram separadamente esterilizados e então misturado.

[0311] Após 24 horas, a quantidade de L-lisina na cultura sobrenadante foi medido com analisador Biotech AS310 (Sakura Seiki). O grau de desenvolvimento neste meio foi determinado pela medição da contagem da célula viva. As médias dos resultados de uma cultura realizada em duplicato são mostrados na tabela 2. A produção de L-lisina favorável foi confirmado com os ácidos graxos derivados de alga e os ácidos graxos derivados de algas fornecidos superior de acúmulo de L-lisina quando comparados com o ácido oleico do reagente.

[Tabela 2]

Fonte de carbono	Tempo de cultura (h)	Contagem de célula viva (x 10 ⁸)	Concentração de L-Lisina (g/L)
Ácido oleico de reagente (9,9 g/L) + 0,6 % de Tween 80	24	15,2	2,8
Ácidos graxos derivado de alga) (9,9 g/L) + 0,6 % de Tween 80	24	14,4	3,1

<Exemplo 5> Cultura de cepa de microalga *Chlorella kessleri*

11H

[0312] A cepa *Chlorella kessleri* 11H foi cultivada a 30°C e uma intensidade de luz de 7.000 lux (mecanismo de cultura: CL-301, TOMY) por 7 dias com agitação em 100 mL do meio 0,2 x Gamborg's B5 (NIHON PHARMACEUTICAL) contido em um frasco cônico de volume de 500 ml e a cultura resultante foi usada como uma pré-cultura. Como a fonte de luz, enquanto a luz a partir de uma lâmpada fluorescente foi usada. A pré-cultura

em um volume de 6 mL foi adicionado a 300 mL do meio 0,2 x Gamborg's B5 contido em um frasco médio de volume de 500 mL e cultura foi realizada em uma temperatura de cultura de 30°C e uma intensidade de luz de 7.000 lux por 12 dias com sopro 250 mL/minuto de um gás misturado de ar e 3 % de CO₂ no meio.

[0313] (meio 0,2 x Gamborg's B5)

KNO ₃	500 mg/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	50 mg/L
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	30 mg/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	30 mg/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	26,8 mg/L
Na ₂ -EDTA	7,46 mg/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5,56 mg/L
MnSO ₄ ·H ₂ O	2 mg/L
H ₃ BO ₃	0,6 mg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,4 mg/L
KI	0,15 mg/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,05 mg/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,005 mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,005 mg/L

[0314] O meio foi esterilizado por submeter à autoclave a 120°C por 15 minutos.

[0315] <Exemplo 6> Condição de temperatura para o processamento de temperatura média de alga

[0316] Um meio de cultura obtido no Exemplo 5 em um volume de 125 ml foi colocado em um fermentador de jarro de volume de 500-mL (ABLE) e incubado em várias temperaturas e 150 rpm por 18 horas. Cada amostra obtida foi centrifugada e a quantidade de ácido graxo no precipitado obtido foi medido. Os resultados da medição foi mostrado na Fig.

1. A quantidade de ácido graxo aumentado com o processamento a 40°C e marcadamente aumentado com o processamento a 45°C, comparado com a amostra não processada.

[0317] <Exemplo 7> Cultura de microalga *Nannochloris* sp.

[0318] A cepa *Nannochloris* sp. UTEX LB 1999 foi cultivada a 30°C e uma intensidade de luz de 7.000 lux (mecanismo de cultura: CL-301, TOMY) por 8 dias com agitação em 10 mL do meio Daigo IMK (NIHON PHARMACEUTICAL) contido em um frasco cônico de volume de 50 mL. Como a fonte de luz, enquanto a luz a partir de uma lâmpada fluorescente foi usada. Como o componente de água de mar do meio Daigo IMK, Daigo Artificial Sea Water SP (NIHON PHARMACEUTICAL), que é água de mar artificial, foi usado.

[0319] (meio Daigo IMK)

NaNO ₃	200 mg/L
Na ₂ HPO ₄	1,4 mg/L
K ₂ HPO ₄	5 mg/L
NH ₄ Cl	2,68 mg/L
Fe-EDTA	5,2 mg/L
Mn-EDTA	0,332 mg/L
Na ₂ -EDTA	37,2 mg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,023 mg/L
CoSO ₄ ·7H ₂ O	0,014 mg/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,0073 mg/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,0025 mg/L
H ₂ SeO ₃	0,0017 mg/L
Tiamina-HCl	0,2 mg/L
Biotina	0,0015 mg/L
Vitamina B12	0,0015 mg/L

MnCl₂·4H₂O 0,18 mg/L

Daigo Artificial Sea Water SP 36 g/L

[0320] O meio foi ajustado a pH 8,0 com 1 N de NaOH e então esterilizado pela autoclave a 120°C por 10 minutos.

[0321] <Exemplo 8> Processamento de temperatura média de *Nannochloris* sp.

[0322] O meio de cultura em um volume de 0,5 ml foi colocado em um tubo Eppendorf de 1,5 de volume e incubado a 50°C e 1000 rpm por 20 horas. Cada amostra foi centrifugada e a quantidade dos ácidos graxos no precipitado obtido foi medido. Os resultados da medição são mostradas na Fig. 2. Visto que a quantidade dos ácidos graxos marcadamente aumentada com o processamento a 50°C comparado com nenhum processamento, foi confirmado que os ácidos graxos também foram gerados em *Nannochloris* sp. pelo processamento de temperatura média.

[0323] <Exemplo 9> Cultura de cepa de microalga *Chlorella kessleri* 11H

[0324] A cepa *Chlorella kessleri* 11H foi cultivada a 30°C e uma intensidade de luz de 7.000 lux (mecanismo de cultura: CL-301, TOMY) por 7 dias em 300 mL do meio 0,2 x Gamborg's B5 (NIHON PHARMACEUTICAL) contido em um frasco médio do volume de 500 mL com sopro 250 mL/minuto de um gás misturado de ar e 3 % de CO₂ no meio e a cultura resultante foi usada como uma pré-cultura. Como a fonte de luz, enquanto a luz a partir de uma lâmpada fluorescente foi usada. A pré-cultura em um volume de 6 mL foi adicionado a 300 mL do meio 0,2 x Gamborg's B5 contido em um frasco de meio de volume 500 mL e cultura foi realizada em uma temperatura de cultura de 30°C e uma intensidade de luz de 7.000 lux por 12 dias com sopro 250 mL/minuto de um gás misturado de ar e 3 % CO₂ no meio.

[0325] (meio 0,2 x Gamborg's B5)

KNO ₃	500 mg/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	50 mg/L
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	30 mg/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	30 mg/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	26,8 mg/L
Na ₂ -EDTA	7,46 mg/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5,56 mg/L
MnSO ₄ ·H ₂ O	2 mg/L
H ₃ BO ₃	0,6 mg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,4 mg/L
KI	0,15 mg/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,05 mg/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,005 mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,005 mg/L

[0326] O meio foi esterilizado por submeter à autoclave a 120°C por 15 minutos.

[0327] <Exemplo 10> Curso de tempo da taxa de geração de ácido graxo no processamento de temperatura média de algas em várias temperaturas

[0328] Um meio de cultura obtido no Exemplo 9 foi ajustado a pH 4,5 com 1 N de HCl e 1 ml do meio foi colocado em um tubo Eppendorf de 1,5 de volume e incubado em várias temperaturas e 1000 rpm por vários tempos. Cada amostra obtida foi centrifugada e a quantidade de ácido graxo no precipitado obtido foi medido. Os resultados de medição são mostrados na Fig. 3. A taxa de produção relativa de ácido graxo foi calculada como a taxa de quantidade dos ácidos graxos produzidos com os óleos e gorduras extraída a partir dos corpos de algas não tratadas com um solvente orgânico foram completamente decompostos, que foi tomado como 100. A quantidade de ácido graxo aumentada após 1 hora em uma temperatura de

55°C ou mais e marcadamente aumentado após 4 a 6 horas em uma temperatura de 50 a 52°C.

[0329] <Exemplo 11> Condição pH do tratamento alcalino para a extração do ácido graxo

[0330] Um meio de cultura obtido no Exemplo 9 foi centrifugado e a cultura sobrenadante foi adicionado ao precipitado para preparar um concentrado 20 vezes do meio. O concentrado foi ajustado ao pH 4,5 com 1 N de HCl e 1 ml do concentrado foi colocado em um tubo de Eppendorf 1,5 de volume e incubado a 52°C e 1000 rpm por 14 horas. A amostra obtida foi ajustada em vários valores de pH com 3 N de NaOH e extraído a 90°C e 1000 rpm por 3 horas e a quantidade de ácido graxo em cada amostra foi medido. Os resultados de medição são mostrados na Fig. 4. A taxa de coleta de ácido graxo relativo foi calculada como a taxa de quantidade dos ácidos graxos produzidos com os óleos e gorduras extraída a partir dos corpos de algas não tratadas com um solvente orgânico foram completamente decompostos, que foi tomado como 100. Os ácidos graxos foram levemente extraídos ao pH 10,5 e a quantidade de ácido graxo extraída aumentado no pH 11,5 e marcadamente aumentado no pH 12,5.

[0331] <Exemplo 12> Condição de temperatura de tratamento alcalino pela extração de ácido graxo

[0332] Um meio de cultura obtido no Exemplo 9 foi centrifugado e a cultura sobrenadante foi adicionado ao precipitado para preparar um concentrado 20 vezes do meio. O concentrado foi ajustado a pH 4,5 com 1 N de HCl e 1 ml do concentrado foi colocado em um tubo de Eppendorf 1,5 de volume e incubado a 52°C e 1000 rpm por 14 horas. A amostra obtida foi ajustada ao pH 12,5 com 3 N de NaOH e extraído em várias temperaturas e 1000 rpm por 3 horas e quantidade de ácido graxo em cada amostra foi medido. Os resultados de medição são mostrados na Fig. 5. A taxa de coleta de ácido graxo relativo foi calculada como a taxa de

quantidade dos ácidos graxos produzidos com os óleos e gorduras de forma extraída a partir dos corpos de algas não tratadas com um solvente orgânico foram completamente decompostos, que foi tomado como 100. A extração dos ácidos graxos foi confirmado a 60°C e a quantidade de ácido graxo aumentado com o aumento da temperatura e atingiu o máximo em 90°C.

[0333] <Exemplo 13> Tempo de tratamento alcalino pela extração de ácido graxo

[0334] Um meio de cultura obtido no Exemplo 9 foi centrifugado e a cultura sobrenadante foi adicionado ao precipitado para preparar um concentrado 20 vezes do meio. O concentrado foi ajustado ao pH 4,5 com 1 N de HCl e 1 ml do concentrado foi colocado em um tubo de Eppendorf 1,5 de volume e incubado a 52°C e 1000 rpm por 14 horas. A amostra obtida foi ajustado ao pH 12,5 com 3 N de NaOH e extraído a 90°C e 1000 rpm por vários tempos e a quantidade de ácido graxo em cada amostra foi medido. Os resultados de medição são mostrados na Fig. 6. A taxa de coleta de ácido graxo relativo foi calculada como a taxa de quantidade dos ácidos graxos produzidos com os óleos e gorduras extraída a partir dos corpos de algas não tratadas com um solvente orgânico foram completamente decompostos, que foi tomado como 100. A quantidade de ácido graxo aumentada com o tratamento por 30 minutos e marcadamente aumentado como o tempo de processamento tornou-se mais longo, isto é, o tempo de processamento foi estendido em 60 minutos e 90 minutos. Após 120 minutos, a quantidade de ácido graxo ainda não aumentam.

[0335] <Exemplo 14> Cultura de cepa de microalga *Chlorella kessleri* 11H

[0336] A cepa *Chlorella kessleri* 11H foi cultivada a 30°C e uma intensidade de luz de 7,000 lux (mecanismo de cultura: CL-301, TOMY) por 7 dias em 400 mL do meio 0,2 x Gamborg's B5 (NIHON PHARMACEUTICAL) contido em um frasco de meio de volume de 500 ml

com sopro de 250 mL/minuto de um gás misturado de ar e 3 % CO₂ no meio e a cultura resultante foi usada como uma pré-cultura. Como a fonte de luz, enquanto a luz a partir de uma lâmpada fluorescente foi usada. A pré-cultura em um volume de 8 mL foi adicionado a 400 mL do meio 0,2 x Gamborg's B5 contido em um frasco de meio de volume de 500 ml e cultura foi realizada em uma temperatura de cultura de 30°C e uma intensidade de luz de 7,000 lux por 12 dias com sopro de 250 mL/minuto de um gás misturado de ar e 3 % de CO₂ no meio.

(meio 0,2 x Gamborg's B5)

KNO ₃	500 mg/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	50 mg/L
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	30 mg/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	30 mg/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	26,8 mg/L
Na ₂ -EDTA	7,46 mg/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	5,56 mg/L
MnSO ₄ ·H ₂ O	2 mg/L
H ₃ BO ₃	0,6 mg/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,4 mg/L
KI	0,15 mg/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,05 mg/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,005 mg/L
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,005 mg/L

[0337] O meio foi esterilizado por submeter à autoclave a 120°C por 15 minutos.

[0338] <Exemplo 15> Exame da condição de temperatura para o processamento da primeira etapa no processamento de duas etapas de temperatura média de algas

[0339] Um meio de cultura obtido no Exemplo 14 foi

centrifugado e água esterilizada foi adicionado ao precipitado para preparar um concentrado de 40 vezes do meio. O concentrado foi ajustado a pH 4,5 com 3 N de HCl e 500 ml do concentrado foi colocado em um tubo de Eppendorf 1,5 de volume e pré-incubado com repouso em 50, 52, 55, 57 ou 60°C por 5 minutos. Então, cada amostra foi incubada à mesma temperatura como temperatura acima e 1000 rpm por 30 minutos e então incubado a 42°C e 1000 rpm por 4 horas e 30 minutos ou 9 horas e 30 minutos para hidrolisar os óleos e graxos. Cada amostra obtida foi centrifugada e a quantidade de ácido graxo no precipitado foi medido. Os resultados de medição são mostrados na Fig. 7. Foi confirmado que a produção do ácido graxo foi apenas confirmado nas amostras obtidas com indução a 50 ou 52°C por 30 minutos e a incubação subsequente a 42°C por 4 horas e 30 minutos quando comparados com a amostra obtida com o processamento contínuo a 52°C, considerando uma quantidade de produção dos ácidos graxos na amostra obtida com a incubação a 42°C por 9 horas e 30 minutos após a indução excede que a amostra observada obtida com o processamento contínuo 52°C. Ainda, quando a amostra foi submetida a indução em uma temperatura de 55°C ou mais por 30 minutos e então processado em 42°C, produção do ácido graxos foi primeiro confirmado após 4 horas e 30 minutos e a quantidade de produção de ácido graxo aumentado com a diminuição da temperatura de indução.

[0340] <Exemplo 16> Exame do tempo para o processamento de primeira etapa e tempo para o processamento de segunda etapa na processamento de duas etapas de temperatura média de algas

[0341] O meio de cultura obtido no Exemplo 14 foi centrifugado e água esterilizada foi adicionado ao precipitado para preparar um concentrado 40 vezes do meio. O concentrado foi ajustado ao pH 4,5 com 3 N de HCl e 600 ml do concentrado foi colocado em um tubo de Eppendorf 1,5 de volume e pré-incubado com repouso a 55°C por 5 minutos. Então, cada

amostra foi incubado a 55°C e 1000 rpm por 30 minutos e então incubado a 42°C e 1000 rpm por vários tempos para hidrolisar os óleos e graxos. Cada amostra obtida foi centrifugada e a quantidade de ácido graxo no precipitado foi medido. Os resultados de medição são mostrados na Fig. 8. Com a indução a 55°C por 10 minutos ou 20 minutos, a quantidade de produção dos ácidos graxos após 4 horas e 6 horas, respectivamente. De outra maneira, com a incubação a 55°C por 30 minutos, a quantidade da produção de ácidos graxos aumentados após 2 horas e atingiu o máximo após 8 horas.

[0342] <Exemplo 17> Cultura de cepa de microalga *Chlorella kessleri* 11H

[0343] A cepa *Chlorella kessleri* 11H foi cultivada a 30°C e uma intensidade de luz de 7,000 lux (mecanismo de cultura: CL-301, TOMY) por 7 dias em 800 mL do meio 0,2 x Gamborg's B5 (NIHON PHARMACEUTICAL) contido em um frasco de meio de volume de 1000 mL com sopro 400 mL/minuto de um gás misturado de ar e 3 % de CO₂ no meio e a cultura resultante foi usada como uma pré-cultura. Como a fonte de luz, enquanto a luz a partir de uma lâmpada fluorescente foi usada. A pré-cultura em um volume de 16 mL foi adicionado a 800 mL do meio 0,2 x Gamborg's B5 contido em um frasco de meio de volume 1000 mL e cultura foi realizada em uma temperatura de cultura de 30°C e uma intensidade de luz de 7,000 lux por 14 dias com sopro 400 mL/minuto de um gás misturado de ar e 3 % de CO₂ no meio.

[0344] (meio 0,2 x Gamborg's B5)

KNO ₃	500 mg/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	50 mg/L
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	30 mg/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	30 mg/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	26,8 mg/L
Na ₂ -EDTA	7,46 mg/L

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,56 mg/L
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2 mg/L
H_3BO_3	0,6 mg/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,4 mg/L
KI	0,15 mg/L
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,05 mg/L
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,005 mg/L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,005 mg/L

[0345] O meio foi esterilizado por submeter à autoclave a 120°C por 15 minutos.

[0346] <Exemplo 18> Exame do solvente usado pelo tratamento do solvente orgânico do solvente usado pelo tratamento de solvente orgânico pela extração de ácido graxo

[0347] Um meio de cultura obtido no Exemplo 17 foi centrifugado e água esterilizada foi adicionado ao precipitado para preparar um concentrado de 40 vezes do meio. O concentrado foi ajustado ao pH 4,5 com 3 N de HCl e 600 ml do concentrado foi colocado em um tubo de Eppendorf 1,5 de volume, pré-incubado com repouso a 55°C por 5 minutos e incubados à mesma temperatura e 1000 rpm por 30 minutos e 42°C e 1000 rpm por 12 horas para hidrolisar os óleos e graxos. A amostra obtida em um volume de 250 mL foi centrifugado e o precipitado foi secado a 65°C por 50 minutos em um evaporador centrífuga para preparar uma amostra seca. A amostra seca ou amostra não processada seca, 500 mL de cada solvente foi adicionado. Cada amostra foi extraído a 45°C e 1000 rpm por 30 minutos e quantidade de ácido graxo em cada amostra foi medido. Os resultados de medição são mostrados na Fig. 9. A eficiência de extração de ácido graxo foi calculado como um valor relativo da quantidade de ácido graxo obtido pela centrifugação 25 mL do produto processado em temperatura média, recolocado em suspensão do precipitado em 200 mL de 1 % de solução

aquosa NaCl e extração de ácidos graxos em um rompimento de célula de tipo de pérola contendo 400 mL de cada um de metanol e clorofórmio, que foi tomado como 100. Quando a amostra não processada seca foi extraída com metanol, etanol, acetona ou butanol, eficiência de extração de ácido graxo alto foi obtido. De outra maneira, quando a amostra seca foi extraída com cada solvente, a eficiência de extração diminuída. Além disso, com acetato de etila, a eficiência de extração diminuída para a amostra seca e a amostra não processada seca.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir um L-aminoácido, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) preparar um produto processado de uma microalga, que promove a produção e o acúmulo do L-aminoácido por uma bactéria tendo uma capacidade de produzir o L-aminoácido, compreendendo:

(i) cultivar a microalga em um primeiro meio, seguido por

(ii) incubar a microalga cultivada da etapa (i) em uma temperatura média é de 40°C a 70°C, e

(iii) realizar centrifugação no produto da etapa (ii), resultando em um precipitado e sobrenadante; e

(b) cultivar a bactéria em um meio compreendendo o sobrenadante da etapa (iii) para produzir e acumular o L-aminoácido no segundo meio, em que o sobrenadante compreende glicose e glicerol, e

(c) coletar o L-aminoácido a partir do segundo meio.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a temperatura é diminuída na incubação da etapa (ii).

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a microalga é uma alga que pertence à divisão *Chlorophyta* ou *Heterokontophyta*.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a microalga é uma alga que pertence à classe *Chlorophyceae*, *Trebouxiophyceae* ou *Bacillariophyceae*.

5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a microalga é uma alga que pertence à classe *Chlorophyceae*.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a bactéria é uma bactéria que pertence à família *Enterobacteriaceae* ou uma bactéria corineforme.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo

fato de que a bactéria que pertence à família *Enterobacteriaceae* é *Escherichia coli*.

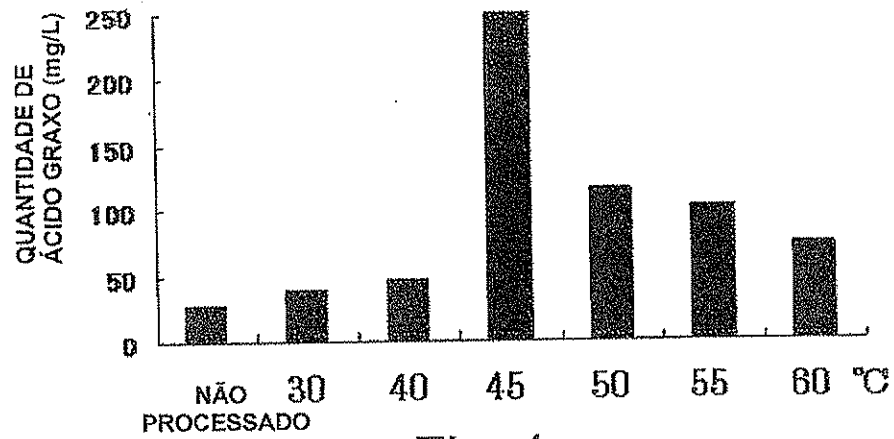


Fig. 1

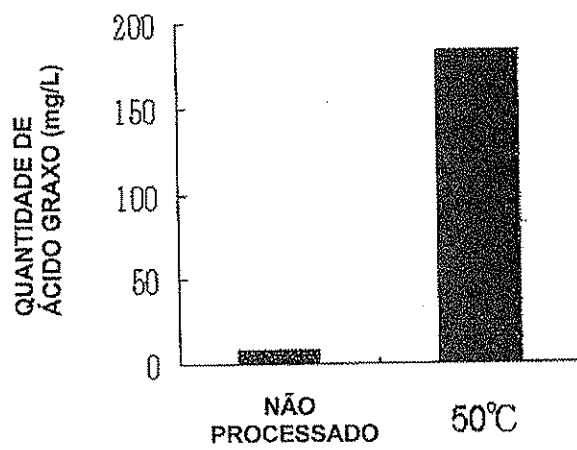


Fig. 2

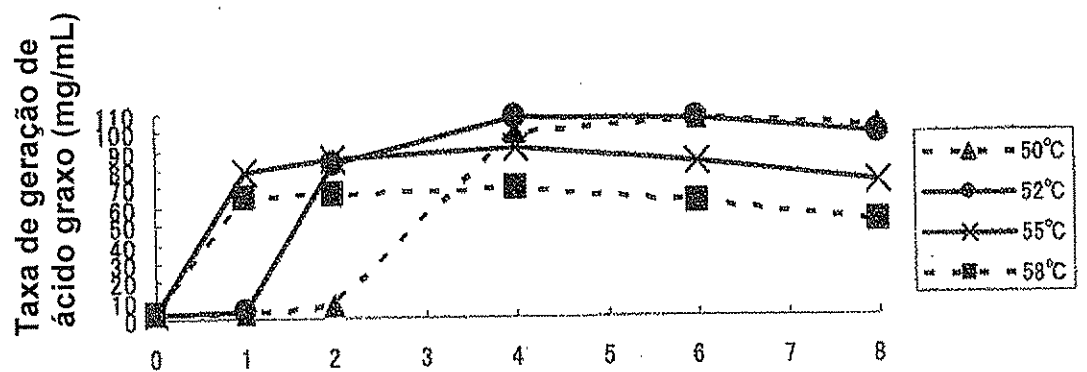


Fig. 3

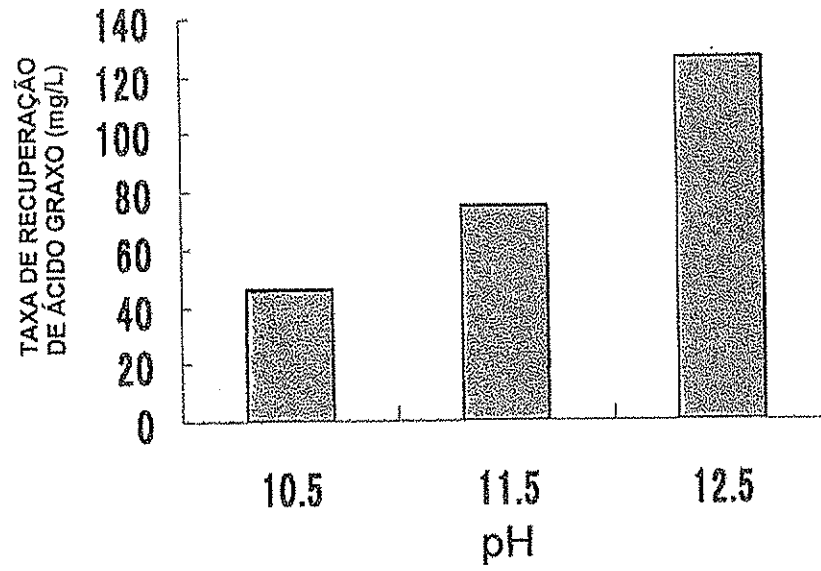


Fig. 4

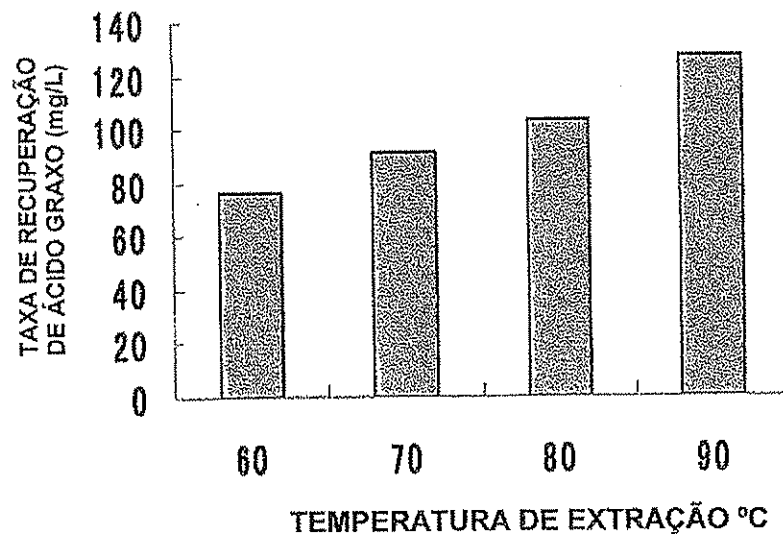


Fig. 5

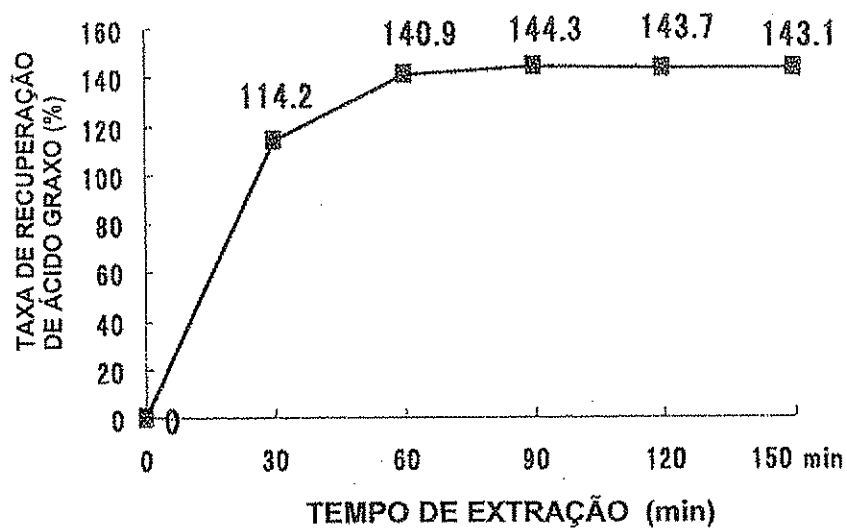


Fig. 6

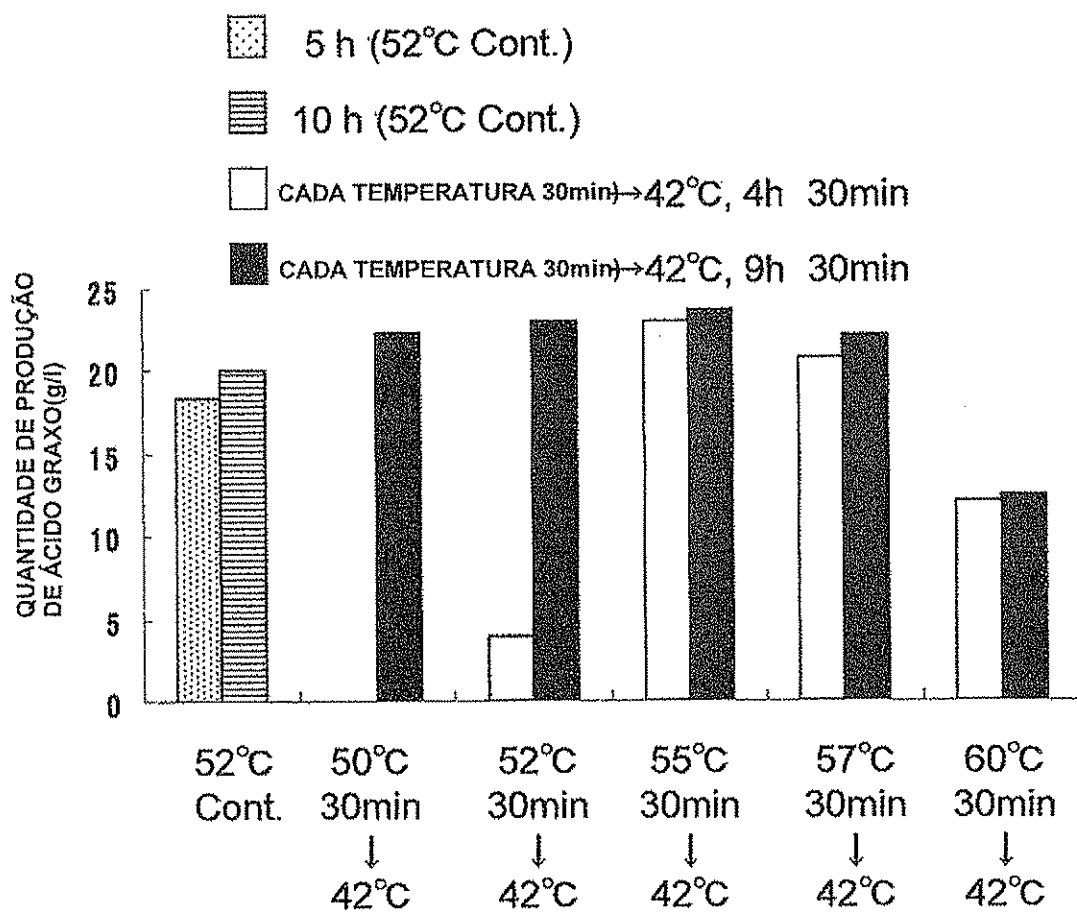


Fig. 7

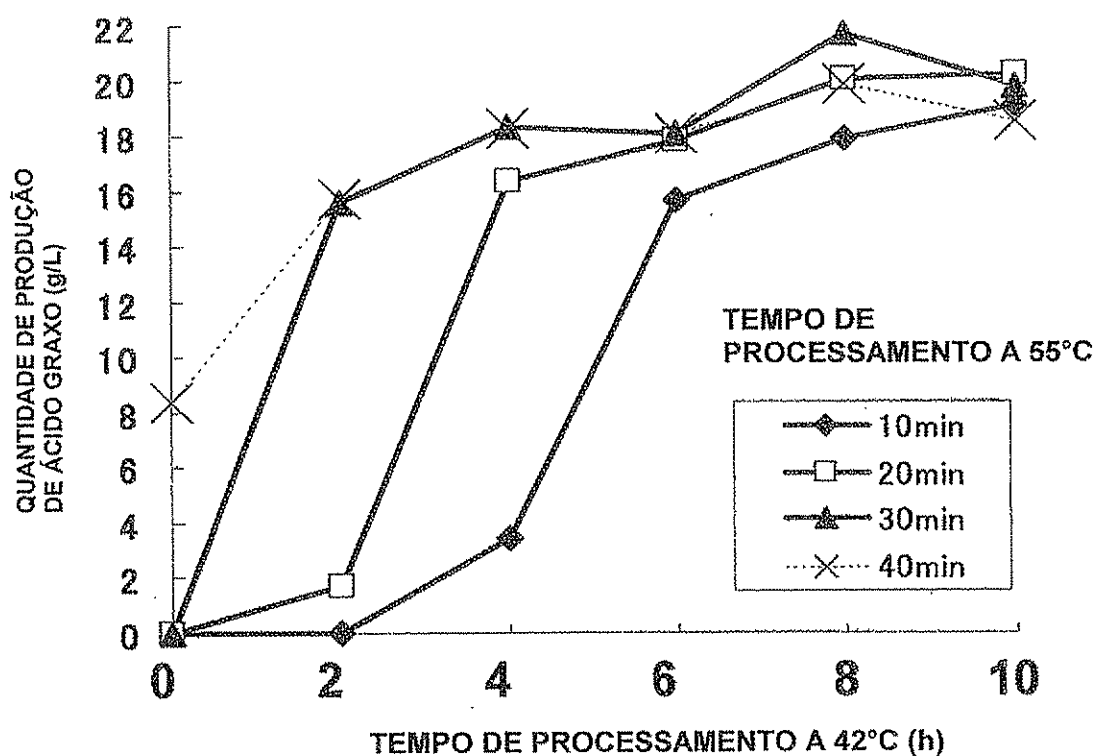


Fig. 8

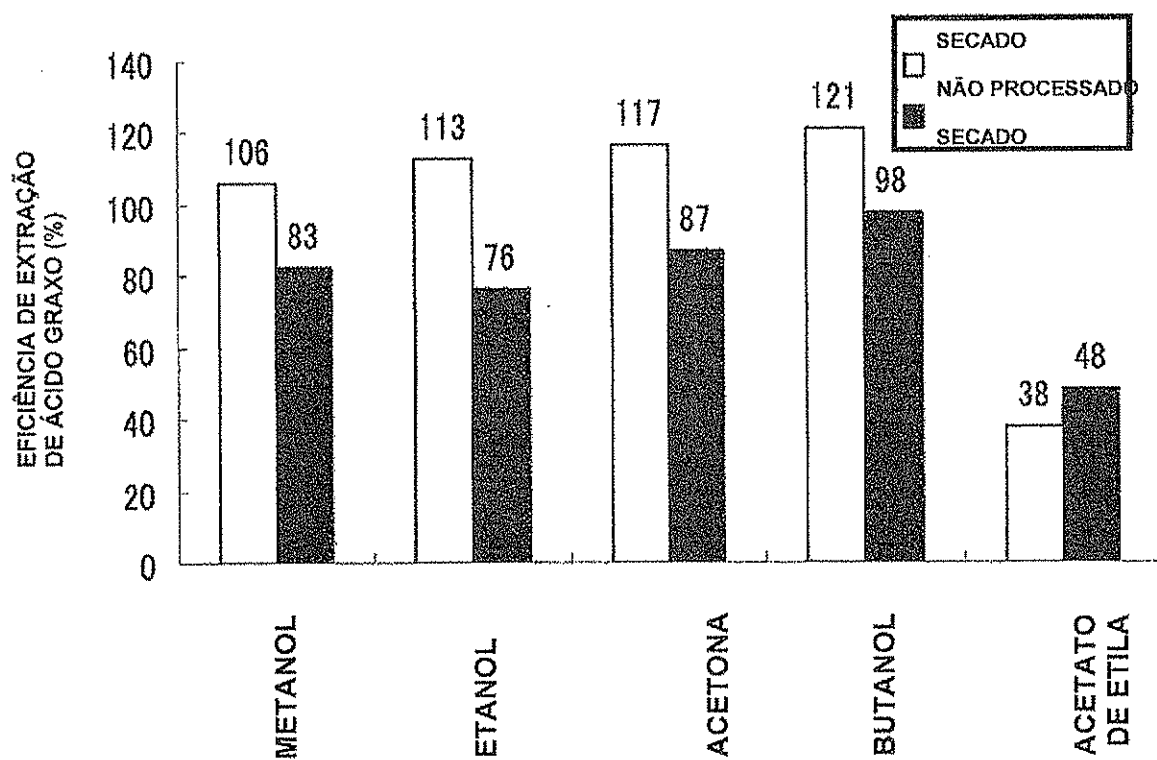


Fig. 9