



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

**(21) PI 1005716-1 A2**

**(22) Data do Depósito:** 20/12/2010

**(43) Data da Publicação:** 03/11/2015  
**(RPI 2339)**



**(54) Título:** MÉTODOS PARA PRODUZIR UMA SOLUÇÃO DE AÇÚCAR E PARA PRODUZIR UMA SUBSTÂNCIA ALVO

**(51) Int. Cl.:** C13B 10/02; C12S 3/02; C12P 13/04; C12R 1/01; A23L 1/09

**(30) Prioridade Unionista:** 22/12/2009 JP 2009-290680

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

**(72) Inventor(es):** AKITO CHINEN

**(74) Procurador(es):** MOMSEN, LEONARDOS & CIA.

**(57) Resumo:** MÉTODOS PARA PRODUZIR UMA SOLUÇÃO DE AÇÚCAR E PARA PRODUZIR UMA SUBSTÂNCIA ALVO. Uma solução de açúcar é obtida por separação de bagaço de cana de açúcar em mesocarpo e casca, e reagir o mesocarpo com uma enzima diastática como celulase ou uma mistura de celulase de hemicelulase em um líquido para produzir um sacarídeo. Além disso, uma substância alvo como L-aminoácidos e ácidos nucleicos é produzida por fermentação usando a solução de açúcar obtida ou um produto de fracionamento da mesma como uma fonte de carbono.

## “MÉTODOS PARA PRODUZIR UMA SOLUÇÃO DE AÇÚCAR E PARA PRODUZIR UMA SUBSTÂNCIA ALVO”

### **Campo Técnico**

5 A presente invenção refere-se a técnicas para obter uma solução de açúcar a partir de um resíduo de extração de caldo de cana de açúcar por uso de uma enzima diastática.

### **Fundamentos da técnica**

10 O uso de biomassa, por exemplo, porções não comestíveis de plantas como cana de açúcar e milho, como fontes de energia renovável é esperado. Por exemplo, como para biomassa, etanol produzido a partir de biomassa, considera-se que mesmo se dióxido de carbono for emitido no ar pela combustão do etanol da biomassa, ele se origina em dióxido de carbono no ar fixado pela fotossíntese, e assim, a quantidade total de carbono no ar não muda, e possibilidades do mesmo como uma fonte de energia são  
15 esperadas.

A fim de usar esta biomassa como descrito acima como um substrato de fermentação, polissacarídeos, como celulose, hemicelulose e lignina, que são os componentes principais de teor sólido em biomassa, precisam ser processados de modo que possam ser usados como enzimas  
20 diastáticas de microorganismos, e várias técnicas foram descritas (patente japonesa acessível ao público (Kokai) Nos. 2000-236899, 2004-321174, 2009-59, 2009-22165, 2009-155339 e acessível no país de uma tradução japonesa do pedido PCT (Kohyo) No. 2008-535664). Além disso, uma técnica de usar uma composição de enzima contendo dois ou mais tipos de  
25 celulasas e hemicelulasas como uma mistura para sacarificação de biomassa lignosa foi também descrita (patente japonesa acessível ao público No. 2009-22165).

O processo de sacarificação enzimática de biomassa é dividido em uma etapa de pré-tratamento (tratamento para torná-lo fácil para as

enzimas diastáticas atuarem sobre a celulose e hemicelulose), e a etapa de sacarificação (adição de enzimas diastáticas para induzir uma reação de decomposição de celulose e hemicelulose em monossacarídeos). Apesar de ser tecnicamente possível produzir sacarídeos por este processo, ele nunca foi industrializado, porque é muito caro. Porque as enzimas diastáticas são caras, para obter uma solução de açúcar com pouca enzima diastática foi um desafio para a industrialização do processo.

Bagaço é uma biomassa sub-produzida em uma grande quantidade no momento do esmagamento da cana de açúcar e extração de seu caldo. Para produzir sacarídeos, pasta de papel, materiais de base de utensílios laqueados, painéis de construção, ração animal, e outros, usando o bagaço como uma material prima, pesquisas e desenvolvimentos, assim como fabricação experimental de produtos e planejamento para industrialização foram realizados. Técnicas para uso bagaço como uma material prima de fermentação também foram propostas (patente japonesa acessível ao público No. 2007-15881, acessível no país de uma tradução japonesa do pedido 2008-535524 etc.). No estudo de sacarificação de bagaço, pesquisas foram conduzidas sobre vários pré-tratamentos para desenvolver um processo de sacarificação enzimática tendo valores suficientes bem equilibrados com o custo pretendido, mas qualquer processo não foi colocado em uso prático.

Além disso, foi descrita uma técnica para separar bagaço em mesocarpo (medula de tipo de polpa de soja) e casca (estrutura dura fibrosa), realizando a fermentação do ácido lático com o mesocarpo adicionado com sacarídeos e adicionando um agente espessante ao produto de fermentação para produzir ração animal (patente japonesa acessível ao público No. 11-137183). No entanto, a sacarificação de mesocarpo não foi relatada.

## SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Um objeto da presente invenção consiste em prover um método para eficientemente sacarificar um resíduo de extração de caldo de

cana de açúcar com menor enzima diastática.

Os inventores da presente invenção realizaram estudos extensivos a fim de alcançar o objeto acima mencionado, como um resultado, encontraram que uma solução de açúcar pode ser eficientemente obtida com  
5 menos enzima diastática por separação do bagaço de cana de açúcar em mesocarpo (medula de tipo pasta de soja) e casca (pele externa) e sacarificação das porções de mesocarpo, e assim alcançaram a presente invenção.

Isto é, a presente invenção é como a seguir.

10 (1) Um método para produzir uma solução de açúcar compreendendo a etapa de reagir uma enzima diastática com mesocarpo que foi separado da cana de açúcar em um líquido para produzir sacarídeos.

(2) O método como mencionado acima, em que o mesocarpo foi separado do bagaço da cana de açúcar.

15 (3) O método como mencionado acima, em que o mesocarpo foi obtido por separação do bagaço da cana de açúcar em mesocarpo e casca, e coleta do mesocarpo.

(4) O método como mencionado acima, em que a enzima diastática é uma celulase ou uma mistura de uma celulase e uma  
20 hemicelulase.

(5) Um método para produzir uma substância alvo, que compreende produzir uma solução de açúcar pelo método como mencionado acima, e produzir a substância alvo por fermentação usando a solução de açúcar obtida ou um produto de fracionamento da mesma como uma fonte de  
25 carbono.

(6) O método como mencionado acima, em que a substância alvo é um L-aminoácido ou um ácido nucleico.

De acordo com a presente invenção, no momento de obter uma solução de açúcar a partir do resíduo de extração de caldo de cana de açúcar,

se torna possível obter a solução de açúcar com menos enzima diastática, isto é, em um custo menor. A solução de açúcar obtida ou um produto de fracionamento da mesma pode ser usada como uma material prima da fermentação de etanol, ou fermentação de aminoácido, e assim a produção de energia e materiais utilizáveis a partir de uma biomassa não comestível se torna possível.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO EXEMPLARES

A seguir, a presente invenção será explicada em detalhes.

10 <1> Método para produzir solução de açúcar.

A presente invenção refere-se a um método para produzir uma solução de açúcar compreendendo a etapa de reagir uma enzima diastática com mesocarpo que foi separado da cana de açúcar em um líquido para produzir um sacarídeo.

15 “Cana de açúcar” é geralmente uma erva perene pertencendo à família *Gramineae*, subfamília *Panicoideae*, tribo *Andropogoneae*, gênero *Saccharum* L., e se refere a 6 espécies, *Saccharum spontaneum* L., *Saccharum officinarum* L., *Saccharum robustum* Jeswiet, *Saccharum Barberi* Jeswiet, *Saccharum sinense* Roxb., e *Saccharum edule*, assim como híbridos inter-  
20 espécies dos mesmos, e ainda incluem híbridos intergêneros dos mesmos com plantas de gêneros intimamente relacionados (gêneros *Miscanthus*, *Sorghum*, *Erianthus*, *Ripidium*, etc.) contendo 5% em peso ou mais de açúcar comercialmente recuperável (sacarose) em corpo de cana de açúcar fresco.

25 O mesocarpo refere-se aos componentes da parede da célula a partir da parênquima existente nos caules da cana de açúcar e contendo caldo de cana de açúcar.

O mesocarpo inclui o bagaço de cana de açúcar separado. Por exemplo, ao separar o bagaço da cana de açúcar em mesocarpo e casca, o mesocarpo pode ser obtido (patente japonesa acessível ao público No. 11-

137183). Bagaço é obtido como um resíduo após a extração do caldo de cana de açúcar. O bagaço também pode ser chamado megaço. Quando o caldo de cana de açúcar é extraído, cerca de 25% do peso total geralmente permanece como um resíduo, isto é, bagaço. A cana de açúcar é geralmente triturada até permanecer como um resíduo, isto é, bagaço. A cana de açúcar é geralmente triturada até se tornar um material fibroso, então uma solução de açúcar é extraída por extração do caldo com um moinho, ou efusão usando um difusor, e o resíduo constitui bagaço. No entanto, o método para extração de suco não é limitado a estes. O bagaço geralmente contém cerca de 45% de umidade, cerca de 55% de teor fibroso e uma quantidade pequena de açúcar.

Por remoção da casca fibrosa usando uma peneira a partir do bagaço como tal ou como bagaço seco, o mesocarpo pode ser obtido como uma medula de tipo pasta de soja. Como a peneira, peneiras giratórias, peneiras vibrantes, peneiras inclinadas de 5 a 40 malhas, preferivelmente 10 a 20 malhas, e outras, podem ser usadas. A casca refere-se aos componentes da parede da célula derivadas a partir das estruturas da pele externa da haste de cana de açúcar, e significa estruturas de planta fibrosa.

O mesocarpo também pode ser obtido separando a cana de açúcar (cana limpa) em uma camada de cera, casca e parênquima contendo caldo de cana de açúcar usando um sistema de separação de cana (Onaha A. et al., Journal of Okinawa Agriculture, Vol. 33 No. 1, pp.61-73), e extraindo o uso da parênquima para obter o mesocarpo como resíduo.

O “resíduo de extração de caldo de cana de açúcar” acima mencionado corresponde a bagaço quando o bagaço é usado como uma material prima, ou corresponde ao mesocarpo quando o mesocarpo obtível com um sistema de separação de cana ou semelhante é usado como uma material prima. O caldo de cana de açúcar pode permanecer no resíduo de extração de caldo.

Uma solução de açúcar pode ser obtida deixando uma enzima

diastática reagir com tal mesocarpo como descrito acima em um líquido para produzir um sacarídeo. Exemplos da enzima diastática incluem celulase. Uma mistura de celulase e outra enzima diastática também pode ser usada. Os exemplos de uma tal enzima diastática incluem hemicelulase.

5 Celulase é uma enzima envolvida na hidrólise de ligação (1->4)- $\beta$ -glicosídica, e inclui endoglucanase (EC3.2.1.4), que cliva celulose amorfa dentro da molécula, exoglucanase (celobiohidrolase, EC3.2.1.91), que cliva a ligação do sacarídeo de extremidade de celulose cristalina para liberar a celobiose, e exo-1,4- $\beta$ -D-glucosidase (EC3.2.1.74), que gera glicose a partir da extremidade de celobiose ou celooligosacarídeo. As celulasas comercialmente disponíveis são vendidas como misturas de celulasas tendo as atividades acima mencionadas, e enzimas derivadas de *Aspergillus niger* ou *Trichoderma reesei* são usadas com frequência. Cellic Ctec de Novozymes e Accellerase de Genencor são enzimas diastáticas comercialmente disponíveis mostrando um desempenho de custo superior. Outras enzimas comercialmente disponíveis incluem Meicelase de Meiji Seika Kaisha, Ltd., e assim em diante.

Hemicelulase é um termo genérico para se referir às enzimas envolvidas na hidrólise de ligações glicosídicas contidas em hemicelulose. Hemicelulose inclui polissacarídeos constituindo as paredes de células de células de plantas de terra, exceto para celulose e pectina. Os componentes de hemicelulose abundantemente contém xilano, e os componentes principais de hemicelulase são endo-1,4- $\beta$ -xilanaase (EC 3.2.1.8),  $\beta$ -1,4-xilosidase (EC 3.2.1.37), e assim em diante, mas hemicelulase também contém outras enzimas de hidrólise de ligação glicosídica. Os exemplos de hemicelulase comercialmente disponível incluem Cellic Htec de Novozymes. Hemicelulase também pode ser obtida de Genencore, Amano Enzyme, etc.

Se uma tal enzima diastática, como descrito acima é deixada atuar sobre o mesocarpo, glicose é principalmente produzida, mas outros

sacarídeos como xilose, manose e arabinose se originando em hemicelulose. São também produzidos. Estes sacarídeos podem ser ainda isomerizados ou decompostos por uma reação química ou uma reação enzimática dependendo do uso.

5 Exemplos do líquido usado para a reação incluem solventes aquosos como soluções de tampão. Dependendo da enzima a ser usada, um volume pequeno de um solvente orgânico como ácido acético pode estar contido. As condições de reação como a temperatura de reação e pH podem ser determinados de modo apropriado, por exemplo, de acordo com as  
10 descrições de instruções fixadas nas enzimas comercialmente disponíveis, ou realizando experimentos preliminares. No caso de usar Cellic Ctec de Novozymes, por exemplo, exemplos das condições incluem 45 a 60°C e pH 4,5 a 6,5. Exemplos de quantidade da enzima incluem 2 a 6% (w/v). Exemplos de tempo de reação comum incluem de 24 a 48 horas.

15 Apesar de a reação poder ser realizada em um estado estático, porque a reação de celulose ou hemicelulose e a enzima diastática é uma reação sólido- líquido, ela é preferivelmente realizada com agitação.

20 Apesar do mesocarpo obtido como descrito acima poder ser também usado como tal, ele pode ser uma vez secado e usado. Além disso, o mesocarpo pode ser ainda pulverizado.

Além disso, antes da reação enzimática, o mesocarpo pode ser submetido a um pré-tratamento como deslignificação ou decomposição parcial de hemicelulose.

25 A solução de açúcar obtida pode ser também usada como tal, ou ela pode ser usada como um produto secado após remoção da umidade, dependendo do uso. No entanto, os componentes na solução de açúcar podem ser usados após fracionamento apropriado. Os produtos de fracionamento incluem produtos grosseiramente purificados e purificados. Os exemplos de produtos purificados incluem glicose.

## <2> Método para produzir substância alvo

A solução de açúcar ou um produto de fracionamento da mesma obtível de acordo com a presente invenção pode ser usada como, por exemplo, uma fonte de carbono na produção de uma substância alvo por fermentação. Exemplos da substância alvo incluem, por exemplo, álcoois como metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol e butanodiol. Exemplos da substância alvo incluem ácido acético, ácido láctico, ácido propiônico, ácido 3-hidroxi propiônico, ácido succínico, ácido cítrico, aminoácidos e ácidos nucleicos.

10 Em particular, exemplos do L-aminoácido incluem L-lisina, L-ornitina, L-arginina, L-histidina, L-citrulina, L-isoleucina, L-alanina, L-valina, L-leucina, L-glicina, L-treonina, L-serina, L-prolina, L-fenilalanina, L-tirosina, L-triptofano, L-cisteína, L-cistina, L-metionina, ácido L-glutâmico, ácido L-asparágico, L-glutamina, e L-asparagina.

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

Exemplos do ácido nucleico incluem nucleosídeos de purina, 20 nucleotídeos de purina, e assim por diante. Os nucleosídeos de purina incluem inosina, xantosina, guanosina, adenosina, e assim por diante, e os nucleotídeos de purina incluem ésteres de 5'-fosfato dos nucleosídeos de purina, por exemplo, ácido inosínico, (inosina-5'-fosfato, de agora em diante também referido como "IMP"), ácido xantílico (xantosina-5'-fosfato, de agora em diante também referido como "XMP"), ácido guanílico (guanosina-5'-monofosfato, de agora em diante também referido como "GMP"), ácido adenílico (adenosina-5'-monofosfato, de agora em diante também referido como "AMP"), e assim por diante. O ácido nucleico referido na presente invenção inclui derivados de ácidos nucleicos obtidos a partir dos ácidos

25

nucleicos mencionados acima como materiais de partida, e exemplos incluem Ara-U (uracil arabinosídeo), ZVA (Z-valaciclovir), e assim por diante.

A substância alvo produzida de acordo com a presente invenção pode consistir de um ou dois ou mais tipos de substâncias.

#### 5 (2-1) Microorganismos utilizáveis para a presente invenção

O microorganismo usado para a presente invenção não é particularmente limitado, desde que um microorganismo tendo uma capacidade para produzir uma substância alvo, e capaz de acumular a substância alvo em um meio líquido ou células microbianas quando ele é  
10 cultivado no meio é escolhido. A quantidade da substância alvo a ser acumulada não é também particularmente limitada desde que ela possa ser acumulada em tal quantidade que possa ser coletada a partir do meio.

Como o microorganismo usado para a presente invenção ou uma cepa parental que é usada para derivar o microorganismo,  
15 microorganismos pertencendo à família *Enterobacteriaceae*, exemplos típicos dos quais são bactérias *Escherichia* e bactérias *Pantoea*, bactérias corineformes, e assim por diante podem ser usados. Outros exemplos de microorganismos pertencendo à família *Enterobacteriaceae* incluem enterobactérias pertencendo a  $\gamma$ -proteobactérias tal como aquelas pertencendo  
20 ao gênero *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Erwinia*, *Salmonella*, *Morganella*, ou os semelhantes, e exemplos de outros microorganismos incluem bactérias *Alicyclobacillus*, bactérias *Bacillus*, leveduras pertencendo ao gênero *Saccharomyces*, *Candida* ou os semelhantes, e assim por diante.

Como as bactérias *Escherichia*, aquelas mencionadas no  
25 trabalho de Neidhardt et al. (Neidhardt, F.C. et al., *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1208, tabela 1), tal como *Escherichia coli*, podem ser utilizadas. Exemplos de cepas tipo selvagem de *Escherichia coli* incluem, por exemplo, a cepa K12 e derivados desta, cepa MG1655 de *Escherichia coli* (ATCC No.

47076), cepa W3110 (ATCC No. 27325), e assim por diante. Elas estão disponíveis a partir da American Type Culture Collection (ATCC, Endereço: P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, Estados Unidos da América). Isto é, números de registro são dados para cada uma das cepas, e as cepas podem ser ordenadas usando estes números de registro. Os números de registro das cepas são listados no catálogo da American Type Culture Collection (se referir a <http://www.atcc.org/>).

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

As bactérias corineformes são um grupo de microorganismos definido em Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed., p.599 (1974), e microorganismos classificados em tais bacilos aeróbicos, Gram-positivos e não ácido-resistentes que são incapazes de esporular podem ser usados. As bactérias corineformes incluem bactérias que foram previamente classificadas no gênero *Brevibacterium*, mas atualmente são unidas no gênero

*Corynebacterium* (Int. J. Syst. Bacteriol. 41:255-260 (1991)), e bactérias pertencendo ao gênero *Brevibacterium* ou *Microbacterium*, que são intimamente relacionados ao gênero *Corynebacterium*.

Exemplos específicos de tais bactérias corineformes incluem  
5 as seguintes:

*Corynebacterium acetoacidophilum*

*Corynebacterium acetoglutamicum*

*Corynebacterium alkanolyticum*

*Corynebacterium callunae*

10 *Corynebacterium glutamicum*

*Corynebacterium lilium*

*Corynebacterium melassecola*

*Corynebacterium thermoaminogenes* (*Corynebacterium  
efficiens*)

15 *Corynebacterium herculis*

*Brevibacterium divaricatum*

*Brevibacterium flavum*

*Brevibacterium immariophilum*

*Brevibacterium lactofermentum*

20 *Brevibacterium roseum*

*Brevibacterium saccharolyticum*

*Brevibacterium thiogenitalis*

*Corynebacterium ammoniagenes*

*Brevibacterium album*

25 *Brevibacterium cerinum*

*Microbacterium ammoniophilum*

Exemplos específicos de tais bactérias incluem as seguintes:

*Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 13870

*Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806

*Corynebacterium alkanolyticum* ATCC 21511

*Corynebacterium callunae* ATCC 15991

*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13020, ATCC 13032,  
ATCC 13060

5 *Corynebacterium lilium* ATCC 15990

*Corynebacterium melassecola* ATCC 17965

*Corynebacterium efficiens* AJ12340 (FERM BP-1539)

*Corynebacterium herculis* ATCC 13868

*Brevibacterium divaricatum* ATCC 14020

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

*Brevibacterium immariophilum* ATCC 14068

*Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869

(*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869)

15 *Brevibacterium roseum* ATCC 13825

*Brevibacterium saccharolyticum* ATCC 14066

*Brevibacterium thiogenitalis* ATCC 19240

*Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6871, ATCC 6872

*Brevibacterium album* ATCC 15111

20 *Brevibacterium cerinum* ATCC 15112

*Microbacterium ammoniaphilum* ATCC 15354

Estas cepas são disponíveis de, por exemplo, American Type Culture Collection (ATCC) (Endereço: P.O. Box 1549, Manassas, VA 2010812301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, Estados Unidos da América). A cepa AJ12340 foi depositada em 27 de outubro de 1987 no National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of Economy, Trade and Industry (atualmente agência administrativa independente, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism

5 Depository, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japan), com um número de acesso de FERM BP-1539 sob as provisões do Tratado de Budapeste. A cepa AJ12418 foi depositada em 5 de janeiro de 1989 no National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of Economy, Trade and Industry com o número de acesso de FERM BP-2205 sob as provisões do Tratado de Budapeste.

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

15 Exemplos de *Bacillus subtilis* incluem *Bacillus subtilis* 168 cepa Marburg (ATCC 6051), *Bacillus subtilis* cepa PY79 (Plasmid, 1984, 12, 1-9), e assim por diante. Exemplos de *Bacillus amyloliquefaciens* incluem *Bacillus amyloliquefaciens* cepa T (ATCC 23842), *Bacillus amyloliquefaciens* cepa N (ATCC 23845), e assim por diante. Exemplos de *Bacillus pumilus* incluem *Bacillus pumilus* Gottheil No. 3218 (ATCC 21005) (Patente US No. 3.616.206), e assim por diante.

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

25 Para conferir a capacidade de produzir um L-aminoácido, métodos convencionalmente empregados no melhoramento de bactérias corineformes ou bactérias do gênero *Escherichia* (veja "Amino Acid Fermentation", Gakkai Shuppan Center (Ltd.), 1st Edition, publicado em 30 de Maio de 1986, pp. 77-100) podem ser usados. Tais métodos incluem métodos de adquirir um mutante auxotrófico, cepas resistentes a L-aminoácido, ou um mutante s de regulação metabólica, ou construir uma cepa recombinante de forma que ela superexpresse uma enzima de biossíntese de L-aminoácido. Aqui, no melhoramento de uma bactéria produtora de L-

aminoácido, uma ou mais das propriedades descritas acima tal como auxotrofia, resistência a análogo, ou mutação de regulação metabólica podem ser conferidas. Expressão de uma ou mais enzimas de biossíntese de L-aminoácido pode ser aumentada. Além disso, os métodos de conferir propriedades tal como uma mutação auxotrófica, resistência a análogo, ou mutação de regulação metabólica podem ser combinados com os métodos de aumentar as enzimas de biossíntese.

Uma cepa mutante auxotrófica, cepa resistente ao análogo de L-aminoácido ou cepa mutante de regulação metabólica com a capacidade de produzir um L-aminoácido pode ser obtida submetendo uma cepa parental ou tipo selvagem à mutagênese convencional, como exposição aos raios-X ou radiação UV, ou ao tratamento com um mutágeno como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, e então selecionar as que exibem autotrofia, resistência a análogo ou mutação na regulação metabólica e a qual também tem a capacidade de produzir um L-aminoácido a partir das cepas mutantes obtidas.

Além disso, a capacidade de produção do L-aminoácido pode ser também conferida ou melhorada pelo aumento da atividade enzimática por recombinação gênica. Um exemplo do método para aumentar a atividade enzimática inclui a modificação da bactéria de modo que a expressão de um gene que codifica uma enzima envolvida na biossíntese de um L-aminoácido é aumentada. A expressão gênica pode ser também aumentada pela introdução de um plasmídeo de amplificação preparado pela introdução de um fragmento de DNA contendo o gene em um plasmídeo apropriado o qual contém, por exemplo, pelo menos um gene responsável pela replicação e proliferação do plasmídeo no microorganismo, aumentando a quantidade de cópias do gene no cromossomo por conjugação, transferência ou semelhante, ou introdução de uma mutação na região promotora do gene (referência à Publicação Internacional WO95/34672).

Quando um gene objetivo é introduzido no plasmídeo de

amplificação ou cromossomo anteriormente mencionado, qualquer promotor pode ser usado para expressar o gene contanto que as funções do promotor escolhido funcionem em bactérias pertencentes às bactérias corineformes. O promotor pode ser um promotor native para o gene, ou um promotor modificado. A expressão de um gene pode ser também controlada pela escolha adequada de um promotor que funciona fortemente em bactérias que pertencem a uma bactéria corineforme, ou tornando as regiões -35 e -10 do promotor mais próximas da sequência de consenso. Esses métodos para aumentar a expressão dos genes da enzima são totalmente descritos na Publicação Internacional WO00/18935, na Publicação da Patente Européia No. 1010755, e assim por diante.

Métodos específicos para conferir a capacidade de produção de L-aminoácido às bactérias e bactérias conferidas com capacidade de produção de L-aminoácido são exemplificadas abaixo.

#### 15 Bactérias produtoras de L-treonina

Exemplos preferidos de microorganismos com capacidade de produção de L-treonina incluem bactérias nas quais uma ou mais atividades das enzimas do sistema de biossíntese de L-treonina são intensificadas. Exemplos de enzimas biossintéticas de L-treonina incluem aspartoquinase III (20 *lysC*), aspartato semialdeído desidrogenase (*asd*), aspartoquinase I (*thrA*), homoserina quinase (*thrB*), treonina sintase (*thrC*) codificadas pelo operon *thr* e aspartato aminotransferase (aspartato transaminase) (*aspC*). As abreviaturas dos nomes dos genes são descritas em parênteses (o mesmo deve ser aplicado em todo este relatório descritivo). Dentre essas enzimas, 25 aspartato semialdeído desidrogenase, aspartoquinase I, homoserina quinase, aspartato aminotransferase e treonina sintase são exemplos particularmente preferidos. Os genes que codificam as enzimas biossintéticas da L-treonina podem ser introduzidos em uma bactéria *Escherichia* a qual tenha capacidade reduzida de decompor a treonina. Um exemplo de tal bactéria *Escherichia*

com capacidade reduzida de decompor treonina é a cepa TDH6, a qual é deficiente na atividade da treonina desidrogenase (Patente Japonesa acessível ao público número 2001-346578).

5 As atividades enzimáticas das enzimas biossintéticas de L-treonina são inibidas pelo produto final, L-treonina. Conseqüentemente, para construir cepas produtoras de L-treonina, é desejável que os genes para as enzimas biossintéticas de L-treonina sejam modificados de modo que as enzimas sejam dessensibilizadas para a inibição por retroalimentação por L-treonina nas cepas produtoras de L-treonina. Os genes *thrA*, *thrB* e *thrC* 10 anteriormente mencionados constituem o operon da treonina, o qual forma uma estrutura atenuadora. A expressão do operon da treonina é inibido por isoleucina e treonina no meio de cultura, e também suprimido por atenuação. A modificação do operon de treonina pode ser atingida pela remoção da sequência líder na região de atenuação ou do atenuador (referência a Lynn, S.P. et al, J. Mol. Biol. 194:59-69 (1987); WO02/26993; WO2005/049808). 15

O promotor nativo do operon da treonina está presente à montante do operon da treonina, e pode ser substituído com um promotor não nativo (referência ao WO98/04715), ou um operon da treonina o qual tenha sido modificado de modo que a expressão do gene de biossíntese da treonina 20 seja controlada pelo repressor e promotor do  $\lambda$ -fago possa ser construída (EP 0593792). Além disso, para modificar uma bactéria de modo que ela seja dessensibilizada para a inibição por retroalimentação por L-treonina, uma cepa resistente ao ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxiisovalérico (AHV) pode ser selecionada.

25 É preferível que o número de cópias do operon de treonina que é modificado para dessensibilizar para a inibição por retroalimentação por L-treonina seja aumentado, ou a expressão do opero de treonina aumentada pela ligação dela com um promotor potente. O número de cópias também pode ser aumentado, além da amplificação usando um plasmídeo, pela transferência do

operon de treonina para um genoma usando um transposon, fago Mu, ou semelhante.

Além das enzimas biossintéticas de L-treonina, os genes envolvidos na via glicolítica, ciclo TCA ou cadeia respiratória, os genes que regulam a expressão desses genes, ou os genes envolvidos na captação do açúcar podem ser também preferivelmente intensificados. Exemplos de tais genes incluem os genes que codificam a transidrogenase (*pntAB*, EP 733712 B), a fosfoenolpiruvato carboxilase (*pepC*, WO95/06114), a fosfoenolpiruvato sintase (*pps*, EP 877090 B) e um gene que codifica a piruvato carboxilase a partir de bactéria corineforme ou da bactéria *Bacillus* (WO99/18228, EP 1092776 A).

Também é preferível otimizar a expressão de um gene que confere resistência a L-treonina ou L-homoserina, ou confere resistência a L-treonina ou L-homoserina ao hospedeiro. Exemplos de gene que confere esta resistência incluem 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 conferir resistência a L-treonina para um hospedeiro são descritos em EP 0994190 A and WO90/04636.

Exemplos de bactérias produtoras de L-treonina e cepas parentais as quais podem ser usadas para derivar tais bactérias incluem, mas não estão limitadas, às cepas que pertencem ao gênero *Escherichia*, como *E. coli* TDH-6/pVIC40 (VKPM B-3996) (Patente US no.5.175.107, Patente US no.5.705.371), *E. coli* 472T23/pYN7 (ATCC 98081) (Patente US no.5.631.157), *E. coli* NRRL-21593 (Patente US no.5.939.307), *E. coli* FERM BP-3756 (Patente US no.5.474.918), *E. coli* FERM BP-3519 e FERM BP-3520 (Patente US no.5.376.538), *E. coli* MG442 (Gusyatiner et al., Genetika (em russo), 14, 947-956 (1978)), *E. coli* VL643 e VL2055 (EP 1149911 A) e assim por diante.

A cepa TDH-6 é deficiente do gene *thrC*, assim como é assimiladora de sacarose, e o gene *ilvA* tem mutação avariada. Esta cepa também tem uma mutação no gene *rhtA*, a qual confere resistência à alta concentração de treonina e homosserina. A cepa B-3996 contém o plasmídeo pVIC40, o qual foi obtido pela inserção do operon *thrA\*BC*, incluindo um gene *thrA* mutante no vetor derivado de RSF1010. Este gene *thrA* mutante codifica a aspartoquinase homosserina desidrogenase I, a qual é substancialmente dessensibilizada para a inibição por retroalimentação por treonina. A cepa B-3996 foi depositada no dia 19 de novembro de 1987 no All-Union Scientific Center of Antibiotics (Nagatinskaya Street 3-A, 117105 Moscow, Rússia com o numero de acesso RIA 1867. A cepa foi também depositada no Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Rússia no dia 7 de abril de 1987, com o número de acesso VKPM B-3996.

*E. coli* VKPM B-5318 (EP 0593792 B) pode ser também usada como uma bactéria produtora de L-treonina ou uma cepa parental para derivá-la. A cepa B-5318 é prototrófica em relação à isoleucina, e um repressor do fago lambda sensível à temperatura C1 e o promotor PR substituem a região regulatória do operon de treonina no plasmídeo pVIC40. A cepa VKPM B-5318 foi depositada como um depósito internacional no Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Rússia) no dia 3 de maio de 1990, com o número de acesso VKPM B-5318.

O gene *thrA* o qual codifica a aspartoquinase homosserina desidrogenase I de *Escherichia coli* é um gene localizado nos números de nucleotídeo 337 a 2.799 na sequência de genoma da cepa de *Escherichia coli* MG1655 registrada com o número de acesso do GenBank U00096, e a codificação para a proteína registrada com o número de acesso do GenBank AAC73113. O gene *thrB* o qual codifica a homosserina quinase de

*Escherichia coli* é um gene localizado nos números de nucleotídeo 2.801 a 3.733 na sequência de genoma da cepa MG1655 de *Escherichia coli* registrada no número de acesso do GenBank U00096, e a codificação para a proteína registrada com o número de acesso do GenBank AAC AAC73114. O gene *thrC* o qual codifica a treonina sintase de *Escherichia coli* é um gene localizado nos números de nucleotídeos 3.734 a 5.020 na sequência de genoma da cepa de *Escherichia coli* MG1655 registrada com o número de acesso do Genbank U00096, e codificando a proteína registrada com o número de acesso do Genbank AAC73115. Estes três genes são codificados como o operon de treonina consistindo de *thrLABC* à jusante do gene *thrL* codificando o peptídeo líder. Para aumentar a expressão do operon de treonina, a região atenuadora a qual afeta a transcrição é desejavelmente removida do operon (WO2005/049808, WO2003/097839).

Um gene *thrA* mutante o qual codifica a aspartoquinase homosserina desidrogenase I resistente à inibição de retroalimentação pela treonina, assim como os genes *thrB* e *thrC*, pode ser obtido como um operon do plasmídeo pVIC40 bem conhecido, o qual está presente na cepa de *E. coli* produtora de treonina VKPM B-3996. pVIC40 é descrito em detalhes na Patente U.S. No; 5.705.371.

O gene *rhtA* é um gene obtido como um gene que confere resistência à homosserina de treonina (*rht*: resistente à treonina/homosserina), localizado nos números de nucleotídeo 848.433 a 849.320 (fita complementar) na sequência de genoma da cepa MG1655 de *Escherichia coli* registrada com o número de acesso do GenBank No. U00096, e codificando a proteína registrada com o número de acesso do GenBank No. AAC73900. Também foi revelado que a mutação *rhtA23* é uma substituição de A por G na posição -1 em relação ao códon de partida ATG (Livshits, V.A. et al., 2003, Res. Microbiol., 154:123-135, EP 1013765 A).

O gene *asd* de *E. coli* é um gene localizado nos números de

nucleotídeo 3.571.798 a 3.572.901 (fita complementar) na sequência do genoma da cepa MG1655 de *Escherichia coli* registrada com o número de acesso GenBank U00096, e codificando a proteína registrada com o número de acesso GenBank No. AAC76458. Ela pode ser obtida por PCR (referência a 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* dos outros microorganismos podem ser também obtidos de modo similar.

O gene *aspC* de *E. coli* é um gene localizado nos números de nucleotídeo 983.742 a 984.932 (fita complementar) na sequência do genoma da cepa MG1655 de *Escherichia coli* registrada com o número de acesso GenBank U00096, e codificando a proteína registrada com o número de acesso GenBank No. AAC74014, e pode ser obtido por PCR. Os genes *aspC* de outros microorganismos podem ser também obtidos de maneira similar.

#### Bactérias produtoras de L-lisina

Bactérias produtoras de L-lisina e métodos para a construção desses são exemplificadas abaixo.

Exemplos de cepas com capacidade de produção de L-lisina incluem, por exemplo, cepas resistentes ao análogo da L-lisina e cepas mutantes de regulação metabólica. Exemplos de análogos de L-lisina incluem, porém não estão limitados, a oxalisina, hidroxamato de lisina, S-(2-aminoetil)-L-cisteína (também abreviada como “AEC” a seguir),  $\gamma$ -metil-lisina,  $\alpha$ -clorocaprolactama e assim por diante. Cepas mutantes com resistência a esses análogos de lisina podem ser obtidas submetendo uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae* ou uma bactéria corineforme a um tratamento de mutagênese artificial convencional. Exemplos específicos de bactérias produtoras de L-lisina incluem *Escherichia coli* AJ11442 (FERM BP-1543, NRRL B-12185, ver a Patente Japonesa acessível ao público No. 56-18596 e a Patente U.S. No. 4.346.170), *Escherichia coli* cepa VL611 (patente japonesa acessível ao público No.

2000-189180), e assim por diante. Como na *Escherichia coli* produtora de L-lisina, a cepa WC196 pode ser também usada (ver a Publicação Internacional WO96/17930).

5 Além disso, uma bactéria produtora de L-lisina pode ser também construída aumentando a atividade de uma enzima do sistema de biossíntese da L-lisina. O aumento da atividade de tal enzima pode ser conseguido pelo aumento da quantidade de cópias do gene que codifica a enzima nas células, ou pela modificação de uma sequência de controle de expressão da mesma.

10 Um gene pode ser modificado para aumentar a expressão, por exemplo, pelo aumento da quantidade de cópias do gene nas células através de 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, como um vetor multicópia, o qual é capaz de funcionar  
15 em um microorganismo hospedeiro, e introduzido em uma bactéria para transformar a mesma.

O aumento do número de cópias de um gene pode ser também conseguido pela introdução de múltiplas cópias do gene em um DNA genômico de uma bactéria. Para introduzir várias cópias de um gene em um  
20 DNA genômico de uma bactéria, a recombinação homóloga é efetuada pelo uso de uma sequência cujas cópias múltiplas existem no DNA genômico como alvos. Como sequências cujas múltiplas cópias existem no DNA genômico, DNA repetitivo e repetições invertidas existentes na extremidade de um elemento transponível podem ser usadas. Outro gene pode ser introduzido ao  
25 lado do gene *gapA* que existe em um genoma em tandem, ou ele pode ser introduzido em um gene não-necessário no genoma em quantidade plural. Tal transferência do gene pode ser efetuada pelo uso de um vetor sensível a temperatura ou um vetor de integração.

Alternativamente, conforme revelado na Patente Japonesa

acessível ao público No. 2-109985, também é possível incorporar o gene em um transposon, e permitir que ele transfira para introduzir múltiplas cópias dos genes em um DNA genômico. A transferência do gene para o genoma pode ser confirmada efetuando uma hibridização Southern usando uma parte do gene como sonda.

Além disso, além do aumento acima mencionado do número de cópias do gene, a expressão do gene pode ser intensificada pela substituição de uma sequência de controle de expressão como um promotor do gene em um DNA genômico ou plasmídeo com um mais forte, tornando as regiões -35 e -10 do gene mais próximas da sequência de consenso, pela amplificação de um regulador que aumente a expressão do gene, ou pela deleção ou atenuação de um regulador que diminua 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 PR do fago lambda e o promotor PL, promotor tet, promotor T7, promotor  $\Phi$ 10 e assim por diante são conhecidos como promotores fortes. Um promotor ou região SD do gene *gapA* pode ser também modificado de modo a se tornar mais forte pela introdução de uma substituição de nucleotídeo ou semelhante. Exemplos do método para avaliar a força de um promotor e promotores fortes estão descritos no trabalho de Goldstein et al. (Prokaryotic promoters in biotechnology, Biotechnol. Annu. Rev., 1995, 1, 105-128) e assim por diante. Além disso, sabe-se que a substituição de vários nucleotídeos em um espaçador entre o sítio de ligação do ribossomo (RBS) e o códon de iniciação de tradução, especialmente uma sequência imediatamente à montante do códon de iniciação, afeta muito a eficiência da tradução do mRNA, e deste modo esta sequência pode ser modificada. As regiões de controle de expressão, como um promotor de um gene, podem ser também identificadas pelo uso de um vetor de busca de promotor ou software de análise de gene como GENETYX. Por tal

substituição ou modificação do promotor conforme descrito acima, a expressão de um gene é aumentada. A substituição de uma sequência de controle de expressão pode ser também atingida, por exemplo, por um método usando um plasmídeo sensível à temperatura ou integração dirigida por Red  
5 (WO2005/010175).

Exemplos dos genes que codificam as enzimas biossintéticas da L-lisina incluem genes que codificam as enzimas da via do diaminopimelato, como o gene da diidrodipicolinato sintase (*dapA*), o gene da aspartoquinase (*lysC*), o gene da diidrodipicolinato redutase (*dapB*), o gene da  
10 diaminopimelato descarboxilase (*lysA*), o gene da diaminopimelato desidrogenase (*ddh*) (WO96/40934 para todos os genes precedentes), gene da fosfoenolpiruvato carboxilase (*ppc*) (patente japonesa acessível ao público No. 60-87788), gene da aspartato aminotransferase (*aspC*) (publicação da patente japonesa (Kokoku) No. 6-102028), gene da diaminopimelato  
15 epimerase (*dapF*) (patente japonesa acessível ao público No. 2003-135066), e gene da aspartato semialdeído desidrogenase (*asd*) (WO00/61723), e os genes que codificam as enzimas da via do ácido aminoadípico como gene da homoaconitato hidratase (patente japonesa acessível ao público No. 2000-157276). Além disso, a cepa de origem pode mostrar um nível aumentado de  
20 expressão do gene envolvido na eficiência de energia (*cyo*) (EP 1170376 A), o gene codificando a nicotinamida nucleotídeo transidrogenase (*pntAB*) (Patente U.S. No. 5.830.716), o gene *ybjE* codificando uma proteína com atividade de excreção de L-lisina (WO2005/073390), o gene que codifica a glutamato desidrogenase (*gdhA*) (Valle F. et al., 1983, Gene 23:199-209) ou  
25 uma combinação arbitrária desses. As abreviações para os genes estão mostradas entre parênteses.

Sabe-se que a diidrodipicolinato sintase de tipo selvagem derivada de *Escherichia coli* sofre de inibição por retroalimentação pela L-lisina, e sabe-se que a aspartoquinase tipo selvagem derivada de *Escherichia*

*coli* sofre de supressão e inibição por retroalimentação pela L-lisina. Consequentemente, quando o gene *dapA* e o gene *lysC* são usados, estes genes são preferivelmente genes que codificam enzimas mutantes dessensibilizadas para a inibição por retroalimentação pela L-lisina.

5 Exemplos de DNA codificando uma diidrodipicolinato sintetase mutante dessensibilizada para inibição por retroalimentação pela L-lisina incluem um DNA codificando tal proteína com uma sequência de aminoácidos na qual o resíduo de histidina na posição 118 é substituído pelo resíduo de tirosina. Exemplos de DNA codificando uma aspartoquinase  
10 mutante dessensibilizada para inibição por retroalimentação pela L-lisina incluem um DNA codificando AKIII com uma sequência de aminoácidos na qual o resíduo de treonina na posição 352, o resíduo de glicina na posição 323 e o resíduo e metionina na posição 318 são substituídos por resíduos de isoleucina, asparagina e isoleucina, respectivamente (para esses mutantes, ver  
15 as Patentes U.S. Nos. 5.661.012 e 6.040.160). Tais DNAs mutantes podem ser obtidos por mutagênese específica de sítio usando PCR ou semelhante.

Plasmídeos com faixa ampla do hospedeiro RSFD80, pCAB1 e pCABD2 são conhecidos como plasmídeos contendo um gene *dapA* mutante codificando uma diidrodipicolinato sintase mutante e um gene *lysC*  
20 mutante codificando uma aspartoquinase mutante (Patente U.S. No. 6.040.160). A cepa de *Escherichia coli* JM109 transformada com o plasmídeo foi nomeada AJ12396 (Patente U.S. No. 6.040.160), e a cepa foi depositada no National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and  
25 Industry (atualmente National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Organism Depository) em 28 de outubro de 1993 e recebeu o número de acesso de FERM P-13936, e o depósito foi então convertido em um depósito internacional sob as provisões do Tratado de Budapeste em 1o. de novembro de 1994 e recebeu o número de acesso de

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

Exemplos de tais enzimas envolvidas na produção de L-lisina incluem a homoserina desidrogenase, a lisina descarboxilase (*cadA*, *ldcC*), a enzima málica e assim por diante, e as cepas nas quais as atividades dessas enzimas são diminuídas ou deletadas são reveladas em WO95/23864, WO96/17930, WO2005/010175, e assim por diante.

É preferível que as expressões tanto os genes *cadA* quanto *ldcC* codificando a lisina descarboxilase sejam reduzidas para reduzir ou deletar a atividade da lisina descarboxilase. A expressão de ambos os genes pode ser reduzida, por exemplo, pelo método descrito em WO2006/078039.

Para reduzir ou eliminar as atividades dessas enzimas, uma mutação pode ser introduzida nos genes das enzimas em um genoma por um método de mutagenese comum ou técnica de recombinação genética de modo que as atividades intracelulares das enzimas sejam reduzidas ou eliminadas. Tal introdução de uma mutação pode ser conseguida, por exemplo, usando a recombinação genética para eliminar os genes que codificam as enzimas no genoma ou para modificar uma sequência de controle de expressão, tal como um promotor ou a sequência Shine-Dalgarno (SD). Isto pode ser também conseguido pela introdução de uma mutação para substituição de aminoácido (mutação sentido errado), um códon de parada (mutação não sentido) ou uma mutação de mudança de estrutura para adicionar ou eliminar um ou dois nucleotídeos em regiões que codificam as enzimas no genoma, ou parcialmente ou totalmente deletando os 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. e Goodman M.F., 1997, J. Biol. Chem., 272:8611-8617; Wentz, S.R. e Schachman, H.K., 1991, J. Biol. Chem., 266:20833-20839). As atividades enzimáticas podem ser também reduzidas ou eliminadas pela construção de um gene que codifica uma enzima mutante, da

qual a região codificadora é totalmente ou parcialmente deletada, e a substituição dela por um gene normal em um genoma por recombinação homóloga ou semelhante, ou pela introdução de um transposon ou de seu fator IS no gene.

5 Por exemplo, para introduzir uma mutação que diminua ou elimine as atividades das enzimas mencionadas acima por 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 ele não codifique uma enzima que pode funcionar normalmente, e então uma  
10 bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae* pode ser transformada 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. Exemplos de tal substituição de gene usando a recombinação homóloga inclui métodos de uso de um DNA  
15 linear como o método chamado de integração Red impulsionada (Datsenko, K.A, e Wanner, B.L., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:6640-6645) e o método utilizando a integração Red impulsionada em combinação com um sistema “excisivo” derivado do fago  $\lambda$  (Cho, E.H., Gumport, R.I., Gardner, J.F., 2002, J. Bacteriol., 184:5200-5203) referência ao WO2005/010175), um  
20 método de uso de um plasmídeo contendo uma origem de replicação termossensível (Patente U.S. No. 6.303.383, patente japonesa acessível ao público No. 05-007491), e assim por diante. Além disso, tal mutagenese direcionada a sítio com base na substituição gênica usando recombinação homóloga pode ser também efetuada pelo uso de um plasmídeo o qual não é  
25 capaz de se replicar em um hospedeiro.

Exemplos preferidos da bactéria produtora de L-lisina incluem *Escherichia coli* WC196 $\Delta$ cadA $\Delta$ ldc/pCABD2 (WO2006/078039). A cepa foi construída pela introdução do plasmídeo pCABD2 contendo os genes da biossíntese de lisina (Patente U.S. No. 6.040.160) na cepa WC196 com genes

*cadA* e *ldcC* rompidos, os quais codificam a lisina descarboxilase. A cepa WC196 foi criada a partir da cepa W3110, a qual foi derivada de *Escherichia coli* K-12, pela substituição do gene *lysC* tipo selvagem no cromossomo da cepa W3110 com um gene *lysC* mutante codificando uma aspartoquinase III mutante na qual treonina na posição 352 foi substituída com isoleucina, resultando na dessensibilização da sua inibição por retroalimentação por L-lisina (Patente U.S. No. 5.661.012), e conferindo resistência ao AEC para a cepa resultante (Patente U.S. No. 5.827.698). A cepa WC196 foi designada *Escherichia coli* AJ13069, depositada no National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology (atualmente National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japão) em 6 de dezembro de 1994, e recebeu o número de acesso de FERM P-14690. Então, ela foi convertida em um depósito internacional sob as provisões do Tratado de Budapeste em 29 de setembro de 1995, e recebeu o número de acesso de FERM BP-5252 (Patente US no.5.827.698). A própria cepa WC196 $\Delta$ *cadA* $\Delta$ *ldc* é também uma bactéria de produção de L-lisina preferida. O WC196 $\Delta$ *cadA* $\Delta$ *ldc* foi designado 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, Japão) em 7 de outubro de 2008 com um depósito internacional e recebeu o número de acesso de FERM BP-11027.

O plasmídeo pCABD2 contém um gene *dapA* mutante derivado de *Escherichia coli* e codificando uma diidrodipicolinato sintase (DDPS) com uma mutação para a dessensibilização para a inibição por retroalimentação de L-lisina, um gene *lysC* mutante derivado de *Escherichia coli* e codificando a aspartoquinase III com uma mutação para a

dessensibilização para a inibição por retroalimentação por L-lisina, o gene *dapB* derivado de *Escherichia coli* e codificando a diidrodipicolinato redutase, e o gene *ddh* derivado de *Brevibacterium lactofermentum* e codificando a diaminopimelato desidrogenase (Publicações Internacionais  
5 WO95/16042 e WO01/53459).

Os procedimentos descritos acima para aumentar a expressão do gene das enzimas envolvidas na biossíntese de L-lisina, e os métodos para reduzir as atividades enzimáticas podem ser similarmente aplicado aos genes que codificam as outras enzimas da biossíntese do L-aminoácido.

10 Exemplos de bactérias corineformes produtoras de L-lisina incluem cepas mutantes resistentes ao AEC (cepa (*Brevibacterium lactofermentum* AJ11082 (NRRL B-11470), etc., se refere às Publicações de Patentes Japonesas Nos. 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-  
15 112438); cepas mutantes que requerem um aminoácido como L-homoserina para o seu crescimento (se refere às Publicações de Patentes Japonesas Nos. 48-28078 e 56-6499); cepas mutantes apresentando resistência ao AEC e ainda requerendo um aminoácido como L-leucina, L-homoserina, L-prolina, L-serina, L-arginina, L-alanina e L-valina (referência à Patente U.S. Nos.  
20 3.708.395 e 3.825.472). cepas mutantes produtoras de L-lisina apresentando resistência ao DL- $\alpha$ -amino- $\epsilon$ -caprolactama,  $\alpha$ -aminolauril-lactama, análogo do ácido aspártico, fármaco sulfa, quinóide e N-lauroil-leucina; cepas mutantes produtoras de L-lisina apresentando resistência à oxaloacetato descarboxilase ou um inibidor da enzima do trato respiratório (Patentes  
25 Japonesas acessível ao público Nos. 50-53588, 50-31093, 52-102498, 53-9394, 53-86089, 55-9783, 55-9759, 56-32995, 56-39778, Publicações de Patentes Japonesas Nos. 53-43591 e 53-1833); cepas mutantes produtoras de L-lisina que requerem inositol ou ácido acético (Patentes Japonesas acessível ao público Nos. 55-9784 e 56-8692); cepas mutantes produtoras de L-lisina

que são suscetíveis ao ácido fluoropirúvico ou a uma temperatura de 34°C ou mais (Patentes Japonesas acessível ao público Nos. 55-9783 e 53-86090); cepas mutantes produtoras de L-lisina de bactérias *Brevibacterium* ou *Corynebacterium* apresentando resistência ao etilenoglicol (Patente U.S. No. 4.411.997), e assim por diante.

#### Bactérias produtoras de L-cisteína

Exemplos de bactérias produtoras de L-cisteína e cepas parentais para derivá-las incluem, mas não estão limitados, à *Escherichia coli* como *E. coli* JM15 transformada com vários tipo de alelos do gene *cysE* que codificam a serina acetiltransferase resistente à inibição por retroalimentação (Patente U.S. No. 6.218.168, Pedido de Patente Russa No. 2003121601), *E. coli* W3110 no qual um gene codificando uma proteína adequada para excreção de substâncias citotóxicas é superexpressa (Patente U.S. No. 5.972.663), cepa de *E. coli* com atividade dessulfidrase de cisteína reduzida (Patente Japonesa acessível ao público No. 11-155571), e *E. coli* W3110 na qual a atividade do fator de controle de transcrição positivo do regulador de cisteína codificado pelo gene *cysB* é aumentada (WO01/27307).

#### Bactérias produtoras de L-leucina

Exemplos de bactérias produtoras de L-leucina e cepas parentais podem ser usadas para derivar as bactérias produtoras de L-leucina incluem, mas não estão limitados, a cepas da bactéria *Escherichia coli*, como cepas de *E. coli* resistentes à leucina (por exemplo, a cepa 57 (VKPM B-7386, Patente U.S. No. 6.124.121)) ou análogo de leucina incluindo  $\beta$ -2-tienilalanina, 3-hidroxi-leucina, 4-azaleucina, 5,5,5-trifluoro-leucina e assim por diante (Publicação de Patente Japonesa (Kokoku) No. 62-34397 e Patente Japonesa acessível ao público No. 8-70879), cepas de *E. coli* obtidas pelo método de engenharia genética descrito em WO96/06926, *E. coli* H-9068 (Patente Japonesa acessível ao público No. 8-70879), e assim por diante.

As bactérias usadas para a presente invenção podem ser

melhoradas pela intensificação da expressão de um ou mais genes envolvidos na biossíntese da L-leucina. Exemplos preferidos de tais genes incluem os genes do operon *leuABCD*, um exemplo típico do qual é o gene *leuA* mutante que codifica a isopropil malato sintase a qual foi modificada para ser  
5 dessensibilizada para a inibição por retroalimentação por L-leucina (Patente U.S. No. 6.403.342). Além disso, as bactérias usadas para a presente invenção podem ser melhoradas pela expressão aumentada de um ou mais genes que codificam as proteínas as quais aumentam a exportação de L-aminoácidos das células bacterianas. Exemplos de tais genes incluem *b2682* e *b2683* (os genes  
10 *ygaZH*) (EP 1239041 A2).

Exemplos de cepas produtoras de L-isoleucina de bactérias corineformes incluem as bactérias corineformes das quais o gene *brnE* codificando uma proteína de excreção de cadeia de aminoácidos ramificada é amplificada (Patente Japonesa acessível ao público No. 2001-169788), as  
15 bactérias corineformes conferiram com a capacidade de produção de L-isoleucina por fusão de protoplasto com uma bactéria produtora de L-lisina (Patente Japonesa acessível ao público No. 62-74293), a bactéria corineforme da qual homoserina desidrogenase é aumentada (Patente Japonesa acessível ao público No. 62-91193), a cepa resistente a hidroxameto de treonina  
20 (Patente Japonesa acessível ao público No. 62-195293), cepa resistente ao ácido  $\alpha$ -cetomalônico (Patente Japonesa acessível ao público No. 61-15695) e a cepa resistente à metil lisina (Patente Japonesa acessível ao público No. 61-15696).

#### Bactérias produtoras de L-histidina

25 Exemplos de bactérias produtoras de L-histidina e cepas parentais as quais podem ser usadas para derivar bactérias produtoras de L-histidina incluem, porém não estão limitadas, às cepas de bactérias de *Escherichia*, como cepa de *E. coli* 24 (VKPM B-5945, RU2003677), *E. coli* cepa 80 (VKPM B-7270, RU2119536), *E. coli* NRRL B-12116 - B 12121

(Patente US no.4.388.405), *E. coli* H-9342 (FERM BP-6675), *E. coli* H-9343 (FERM BP-6676) (Patente US no.6.344.347), *E. coli* H-9341 (FERM BP-6674) (EP 1085087 A), *E. coli* AI80/pFM201 (Patente US no.6.258.554), e assim por diante.

5 Exemplos de bactérias produtoras de L-histidina e cepas parentais as quais podem ser usadas para derivar bactérias produtoras de L-histidina também incluem cepas nas quais a expressão de um ou mais genes codificando enzimas biossintéticas de L-histidina são intensificadas. Exemplos de tais genes incluem gene ATP fosforibosiltransferase (*hisG*),  
10 gene fosforibosil AMP ciclohidrolase (*hisI*), gene fosforibosil-ATP pirofosfohidrolase (*hisI*), gene fosforibosilformimino-5-aminoimidazol carboxamida ribotida isomerase (*hisA*), gene amidotransferase (*hisH*), gene histidinol fosfate aminotransferase (*hisC*), gene histidinol fosfatase (*hisB*), gene histidinol desidrogenase (*hisD*), e assim por diante.

15 Sabe-se que as enzimas biossintéticas da L-histidina codificadas por *hisG* e *hisBHAFI* são inibidas pela L-histidina, e deste modo a capacidade de produzir L-histidina pode também ser eficientemente intensificada pela introdução de uma mutação a qual confere resistência à inibição por retroalimentação no gene que codifica para ATP  
20 fosforibosiltransferase (*hisG*) (Patentes Russas Nos. 2003677 e 2119536).

Exemplos específicos de cepas as quais são capazes de produzir L-histidina incluem *E. coli* FERM-P 5038 e 5048, as quais foram transformadas com um vetor que carrega um DNA que codifica uma enzima biossintética da L-histidina (Patente Japonesa acessível ao público No. 56-  
25 005099), cepas de *E. coli* transformadas com um gene que codifica uma proteína envolvida na exportação e aminoácidos (EP 1016710 A), cepa de *E. coli* 80 a qual é resistente a sulfaguanidina, DL-1,2,4-triazol-3-alanina e estreptomicina (VKPM B-7270, patente Russa No. 2119536), e assim por diante.

## Bactérias produtoras do ácido L-glutâmico

Exemplos de bactérias produtoras do ácido L-glutâmico e cepas parentais as quais podem ser usadas para derivar as bactérias produtoras do ácido L-glutâmico incluem, mas não estão limitadas, às cepas bacterianas de *Escherichia*, como *E. coli* VL334thrC<sup>+</sup> (EP 1172433). *E. coli* VL334 (VKPM B-1641) é auxotrófica para L-isoleucina e L-treonina e contém os genes *thrC* e *ilvA* mutantes (Patente U.S. No. 4.278.765). Um alelo tipo selvagem do gene *thrC* foi transferido por transdução geral usando o bacteriófago P1 crescido em células de *E. coli* K12 tipo selvagem (VKPM B-7), resultando na cepa produtora de ácido L-glutâmico auxotrófica para L-isoleucina VL334thrC<sup>+</sup> (VKPM B-8961).

Exemplos das bactérias produtoras do ácido L-glutâmico e cepas parentais as quais podem ser usadas para derivar bactérias produtoras do ácido L-glutâmico também incluem, porém não estão limitadas, às cepas nas quais a expressão de um ou mais genes codificando a enzima biossintética do ácido L-glutâmico é aumentada. Exemplos de tais genes incluem os genes que codificam a glutamato desidrogenase (*gdhA*), glutamina sintase (*glnA*), glutamato sintetase (*gltAB*), isocitrato desidrogenase (*icdA*), aconitato hidratase (*acnA*, *acnB*), citrato sintase (*gltA*), metilcitrato sintase (*prpC*), fosfoenolpiruvato carboxilase (*ppc*), piruvato desidrogenase (*aceEF*, *lpdA*), piruvato quinase (*pykA*, *pykF*), fosfoenolpiruvato sintase (*ppsA*), enolase (*eno*), fosfogliceromutase (*pgmA*, *pgmI*), fosfoglicerato quinase (*pgk*), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gapA*), triose fosfato isomerase (*tpiA*), frutose bifosfato aldolase (*fbp*), fosfofrutoquinase (*pfkA*, *pfkB*), glicose fosfato isomerase (*pgi*) e assim por diante. Dentre essas enzimas, a glutamato desidrogenase, citrato sintase, fosfoenolpiruvato carboxilase e metil citrato sintase são preferidas.

Exemplos de cepas as quais foram modificadas de modo que a expressão do gene da citrato sintase, do gene da fosfoenolpiruvato carboxilase

e/ou o gene da glutamato desidrogenase é aumentada incluem aqueles revelados em EP 1078989 A, EP 955368 A e EP 952221 A.

Exemplos de bactérias produtoras do ácido L-glutâmico e cepas parentais as quais podem ser usadas para derivar as bactérias produtoras do ácido L-glutâmico também incluem cepas nas quais a atividade de uma ou mais enzimas que catalisam uma ou mais reações as quais sintetizam diretamente um ou mais compostos diferentes do ácido L-glutâmico por exemplo, por síntese direta fora da via biossintética do ácido L-glutâmico, é reduzida ou eliminada. Exemplos dessas enzimas incluem isocitrato liase (*aceA*),  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase (*sucA*), fosfotransacetilase (*pta*), acetato quinase (*ack*), acetoidroxiácido sintase (*ilvG*), acetolactato sintase (*ilvI*), formato acetiltransferase (*pfl*), lactato desidrogenase (*ldh*), glutamato descarboxilase (*gadAB*), e assim por diante. Bactérias *Escherichia* sem atividade da  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase ou com atividade da  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase reduzida e métodos para obter tais bactérias são descritos nas Patentes U.S. Nos. 5.378.616 e 5.573.945.

Especificamente, essas cepas incluem as seguintes:

*E. coli* W3110*sucA::Km<sup>r</sup>*

*E. coli* AJ12624 (FERM BP-3853)

*E. coli* AJ12628 (FERM BP-3854)

*E. coli* AJ12949 (FERM BP-4881)

*E. coli* W3110*sucA::Km<sup>r</sup>* é obtida pelo rompimento do gene da  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase (doravante também referido como “gene *sucA*”) de *E. coli* W3110. Esta cepa é completamente deficiente de  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase.

Exemplos das bactérias coreniformes com atividade  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase reduzida incluem, por exemplo, as seguintes cepas:

*Brevibacterium lactofermentum* cepa L30-2 (patente japonesa

acessível ao público No. 2006-340603)

*Brevibacterium lactofermentum* cepa  $\Delta$ S (WO95/34672)

*Brevibacterium lactofermentum* AJ12821 (FERM BP-4172, patente FR No. 9401748)

5 *Brevibacterium flavum* AJ12822 (FERM BP-4173, Patente FR No. 9401748)

*Corynebacterium glutamicum* AJ12823 (FERM BP-4174, Patente FR No. 9401748)

10 *Corynebacterium glutamicum* L30-2 cepa (patente japonesa acessível ao público No. 2006-340603)

Outros exemplos das bactérias produtoras do ácido L-glutâmico inclui a bactéria *Escherichia* a qual é resistente a um antimetabólito do ácido aspártico. Essas cepas podem também ser deficientes na  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase e incluem, por exemplo, *E. coli* AJ13199 (FERM BP-5807) (Patente U.S. No. 5.908.768), FFRM P-12379, a qual adicionalmente é reduzida em uma atividade para decompor o ácido L-glutâmico (Patente U.S. No. 5.393.671); AJ13138 (FERM BP-5565) (Patente U.S. No. 6.110.714), e assim por diante.

Um exemplo de uma bactéria produtora do ácido L-glutâmico a qual pertence a *Pantoea ananatis* é a cepa *Pantoea ananatis* AJ13355. Esta cepa foi isolada do solo em Iwata-shi, Shizuoka-ken, Japão, e foi identificada como sendo capaz de proliferar em um meio contendo ácido L-glutâmico e uma fonte de carbono em pH baixo. A cepa *Pantoea ananatis* AJ13355 foi depositada no National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depository (Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japão) em 19 de fevereiro de 1998 e recebeu o número de acesso de FERM P-16644. Ela foi então convertida em um depósito internacional sob as provisões do Tratado de Budapeste em 11 de janeiro de 1999 e recebeu o número de acesso de FERM

BP-6614. Esta cepa foi originalmente identificada como *Enterobacter agglomerans* quando ela foi isolada, e depositada como *Enterobacter agglomerans* AJ13355. No entanto, ela foi recentemente re-classificada como *Pantoea ananatis* como base no sequenciamento de nucleotídeos de 16S rRNA e assim por diante.

Além disso, os exemplos de bactérias produtoras do ácido L-glutâmico de *Pantoea ananatis* também incluem bactérias *Pantoea* deficientes na atividade de  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase ( $\alpha$ KGDH) ou com atividade  $\alpha$ KGDH reduzida. Exemplos de tal cepa incluem AJ13356 (Patente U.S. No. 6.331.419), a qual foi derivada pela deleção do gene da subunidade  $\alpha$ KGDH-E1 (*sucA*) em AJ13355, e a cepa SC17*sucA* (Patente U.S. No. 6.596.517), que é uma cepa deficiente em gene *sucA* derivada da cepa SC17, e foi selecionada de AJ13355 para esta propriedade de baixa produção de flegma. A cepa AJ13356 foi depositada no National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology (atualmente, a agência administrativa independente, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depository (Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japão, código postal: 305-8566)) em 19 de fevereiro de 1998, e recebeu o número de acesso de FERM P-16645. Então, o depósito foi convertido em um depósito internacional sob as provisões do Tratado de Budapeste em 11 de janeiro de 1999, e recebeu o número de acesso de FERM BP-6616. Apesar das cepas AJ13355 e AJ13356 serem depositadas do depositário acima mencionado como *Enterobacter agglomerans*, elas são referidas como *Pantoea ananatis* neste relatório. A cepa SC17*sucA* recebeu o número privado de AJ417, e foi depositada no National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depository em 26 de fevereiro de 2004, sob o número de acesso de FERM BP-08646.

Exemplos de bactérias *Pantoea ananatis* produtoras de ácido

L-glutâmico incluem ainda as cepas SC17sucA/RSFCPG+pSTVCB, AJ13601, NP106 e NA1. A cepa SC17sucA/RSFCPG+pSTVCB foi obtida pela introdução do plasmídeo RSFCPG contendo o gene da citrato sintase (*gltA*), o gene da fosfoenolpiruvato carboxilase (*ppsA*) e o gene da glutamato desidrogenase (*gdhA*) derivados de *Escherichia coli*, e o plasmídeo pSTVCB contendo o gene da citrato sintase (*gltA*) derivado de *Brevibacterium lactofermentum* na cepa SC17sucA. A cepa AJ13601 foi selecionada da cepa SC17sucA/RSFCPG+pSTVCB para a sua resistência à alta concentração do ácido L-glutâmico em um baixo pH. 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 Depository (Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, Japão, código postal: 305-8566) em 18 de agosto de 1999, e recebeu o número de acesso FERM P-17516. Então, o depósito foi convertido em um depósito internacional sob as provisões do Tratado de Budapeste em 6 de julho de 2000, e recebeu o número de acesso de FERM BP-7207.

Além disso, a capacidade de produzir ácido L-glutâmico pode ser também conferida às bactérias corineformes por um método de amplificação do gene *yggB* para o canal mecanossensível (WO2006/070944), e um método de introdução de um gene *yggB* mutante no qual uma mutação é introduzida na região codificadora. O gene *yggB* é um gene localizado nos números de nucleotídeos 1.337.692 a 1.336.091 (fita complementar) da sequência de genoma da cepa *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 registrada com o número de acesso do Genbank NC\_003450, e codificando uma proteína de membrana também chamada de NCgl1221 e registrada com o número de acesso do Genbank NP\_600492.

Exemplos de outros métodos para conferir ou intensificar a capacidade de produção do ácido L-glutâmico também incluem um método de

conferir resistência a um análogo do ácido orgânico, um inibidor da cadeia respiratória, etc. e um método de conferir sensibilidade a um inibidor da síntese da parede celular. Exemplos de tais métodos incluem os métodos de conferir resistência ao ácido monofluoracético (Patente Japonesa acessível ao público No. 50-113209), o método de conferir resistência à adenina ou timina (Patente Japonesa acessível ao público No. 57-065198), o método de atenuação de urease (Patente Japonesa acessível ao público No. 52-038088), o método de conferir resistência ao ácido malônico (Patente Japonesa acessível ao público No. 52-038088), o método de conferir resistência às benzopironas ou naftoquinonas (Patente Japonesa acessível ao público No. 56-1889), o método de conferir resistência ao HOQNO (Patente Japonesa acessível ao público No. 56-140895), o método de conferir resistência ao ácido  $\alpha$ -cetomalônico (Patente Japonesa acessível ao público No. 57-2689), o método de conferir resistência à guanidina (Patente Japonesa acessível ao público No. 56-35981), o método de conferir sensibilidade à penicilina (Patente Japonesa acessível ao público No. 4-88994), e assim por diante.

Exemplos específicos destas cepas resistentes incluem as seguintes cepas:

*Brevibacterium flavum* AJ3949 (FERM BP-2632; patente japonesa acessível ao público No. 50-113209)

*Corynebacterium glutamicum* AJ11628 (FERM P-5736; patente japonesa acessível ao público No. 57-065198)

*Brevibacterium flavum* AJ11355 (FERM P-5007; patente japonesa acessível ao público No. 56-1889)

*Corynebacterium glutamicum* AJ11368 (FERM P-5020; patente japonesa acessível ao público No. 56-1889)

*Brevibacterium flavum* AJ11217 (FERM P-4318; patente japonesa acessível ao público No. 57-2689)

*Corynebacterium glutamicum* AJ11218 (FERM P-4319;

patente japonesa acessível ao público No. 57-2689)

*Brevibacterium flavum* AJ11564 (FERM BP-5472; patente japonesa acessível ao público No. 56-140895)

5 *Brevibacterium flavum* AJ11439 (FERM BP-5136; patente japonesa acessível ao público No. 56-35981)

*Corynebacterium glutamicum* H7684 (FERM BP-3004; patente japonesa acessível ao público No. 04-88994)

*Brevibacterium lactofermentum* AJ11426 (FERM P-5123; patente japonesa acessível ao público No. 56-048890)

10 *Corynebacterium glutamicum* AJ11440 (FERM P-5137; patente japonesa acessível ao público No. 56-048890)

*Brevibacterium lactofermentum* AJ11796 (FERM P-6402; patente japonesa acessível ao público No. 58-158192)

Bactérias produtoras de L-fenilalanina

15 Exemplos de bactérias produtoras de L-fenilalanina e de cepas parentais as quais podem ser usadas para derivar bactérias produtoras de L-fenilalanina incluem, porém não estão limitadas, às cepas bacterianas de *Escherichia*, como *E. coli* AJ12739 (tyrA::Tn10, tyrR) (VKPM B-8197), a qual não tem corismato mutase-prefenato desidrogenase e o repressor de

20 tirosina (WO03/044191), *E. coli* HW1089 (ATCC 55371), o qual contém o gene pheA34 que codifica a corismato mutase-prefenato desidratase o qual foi modificado para ser dessensibilizado para inibição por retroalimentação (Patente U.S. No. 5.354.672), *E. coli* MWEC101-b (KR8903681), *E. coli* NRRL B-12141, NRRL B-12145, NRRL B-12146 e NRRL B-12147 (Patente

25 U.S. No. 4.407.952). Também as seguintes cepas podem ser usadas para derivar bactérias produtoras de L-fenilalanina: *E. coli* K-12 [W3110(tyrA)/pPHAB (FERM BP-3566), a qual contém genes que codificam a corismato mutase-prefenato desidratase a qual foi modificada para ser dessensibilizada para inibição por retroalimentação, *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] (designadas como AJ12604 (FERM BP-3579) (EP 488424 B1). Além disso, bactérias produtoras de L-fenilalanina de *Escherichia* com atividade intensificada da proteína codificada pelo gene *yedA* ou o gene *yddG* podem ser também usadas (pedidos publicados de Patentes U.S. Nos. 2003/0148473 e 2003/0157667, WO03/044192).

Como bactérias corineformes produtoras de fenilalanina, as cepas de *Cornibacterium glutamicum* BPS-13 (FERM BP-1777), K77 (FERM BP-2062) e K78 (FERM BP-2063) (EP 331145 A, Patente Japonesa acessível ao público No. 02-303495) da qual a atividade da fosfoenolpiruvato carboxilase ou piruvato quinase é reduzida, cepa auxotrófica para tirosina (Patente Japonesa acessível ao público No. 05-049489) e assim por diante podem ser usadas.

Uma bactéria a qual produz eficientemente fenilalanina pode ser também obtida pela modificação de uma bactéria, de modo que a bactéria incorpore subprodutos, por exemplo, pelo aumento da quantidade de expressão do gene de captação do L-triptofano, *tnaB* ou *mtr*, ou o gene de captação da L-tirosina, *tyrP* (EP 1484410).

## 20 Bactérias produtoras de L-triptofano

Exemplos de bactérias produtoras de L-triptofano e de cepas parentais as quais podem ser usadas para derivar bactérias produtoras de L-triptofano incluem, porém não estão limitados, as cepas de bactérias *Escherichia*, como *E. coli* JP4735/pMU3028 (DSM10122) e *E. coli* JP6015/pMU91 (DSM10123), as quais não têm triptofanil-RNAt sintetase codificada por um gene *trpS* mutante (Patente U.S. No. 5.756.345), *E. coli* SV164 (pGH5) a qual contém o alelo *serA* que codifica a fosfoglicerato desidrogenase e o alelo *trpE* que codifica a antranilatossintase, os quais são dessensibilizados para a inibição por retroalimentação por serina e triptofano,

respectivamente (Patente U.S. No. 6.180.373), *E. coli* AGX17 (pGX44) (NRRL B-12263) e *E. coli* AGX6(pGX50)aroP (NRRL B-12264), as quais não têm triptofanase (Patente U.S. No. 4.371.614), e *E. coli* AGX17/pGX50,pACKG4-pps, na qual a capacidade de produção de fosfoenolpiruvato é aumentada (WO97/08333, Patente U.S. No. 6.319.696). As bactérias produtoras de L-triptofano pertencentes ao gênero *Escherichia* com atividade aumentada da proteína codificada pelo gene *yedA* ou o gene *yddG* podem ser usadas também (Pedidos Publicados de Patentes U.S. Nos. 2003/0148473 e 2003/0157667).

Exemplos de bactérias produtoras de L-triptofano e cepas parentais as quais podem ser usadas para derivar bactérias produtoras de L-triptofano também incluem cepas nas quais uma ou mais atividades das seguintes enzimas são intensificadas: antranilato sintase (*trpE*), fosfoglicerato desidrogenase (*serA*), 3-desóxi-D-arabinoeptulose-7-fosfato sintase (*aroG*), 3-desidroquinato sintase (*aroB*), shikimato desidrogenase (*aroE*), shikimato quinase (*aroL*), 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase (*aroA*), corismato sintase (*aroC*), prefenato desidratase, corismato mutase e triptofano sintase (*trpAB*). Prefenato desidratase e corismato mutase são codificadas pelo gene *pheA* como uma enzima bifuncional (corismato mutase/prefenato desidratase, CM/PDH). Dentre essas enzimas, a fosfoglicerato desidrogenase, 3-desóxi-D-arabinoeptulose-7-fosfato sintase, 3-desidroquinato sintase, shikimato desidratase, shikimato quinase, 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase, corismato sintase, prefenato desidratase e corismato mutase-prefenato desidratase são particularmente preferidas. Tanto antranilato sintase quanto fosfoglicerato desidrogenase sofrem de inibição por retroalimentação por L-triptofano e L-serina, e deste modo uma mutação de dessensibilização de inibição por retroalimentação pode ser introduzida nos genes que codificam essas enzimas. Exemplos específicos de cepas com tal mutação incluem a *E. coli* SV164, a qual tem

uma antranilato sintase tipo dessensibilizada e uma cepa transformante obtida pela introdução de pGH5 (WO94/08031) contendo um gene *serA* mutante que codifica a fosfoglicerato desidrogenase dessensibilizada para inibição por retroalimentação em *E. coli* SV164.

5 Exemplos de bactérias produtoras de L-triptofano e cepas parentais as quais podem ser usadas para derivar bactérias produtoras de L-triptofano também incluem cepas as quais foram transformadas com o operon do triptofano, o qual contém um gene que codifica a antranilatossintase dessensibilizada para inibição (Patentes Japonesas acessíveis ao público Nos. 10 57-71397, 62-244382, Patente U.S. No. 4,371,614). Além disso, a capacidade de produção de L-triptofano pode ser conferida pelo aumento da expressão de um gene o qual codifica a triptofano sintase no operon de triptofano (*trpBA*). A triptofano sintase inclui tanto subunidades  $\alpha$  quanto  $\beta$ , as quais são codificadas por *trpA* and *trpB*, respectivamente. Além disso, a capacidade 15 produtora do L-triptofano pode ser melhorada pelo aumento da expressão do operon da isocitrato liase-malato sintase (WO2005/103275).

Como bactérias corineformes, a *Corynebacterium glutamicum* AJ12118 (FERM BP-478, Patente Japonesa No. 01681002), a qual é resistente a sulfaguanidina, a bactéria corineforme introduzida com o operon 20 de triptofano (Patente Japonesa acessível ao público No. 63-240794), e a bactéria corineforme introduzida com um gene codificando a shikimato quinase derivada de uma bactéria corineforme (Patente Japonesa acessível ao público No. 01-994749) pode ser usada.

Bactérias produtoras de L-prolina

25 Exemplo de bactérias produtoras de L-prolina e de cepas parentais as quais podem ser usadas para derivar bactérias produtoras de L-prolina incluem, porém não estão limitadas, às cepas de bacterianas de *Esherichia*, como *E. coli* 702ilvA (VKPM B-8012), a qual não tem o gene *ilvA* e pode produzir L-prolina (EP 1172433).

A bactéria usada para a presente invenção pode ser melhorada pela intensificação da expressão de um ou mais genes envolvidos na biossíntese da L-prolina. Exemplos dos genes preferidos para as bactérias produtoras de L-prolina incluem o gene *proB* que codifica a glutamato quinase, a qual é dessensibilizada para a inibição por retroalimentação pela 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 que codificam as proteínas responsáveis pela secreção de L-aminoácidos das células bacterianas. Exemplos de tais genes são os genes *b2682* e *b2683* (genes *ygaZH*) (EP 1239041 A2).

Bactérias de *Escherichia* tendo uma capacidade de produzir L-prolina incluem as seguintes cepas 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 (15º Simpósio de Inverno de Miami, 1983, p. 34) e assim por diante.

#### Bactérias produtoras de L-arginina

Exemplos de bactérias produtoras de L-arginina e cepas parentais as quais podem ser usadas para derivar as bactérias produtoras de L-arginina incluem, porém não estão limitadas, às cepas bacterianas de *Escherichia*, como a cepa de *E. coli* 237 (VKPM B-7925) (Pedido Publicado de Patente U.S. No. 2002/058315 A1) e suas cepas derivadas abrigando a N-acetilglutamato sintase mutante (Pedido de Patente Russa No. 2001112869), cepa de *E. coli* 382 (VKPM B-7926) (EP 1170358 A1), e uma cepa produtora de arginina transformada com o gene *argA* que codifica uma N-acetilglutamato sintetase (EP 1170361 A1).

Exemplos de bactérias produtoras de L-arginina e as cepas parentais as quais podem ser usadas para derivar bactérias produzindo L-arginina também incluem cepas nas quais a expressão de um ou mais genes

codificando uma enzima biossintética de L-arginina é aumentada. Exemplos de tais genes incluem o gene da N-acetilglutamilfosfato redutase (*argC*), o gene da ornitina acetil transferase (*argJ*), o gene da N-acetilglutamato quinase (*argB*), o gene da acetilnitina transaminase (*argD*), o gene da ornitina carbamoil transferase (*argF*), o gene da ácido argininossuccínico sintetase (*argG*), o gene do ácido argininossuccínico liase (*argH*), e o gene da carbamoil fosfato sintetase (*carAB*).

#### Bactérias produtoras de L-valina

Exemplos de bactérias produtoras de L-valina e de cepas parentais as quais podem ser usadas para derivar bactérias produtoras de L-valina incluem, porém não estão limitados, a cepas as quais foram modificadas para superexpressar o operon *ilvGMEDA* (Patente U.S. No. 5.998.178). É desejável remover a região no operon *ilvGMEDA* a qual é necessária para a atenuação de modo que a expressão do operon não seja atenuada pela L-valina produzida. Além disso, o gene *ilvA* no operon é desejavelmente rompido de modo que a atividade da treonina desaminase é reduzida.

Exemplos de bactérias produtoras de L-valina e de cepas parentais as quais podem ser usadas para derivar as bactérias produtoras de L-valina também incluem mutantes com mutações de aminoacil t-RNA sintetase (Patente U.S. No. 5.658.766). Por exemplo, *E. coli* VL1970, a qual tem uma mutação no gene *ileS* codificando a isoleucina tRNA sintetase pode ser usada. A *E. coli* VL1970 foi depositada na Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (1 Dorozhny proezd., 1 Moscow 117545, Russia) no dia 24 de junho, 1988, com o número de acesso VKPM B-4411.

Além disso, as cepas mutantes as quais requerem ácido lipóico para o crescimento e/ou não têm H<sup>+</sup>-ATPase (WO96/06926) também podem ser usadas como cepas parentais para derivar as bactérias produtoras de L-valina.

Exemplos de bactérias produtoras de L-valina de bactérias corineformes incluem, por exemplo, cepas modificadas de modo que a expressão de um gene que codifica uma enzima biossintética de L-valina é aumentada. Exemplos da enzima de biossíntese de L-valina incluem enzimas codificadas pelos genes presentes no operon *ilvBNC*, isto é, acetoidroxiácido sintetase codificado pelo *ilvBN* e a isômero redutase codificada por *ilvC* (WO00/50624). Uma vez que o operon *ilvBNC* é submetido à 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 pela L-valina que é produzida.

A concessão da capacidade de produção de L-valina para bactérias corineformes pode ser efetuada pelo decréscimo ou eliminação da atividade de pelo menos um tipo de enzima a qual está envolvida em uma via metabólica que diminui a produção de L-valina. Por exemplo, o decréscimo da atividade da treonina desidratase envolvida na síntese da L-leucina ou atividade de uma enzima que está envolvida na síntese de D-pantotenato é contemplado (WO00/50624).

Exemplos dos métodos para conferir capacidade de produção de L-valina também incluem conferir resistência a um análogo de aminoácido ou semelhante.

Exemplos incluem, por exemplo, cepas mutantes as quais são auxotróficas para L-isoleucina e L-metionina, e resistentes à D-ribose, purina ribonucleosídeo ou pirimidina ribonucleosídeo, e têm a capacidade de produzir L-valina (FERM P-1841, FERM P-29, Publicação de Patente Japonesa No. 53-025034), cepas mutantes resistentes aos policetídeos (FERM P-1763, FERM P-1764, Publicação de Patente Japonesa No. 06-065314), e cepas mutantes resistentes à L-valina em um meio contendo ácido acético como a única fonte de carbono e sensível aos análogos do ácido pirúvico (ácido fluoropirúvico, etc.) em um meio contendo glicose como a única fonte

de carbono (FERM BP-3006, BP-3007, Patente Japonesa No. 3006929).

#### Bactérias produtoras de L-isoleucina

Exemplos de bactérias produtoras de L-isoleucina e cepas parentais as quais podem ser usadas para derivar as bactérias produtoras de L-isoleucina incluem, porém não estão limitados, aos mutantes os quais são resistentes à 6-dimetilaminopurina (Patente Japonesa acessível ao público No. 5-304969), mutantes os quais são resistentes aos análogos de isoleucina como tiaisoleucina e hidroxamato de isoleucina, e mutantes os quais são adicionalmente resistentes à DL-metionina e/ou hidroxamato de arginina (Patente Japonesa acessível ao público No. 5-130882). Além disso, as cepas recombinantes transformadas com os genes que codificam as proteínas envolvidas na biossíntese de L-isoleucina, como treonina desaminase e acetoidroxato sintase também podem ser usadas como cepas parentais para derivar as bactérias produtoras de L-isoleucina (Patente Japonesa acessível ao público No. 2-458, FR 0356739 e Patente U.S. No. 5.998.178

Exemplos de cepas produtoras de L-isoleucina das bactérias corineformes incluem a bactéria corineforme da qual o gene *bnrE* que codifica uma proteína de excreção do aminoácido da cadeia ramificada é amplificada (Patente Japonesa acessível ao público No. 2001-169788), a bactéria corineforme com capacidade de produção de L-isoleucina por fusão de protoplasto com uma bactéria produtora de L-lisina (Patente Japonesa acessível ao público No. 62-74293), a bactéria corineforme da qual a homoserina desidrogenase é aumentada (Patente Japonesa acessível ao público No. 62-91193), a cepa resistente à hidroxamato de treonina (Patente Japonesa acessível ao público No. 62-195293), a cepa resistente ao ácido  $\alpha$ -cetomalônico (Patente Japonesa acessível ao público No. 61-15695), e a cepa resistente à metil-lisina (Patente Japonesa acessível ao público No. 61-15696).

#### Bactérias produtoras de L-metionina

Exemplos de bactérias produtoras de L-metionina e cepas

parentais para derivar bactérias produtoras de L-metionina incluem, porém não estão limitados, à cepa mutante auxotrófica de L-treonina e à cepa mutante resistente a norleucina (Patente Japonesa acessível ao público No 2000-139471). Além disso, uma cepa deficiente de repressor de metionina e

5 cepas recombinantes transformadas com os genes que codificam proteínas envolvidas na biossíntese da L-metionina como homoserina trans-succinilase e cistationina  $\gamma$ -sintase (Patente Japonesa acessível ao público No. 2000-139471) podem ser também usadas como cepas parentais.

Métodos para conferir capacidade de produzir ácido nucleico a

10 um microorganismo e bactérias produtoras de ácidos nucleicos serão exemplificados abaixo.

Uma bactéria tendo uma capacidade de produzir um ácido nucleico pode ser obtida conferindo, por exemplo, auxotrofia para nucleosídeo de purina ou resistência a um fármaco tal como análogo de purina

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

20 EMS (metanossulfonato de etila).

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

Como um exemplo específico de cepa produtora de inosina pertencendo ao gênero *Bacillus*, a cepa KMBS16 de *Bacillus subtilis* pode ser

25 usada. Esta cepa é derivada da cepa trpC2 de *Bacillus subtilis* conhecida (168 Marburg), caracterizada pelo fato de que o gene *purR* codificando o repressor de operon de purina (*purR::spc*), o gene *purA* codificando succinil-AMP sintase (*purA::erm*), e o gene *deoD* codificando nucleosídeo de purina fosforilase (*deoD::kan*) são rompidos (Patente Japonesa acessível ao público

No. 2004-242610, Pedido Publicado de Patente U.S. No. 2004166575 A1), A cepa AJ3772 de *Bacillus subtilis* (FERM P-2555, Patente Japonesa acessível ao público No. 62-014794) e assim por diante também podem ser usadas.

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

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

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

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

Além disso, exemplos de um método para a geração de bactérias *Bacillus* que têm uma capacidade de produzir uma substância derivada de purina também incluem aumentar atividade de uma enzima que está envolvida em biossíntese de purina que é comum à biossíntese de nucleosídeos de purina e nucleotídeos de purina, i.e., enzima de biossíntese de purina, em células bacterianas. A atividade da enzima nas células é preferivelmente aumentada para um nível maior do que aquele de uma cepa não modificada de bactéria *Bacillus*, por exemplo, uma bactéria *Bacillus* tipo selvagem. A frase “atividade é aumentada” abrange, por exemplo, quando número de moléculas de enzima por célula é aumentado, e quando atividade específica por molécula de enzima é aumentada, e assim por diante. Por exemplo, a atividade pode ser aumentada aumentando quantidade de expressão do gene da enzima. Exemplos da enzima envolvida na biossíntese de purina incluem, por exemplo, fosforibosil pirofosfato amidotransferase, fosforibosil pirofosfato sintetase (PRPP sintetase [EC: 2.7.6.1]), e assim por diante.

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

A frase “atividade de fosforibosil pirofosfato sintetase é aumentada” significa que a atividade de fosforibosil pirofosfato sintetase

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

Por outro lado, quando PRPP que é um precursor indispensável para biossínteses de nucleosídeo de purina, histidina e triptofano já está produzido, parte dele é convertido em nucleotídeos de purina e nucleosídeos de purina pelas enzimas envolvidas na biossíntese de purina. Exemplos de genes codificando tais enzimas incluem os genes do operon de purina de *Bacillus subtilis*, especificamente, genes do operon *purEKB-purC(orf)QLF-purMNH(J)-purD* (Ebbole D.J. and Zalkin H., J. Biol. Chem., 1987, 262, 17, 8274-87) (atualmente, também chamado *purEKBCSQLFMNHD*, *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives, Editor in Chief: A.L. Sonenshein, ASM Press, Washington D.C., 2002, número de acesso de GenBank NC\_000964), e os genes do regulon *pur* de *Escherichia coli* (*Escherichia* and *Salmonella*, 2a. ed., Editor in Chief: F.C. Neidhardt, ASM Press, Washington D.C., 1996).

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

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

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

10 Por exemplo, em *Bacillus subtilis* (cepa 168 Marburg de *B. subtilis*, ATCC 6051), a sequência -35 do operon de purina é uma sequência consenso (TTGACA), mas a sequência -10 é TAAGAT, que difere da sequência consenso TATAAT (Ebbole, D.J. e H. Zalickn, J. Biol. Chem., 1987, 262, 8274-8287). Portanto, substituindo a sequência -10 (TAAGAT) por uma sequência consenso, aproximando a sequência -10 (TAAGAT) da  
15 sequência consenso, ou mudando-a para TATAAT, TATGAT ou TAAAAT, a atividade transcricional do operon de purina pode ser aumentada. Uma sequência de promotor pode ser substituída pelo mesmo método que aquele da substituição de gene, que é descrito abaixo.

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

Expressão do repressor de operon de purina (repressor de purina) pode ser diminuída, por exemplo, tratando uma bactéria *Bacillus* com radiação de raio ultravioleta ou mutagênico usado em um tratamento de

mutagênese comum tal como NTG ou EMS e selecionando um mutante mostrando expressão diminuída do repressor de purina pode ser empregado.

Além disso, uma bactéria *Bacillus* com expressão diminuída do repressor de purina também pode ser obtida, por exemplo, além de um  
5 tratamento de mutagênese, substituindo um gene codificando o repressor de purina em um cromossomo (*purR*, Acesso de GenBank NC\_000964, região de codificação corresponde aos nucleotídeos número 54439 a 55293) por um gene correspondente que não funciona normalmente (a seguir, também referido como “gene tipo rompido”) por recombinação homóloga utilizando  
10 uma técnica de recombinação gênica (Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1972); Matsuyama, S. e Mizushima, S., J. Bacteriol., 1985, 162, 1196-1202).

Além disso, uma capacidade de produzir uma substância derivada de purina também pode ser intensificada atenuando a captação de  
15 substâncias derivadas de purina em células. Por exemplo, a captação de nucleosídeos de purina pelas células pode ser atenuada bloqueando uma reação envolvida na captação de nucleosídeos de purina pelas células. Exemplos da reação envolvida na captação de nucleosídeos de purina pelas células incluem reações catalisadas por nucleosídeo permeases.

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

Nucleotídeos de purina biossintetizados a partir de PRPP por  
25 enzimas envolvidas em biossíntese de purina são desfosforilados e com isso convertidos em um nucleosídeo de purina. Para causar eficientemente acumulação de um nucleosídeo de purina, é preferível reduzir atividades de purina nucleosídeo fosforilases, que adicionalmente degradam nucleosídeos de purina em hipoxantina ou os semelhantes. Isto é, é preferível atenuar ou

eliminar uma atividade de uma purina nucleosídeo fosforilase que emprega nucleosídeos de purina tal como inosina, como um substrato.

Especificamente, a atividade de purina nucleosídeo fosforilase pode ser diminuída rompendo os genes *deoD* e *pupG* codificando purina nucleosídeo fosforilase em bactérias *Bacillus*. A bactéria *Bacillus* da presente invenção pode ser modificada rompendo um ou ambos os genes *deoD* e *pupG*. Como os genes *deoD* e *pupG*, por exemplo, aqueles genes derivados de bactérias *Bacillus* (*deoD*; número de acesso de GenBank NC\_000964, região de codificação: 2134672-2135370), *pupG*; número de acesso de GenBank NC\_000964, região de codificação: 2445610-2446422) podem ser usados.

A capacidade de produzir uma substância derivada de purina também pode ser intensificada diminuindo a atividade de succinil-AMP sintase. Exemplos do gene codificando succinil-AMP sintase incluem o gene *purA*. Exemplos do gene *purA* incluem, por exemplo, aqueles tendo a seqüência de nucleotídeos registrada como número de acesso de GenBank NC\_000964 (região de codificação corresponde aos nucleotídeos número 4153460 a 4155749 da fita complementar).

A capacidade de produzir uma substância derivada de purina também pode ser intensificada diminuindo uma atividade de inosina monofosfato (IMP) desidrogenase. Exemplos do gene codificando IMP desidrogenase incluem o gene *guaB*. Exemplos do gene *guaB* incluem, por exemplo, aqueles tendo a seqüência de nucleotídeos registrada como número de acesso de GenBank NC\_000964 (região de codificação corresponde aos números de nucleotídeos 15913 a 17376).

Além disso, como um método para intensificar uma capacidade de produzir substância derivada de purina, amplificação de um gene codificando uma proteína tendo uma atividade de excretar uma substância derivada de purina pode ser contemplada. Um exemplo de uma bactéria na qual um tal gene foi amplificado é uma bactéria *Bacillus* na qual o

gene *rhtA* é amplificado (Patente Japonesa acessível ao público No. 2003-219876).

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

Embora o número do(s) “um ou diversos” resíduos de aminoácidos referidos aqui possam diferir dependendo da posição na estrutura tridimensional ou dos tipos de resíduos de aminoácidos da proteína, especificamente, ele pode ser preferivelmente 1 a 20, mais preferivelmente 1 a 10, ainda mais preferivelmente 1 a 5. A mutação conservativa é uma mutação caracterizado pelo fato de que substituição ocorre mutuamente entre Phe, Trp, e Tyr, se o sítio de substituição é um aminoácido aromático; entre Leu, Ile e Val, se ele é um aminoácido hidrofóbico; entre Gln e Asn, se ele é um aminoácido polar; entre Lys, Arg e His, se ele é um aminoácido básico; entre Asp e Glu, se ele é um aminoácido ácido; e entre Ser e Thr, se ele é um aminoácido tendo um grupo hidroxila. Exemplos típicos de uma mutação conservativa são substituições conservativas, e substituições consideradas substituições conservativas incluem, especificamente, substituição de Ser ou Thr por Ala, substituição de Gln, His ou Lys por Arg, substituição de Glu, Gln, Lys, His ou Asp por Asn, substituição de Asn, Glu ou Gln por Asp, substituição de Ser ou Ala por Cys, substituição de Asn, Glu, Lys, His, Asp ou Arg por Gln, substituição de Gly, Asn, Gln, Lys ou Asp por Glu,

substituição de Pro por Gly, substituição de Asn, Lys, Gln, Arg ou Tyr por His, substituição de Leu, Met, Val ou Phe por Ile, substituição de Ile, Met, Val ou Phe por Leu, substituição de Asn, Glu, Gln, His ou Arg por Lys, substituição de Ile, Leu, Val ou Phe por Met, substituição de Trp, Tyr, Met, Ile ou Leu por Phe, substituição de Thr ou Ala por Ser, substituição de Ser ou Ala por Thr, substituição de Phe ou Tyr por Trp, substituição de His, Phe ou Trp por Tyr, e substituição de Met, Ile ou Leu por Val. As substituições, deleções, inserções, adições, inversões de aminoácidos mencionadas acima ou as semelhantes podem resultar de uma mutação de ocorrência natural ou uma variação devido a uma diferença individual ou diferença de espécie de um microorganismo do qual os genes são derivadas (mutante ou variante). Tais genes podem ser obtidos, por exemplo, modificando uma seqüência de nucleotídeos conhecida de um gene por mutagênese sítio específica de forma que os resíduos de aminoácidos nos sítios específicos da proteína codificada incluem substituições, deleções, inserções, ou adições de resíduos de aminoácidos.

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

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

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

Além disso, os genes podem ser um DNA que pode hibridizar

com uma seqüência complementar de uma seqüência de genes conhecida ou uma sonda que pode ser preparada a partir da seqüência complementar em condições estringentes e codifica uma proteína tendo uma função equivalente àquela do produto de gene conhecido. As “condições estringentes” referidas aqui são condições nas quais um assim chamado híbrido específico é formado, e um híbrido não específico não é formado. Exemplos das condições estringentes incluem aquelas nas quais DNAs altamente homólogos hibridizam uns com os outros, por exemplo, DNAs não menos do que 80% homólogos, preferivelmente não menos do que 90% homólogos, mais preferivelmente não menos do que 95% homólogos, particularmente preferivelmente não menos do que 97% homólogos, hibridizam uns com os outros, e DNAs menos homólogos do que os acima não hibridizam uns com os outros, ou condições de lavagem uma vez, preferivelmente 2 ou 3 vezes, em uma concentração salina e temperatura correspondentes a lavagem de hibridização Southern típica, i.e., 1 x SSC, 0,1% SDS a 60°C, preferivelmente 0,1 x SSC, 0,1% SDS a 60°C, mais preferivelmente 0,1 x SSC, 0,1% SDS a 68°C.

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

## 25 (2-2) Cultura de microorganismo

Usando uma solução de açúcar produzida pelo método da presente invenção ou um produto de fracionamento do mesmo (estes podem ser assim também coletivamente referidos como “sacarídeo”) como uma fonte de carbono, um microorganismo tendo uma capacidade de produzir uma

substância alvo é cultivado, e a substância alvo é coletada a partir do meio ou células microbianas.

Exceto que o sacarídeo acima mencionado é usado como uma fonte de carbono, o mesmo método como para os métodos de fermentação comuns podem ser usados.

Para o método da presente invenção, cultura em batelada, cultura em batelada alimentada ou culturas contínuas podem ser usadas. O sacarídeo obtido pela presente invenção pode estar contido em meio de partida ou meio de alimentação, ou pode estar contido em ambos.

A cultura em batelada alimentada se refere a um método de cultura no qual o meio é continuamente ou intermitentemente alimentado no frasco de cultura, e o meio não é extraído até o fim da cultura. A cultura contínua significa um método no qual o meio é continuamente ou intermitentemente alimentado ao frasco de cultura, e o meio é extraído do frasco (normalmente em um volume equivalente ao volume do meio alimentado) ao mesmo tempo. O “meio de partida” significa o meio usado na cultura em batelada antes de alimentar o meio de alimentação (meio usado no momento do início da cultura), e o meio de alimentação significa um meio para ser fornecido a um tanque de fermentação na cultura em batelada alimentada ou cultura contínua. A cultura em batelada significa um método em que meio novo é preparado para cada cultura, e uma cepa é inoculada no meio, cujo meio não é mudado durante a colheita.

O sacarídeo pode ser usado em qualquer concentração desde que a concentração seja apropriada para produzir uma substância alvo. A concentração do sacarídeo no meio é preferivelmente cerca de 0 a 50 p/v %, mais preferivelmente cerca de 0,1 a 40 peso/v %, particularmente preferivelmente cerca de 0,2 a 20 peso/v %. O sacarídeo produzido pelo método da presente invenção pode ser independentemente usado, ou também pode ser usado em combinação com outras fontes de carbono obtidas por

outros métodos como glicose, frutose, sacarose, melaços morenos, e hidrolisado de amido. Neste caso, o sacarídeo obtido pelo método da presente invenção e outras fontes de carbono podem misturados em uma relação arbitrária. As preferidas como as outras fontes de carbono são os sacarídeos como frutose, sacarose, lactose, galactose, melaços morenos, hidrolisado de amido, e uma solução de açúcar obtida por hidrólise de outra biomassa, álcoois como etanol e glicerol e ácidos orgânicos como ácido fumárico, ácido cítrico e ácido succínico.

Como o meio a ser usado, meios convencionalmente usados na produção de L-aminoácidos por fermentação usando microorganismos podem ser usados, desde que o sacarídeo obtido pelo método da presente invenção seja usado como a fonte de carbono. Isto é, meios convencionais contendo, além da 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, como sulfato de amônio, cloreto de amônio, fosfato de amônio, acetato de amônio, e uréia, nitratos, nitrogênio orgânico como hidrolisado de soja, gás amônia, amônia aquosa, e outros, podem ser usados. Além disso, peptona, extrato de levedura, extrato de carne, extrato de malte, água de maceração de milho, hidrolisado de soja, e assim por diante também podem ser utilizados. O meio pode conter um ou mais tipos destas fontes de nitrogênio. Estas fontes de nitrogênio também podem ser usadas tanto para o meio de partida como o meio de alimentação. Além disso, a mesma fonte de nitrogênio pode ser usada tanto para o meio de partida como o meio de alimentação, ou a fonte de nitrogênio do meio de alimentação pode ser diferente daquela do meio de partida.

O meio 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, di-hidrogenofosfato de potássio, hidrogenofosfato dipotássico, polímeros de fosfato tal como ácido

pirofosfórico, e assim por diante podem ser utilizados. Apesar da fonte de enxofre poder ser qualquer substância contendo átomos de enxofre, sais de ácido sulfúrico, como sulfatos, tiosulfatos, e sulfitos, e aminoácidos contendo enxofre, como cisteína, cistina e glutatona são desejáveis, e sulfato de amônio é especialmente desejável.

Além disso, o meio pode conter um fator promotor de crescimento (um nutriente com um efeito promotor de crescimento), em adição aos componentes acima mencionados. Como o fator promotor de crescimento, metais traço, aminoácidos, vitaminas, ácidos nucleicos assim como peptona, ácido casamino, extrato de levedura, produto de degradação de proteína de soja, e assim por diante contendo as substâncias precedentes podem ser usados. Exemplos dos metais traço incluem ferro, manganês, magnésio, cálcio, e assim por diante. Exemplos das vitaminas incluem vitamina B<sub>1</sub>, vitamina B<sub>2</sub>, vitamina B<sub>6</sub>, ácido nicotínico, nicotinamida, vitamina B<sub>12</sub>, e assim por diante. Estes fatores promotores de crescimento podem estar presentes no meio de partida ou no meio de alimentação.

Além disso, quando um mutante auxotrófico que requer um aminoácido ou os semelhantes para seu crescimento é usado, é preferível suplementar o nutriente requerido para o meio. Em particular, uma vez que uma via biossintética de L-aminoácido é intensificada e uma capacidade de degradar L-aminoácido é freqüentemente atenuada em uma bactéria produtora de L-lisina que pode ser usada para a presente invenção como descrito posteriormente, um ou mais tipos de substâncias selecionadas dentre L-treonina, L-homoserina, L-isoleucina, e L-metionina são preferivelmente adicionadas. O meio de partida e o meio de alimentação podem ter a mesma ou diferente composição de meio. Além disso, o meio de partida e o meio de alimentação podem ser uma concentração de enxofre igual ou diferente. Além disso, quando o meio de alimentação é alimentado em múltiplos estágios, as composições do meio de alimentação alimentado nos estágios podem ser

iguais ou diferentes.

Além disso, o meio usado na presente invenção pode ser ou um meio natural ou um meio sintético, desde que contenha uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio, e outros componentes, como requerido.

5 A cultura é preferivelmente realizada durante 1 a 7 dias sob condições aeróbicas. A temperatura de cultura é 20 a 45°C, preferivelmente 24 a 45°C, particularmente preferivelmente a 33 a 42°C. A cultura é preferivelmente efetuada como cultura de aeração, com o controle da concentração de oxigênio como sendo de cerca de 5 a 50%, desejavelmente  
10 de cerca de 10% da concentração de saturação. Além disso, o pH é preferivelmente controlado como sendo de 5 a 9 durante o cultivo. Para ajustar o pH, substâncias ácidos ou alcalinas, inorgânicas ou orgânicas, como carbonato de cálcio, gás amônia e amônia aquosa podem ser usadas.

Se cultura for efetuada sob tais condições como descrito  
15 acima, preferivelmente por cerca de 10 a 120 horas, uma quantidade acentuada de substância alvo é acumulada no meio de cultura.

Quando um aminoácido básico, como L-lisina é produzido, a produção pode ser efetuada por um método no qual a fermentação é efetuada pelo controle do pH do meio durante a cultura como sendo de 6,5 a 9,0, e o  
20 pH do meio no final da cultura como sendo de 7,2 a 9,0, e o controle da pressão no tanque de fermentação como sendo positivo durante o cultivo, ou pelo fornecimento de gás dióxido de carbono ou um gás misturado contendo gás dióxido de carbono ao meio para proporcionar um período de cultura onde o meio contém 2 g/L ou mais de íons bicarbonato e/ou íons carbonato, de  
25 modo que esses íons bicarbonato e/ou íons carbonato servem como contra-íons de cátions principalmente consistindo de um aminoácido básico, e o aminoácido básico objetivo é a seguir coletado (Patente Japonesa acessível ao público No. 2002-65287, Pedido Publicado de Patente U.S. No. 2002/0025564, EP 1813677 A).

Além disso, na fermentação com o ácido L-glutâmico, a cultura pode ser efetuada com a precipitação do ácido L-glutâmico no meio pelo uso de um meio líquido ajustado para ter uma condição sob a qual o ácido L-glutâmico é precipitado. A condição sob a qual ácido L-glutâmico é precipitado é, por exemplo, de pH 5,0 a 4,0, preferivelmente de pH 4,5 a 4,0, mais preferivelmente pH 4,3 a 4,0, particularmente preferivelmente pH 4,0 (EP 1078989 A).

A coleta da substância alvo do meio de cultura pode ser comumente alcançada por uma combinação de métodos conhecidos, como método da resina de troca iônica e método de precipitação. Quando a substância alvo se acumula nas células, as mesmas podem ser rompidas, por exemplo, com ondas supersônicas ou semelhantes, e a substância alvo pode ser coletada pelo método da resina de troca iônica ou semelhante do sobrenadante obtido pela remoção das células da suspensão de células rompidas por centrifugação. Quando a substância alvo é um aminoácido ou ácido nucleico, a substância alvo a ser coletada pode ser um composto em forma livre, ou pode ser um sal como sulfato, cloridrato, carbonato, sal de amônio, sal de sódio e sal de potássio.

A substância alvo coletada de acordo com a presente invenção pode conter células bacterianas, componentes de meio, umidade e metabólitos de subprodutos do microorganismo além da substância alvo. A pureza da substância alvo coletada é de 50% ou maior, preferivelmente de 85% ou maior, particularmente preferivelmente 95% ou maior (Patente US números 5.431.933, Patente japonesa No. 1214636. Patente US 4.956.471, 4.777.051, 4.946.654, 5.840.358, 6.238.714, Pedido publicado de Patente U.S. 2005/0025878).

### **Exemplos**

A seguir, a presente invenção será mais especificamente explicada com referência aos exemplos. No entanto, a presente invenção não

é limitada por estes exemplos.

#### (1) Preparação de mesocarpo e bagaço triturado

O bagaço foi obtido de uma fábrica de açúcar a partir de cana de açúcar. O bagaço obtido foi esterilizado e então secado. O bagaço pode ser  
5 obtido por processo comum de produção de açúcar a partir de cana de açúcar.

O bagaço seco foi tratado com uma peneira vibratória de malha 20 (0,85mm) para remover a casca, e a casca fibrosa foi ainda removida da fração passada através da peneira para isolar o mesocarpo.

O bagaço triturado foi preparado pelo seguinte procedimento  
10 O bagaço seco foi triturado usando um triturador (moinho automático de sistema Nara, Modelo M-4 (Nara Machinery Co., Ltd.) sob as condições de trituração de velocidade de revolução :5500/min e tela: 0,9 mm. O produto triturado foi peneirado, e uma fração passando através de uma peneira tendo uma malha de 0,35 mm, mas não passando através de uma peneira tendo uma  
15 malha de 0,15 mm foi obtido como um bagaço triturado. Este bagaço triturado foi obtido por pulverização fina de uma mistura de mesocarpo e casca a um tamanho equivalente ao do mesocarpo para comparação com o mesocarpo.

#### (2) Sacarificação por enzima diastática

Como uma enzima diastática, a enzima comercialmente  
20 disponível, Cellic Ctec (Novozyme) foi usada. Esta enzima continha uma celulase derivada de um fungo *Trichoderma*. A 0,1 g do mesocarpo ou do bagaço triturado, 5 ml de ácido acético 100 mM, 0,0286 g ou 0,00286 g de enzima diastática, 0,0025 g de Geneticin (antibiótico), e para o volume da solução de 10 ml foram adicionados e a mistura foi agitada a 50°C e 60 rpm  
25 durante 4 dias para permitir reações. A glicose liberada no sobrenadante de reação foi medida usando um analisador Bio-tech de Asahi Chemical Industry Co., Ltd. Os resultados são mostrados na tabela 1.

Quando o mesocarpo foi sacarificado, glicose pode ser coletada em uma quantidade maior como comparado com a quantidade de

glicose obtida a partir do bagaço triturado, com uma quantidade de enzima correspondendo a 1/10 ou mesmo da quantidade de enzima usada para a sacarificação de bagaço triturado.

Tabela 1

Substrato	Quantidade de enzima	Quantidade glicose produzida	Quantidade glicose produzida por peso unitário de enzima (mg/mg)
Mesocarpo 0,1 g	28,6 mg	12,9 mg	0,45
	2,86 mg	8,6 mg	3,0
Bagaço triturado 0,1 g	28,6 mg	7,4 mg	0,26

## REIVINDICAÇÕES

- 5 1. Método para produzir uma solução de açúcar, caracterizado pelo fato de compreender uma etapa de reagir uma enzima diastática com mesocarpo que foi separado da cana de açúcar em um líquido para produzir sacarídeos.
2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o mesocarpo foi separado do bagaço da cana de açúcar.
- 10 3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o mesocarpo foi obtido por separação do bagaço da cana de açúcar em mesocarpo e casca, e coleta do mesocarpo.
4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a enzima diastática é uma celulase ou uma mistura de uma celulase e uma hemicelulase.
- 15 5. Método para produzir uma substância alvo, caracterizado pelo fato de compreender produzir uma solução de açúcar pelo método como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, e produzir a substância alvo por fermentação usando a solução de açúcar obtida ou um produto de fracionamento da mesma como uma fonte de carbono.
- 20 6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a substância alvo é um L-aminoácido ou um ácido nucleico.

RESUMO

“MÉTODOS PARA PRODUZIR UMA SOLUÇÃO DE AÇÚCAR E PARA PRODUZIR UMA SUBSTÂNCIA ALVO”

5 Uma solução de açúcar é obtida por separação de bagaço de cana de açúcar em mesocarpo e casca, e reagir o mesocarpo com uma enzima diastática como celulase ou uma mistura de celulase de hemicelulase em um líquido para produzir um sacarídeo. Além disso, uma substância alvo como L-aminoácidos e ácidos nucleicos é produzida por fermentação usando a solução de açúcar obtida ou um produto de fracionamento da mesma como uma fonte  
10 de carbono.