



\*PI 04019180\*  
\*PI 04019180\*

**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**  
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR  
**INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

## CARTA PATENTE Nº PI 0401918-0

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0401918-0

(22) Data do Depósito: 04/06/2004

(43) Data da Publicação do Pedido: 28/06/2005

(51) Classificação Internacional: C12N 1/20; C12P 13/22; C12N 15/01; C12N 15/09; C12N 15/67

(30) Prioridade Unionista: 05/06/2003 JP 2003-161181

(54) Título: MÉTODO PARA PRODUZIR UMA SUBSTÂNCIA ALVO, E, ESCHERICHIA COLI

(73) Titular: AJINOMOTO CO., INC.. Endereço: 15-1, Kyobashi 1-Chome, Chuo-Ku, Tóquio, Japão (JP).

(72) Inventor: HISAO ITO; YOKO YAMAMOTO

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 09/12/2014, observadas as condições legais.

Expedida em: 9 de Dezembro de 2014.

Assinado digitalmente por:

**Júlio César Castelo Branco Reis Moreira**  
Diretor de Patentes



“MÉTODO PARA PRODUZIR UMA SUBSTÂNCIA ALVO, E, *ESCHERICHIA COLI*”

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

**Campo da Invenção**

5 A presente invenção refere-se a um método para produzir uma substância alvo por uso de uma bactéria. Mais especificamente, a presente invenção refere-se a um método para melhorar a produção de uma substância alvo como um L-aminoácido, ácido nucleico, antibiótico, vitamina, fator de crescimento ou substância fisiologicamente ativa por uso de uma bactéria.

10 **Descrição da Técnica Relacionada**

A produção de substâncias alvo como L-aminoácidos por fermentação usando microorganismos inclui os seguintes métodos: um método para usar microorganismo de tipo selvagem (cepa de tipo selvagem), um método para usar uma cepa auxotrófica derivada de uma cepa de tipo selvagem, um método para usar um mutante metabolicamente regulado derivado de uma cepa de tipo selvagem como um de vários mutantes resistentes a drogas, um método para usar uma cepa tendo características de tanto a cepa auxotrófica como um mutante metabolicamente regulado, e assim em diante.

20 Em anos recentes, técnicas de DNA recombinante foram usadas para a produção de substâncias alvo por fermentação. Por exemplo, a capacidade de microorganismos de produzir L-aminoácidos pode ser melhorada por melhora de um gene codificando uma enzima de biossíntese de L-aminoácido (patentes US 5 168 056 e 5 776 736), ou por melhora de fluxo de entrada de uma fonte de carbono em um sistema de biossíntese de L-aminoácido (patente US 5 906 925).

Os métodos para melhorar a produção de substâncias alvo em um microorganismo incluem métodos para modificar a captação ou sistema de excreção de uma substância. Os exemplos de um método para modificar

um sistema de captação incluem um método para melhorar uma capacidade de produção de substância alvo por deleção ou degradação de um sistema para captação da substância alvo em uma célula. Especificamente, um método para deletar o operon *gluABCD* ou uma parte do mesmo para deletar ou degradar um sistema de captação de ácido L-glutâmico (EP 1 038 970 A1), um método para atenuar a captação de nucleosídeos purina em uma célula para melhorar a capacidade de produção de nucleosídeo purina (EP 1 004 663 A1) e assim em diante são conhecidos.

Os métodos para modificar um sistema de excreção de um microorganismo incluem um método para melhorar um sistema de excreção para uma substância alvo e um método de deleção ou atenuação de um sistema de excreção para um intermediário ou substrato de um sistema de biossíntese de uma substância alvo. Como o método para melhorar o sistema de excreção de uma substância alvo, por exemplo um método para produzir L-lisina por uso de uma cepa de bactéria *Corynebacterium* em que a expressão de um gene de excreção de L-lisina (*lysE*) é melhorado (WO97/23597) foi descrito. Como para o último método, um método é conhecido para produzir ácido L-glutâmico como uma substância alvo, em que a excreção de um ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, um intermediário de uma substância alvo, é reduzida por mutação ou ruptura de gene  $\alpha$ -cetoglutarato permease (WO01/005959).

Além disso, foi sugerido que o gene codificando a superfamília de cassete de ligação de ATP (transportador de ABC) envolvida na permeação de substâncias através de uma membrana de célula é usada para a criação de microorganismos em que o transporte de aminoácido através da membrana da célula é modificado (WO 00/37647).

Além disso, foi sugerido que o gene codificando enzima PTS de sacarose II, uma proteína envolvida na captação de sacarose em uma célula, é usado em uma bactéria corineforme para a criação de uma cepa

demonstrando melhorada produtividade de um aminoácido, ácido nucleico, etc (EP 1 197 555 A). Além disso, uma técnica para melhorar a produtividade de L-aminoácido de uma bactéria pertencendo ao gênero *Escherichia* usando um grupo de gene PTS de sacarose ou um grupo de gene não PTS (pedido de patente US no. 2001/ 0049126) é também conhecido.

Uma técnica para reduzir a produção de um sub-produto de uma substância alvo por deleção ou atenuação de sistema de biossíntese do sub-produto (por exemplo, "Amino Acid Fermentation" Gakkai Shuppan Center, pág. 4, 1986) é conhecido. No entanto, neste método, quando um microorganismo é cultivado, o sub-produto acima mencionado necessita ser adicionado a um meio em uma quantidade necessária para crescimento.

Mtr (Heatwole, V.M. *et al.*, J. Bacteriol. American Society for Microbiology, 173, pág. 108-115, jan. 1991), e TnaB (Sarsero, J.P. *et al.*, J. Bacteriol. American Society for Microbiology, 173(10), pág. 3231-3234, maio 1991) são conhecidos como sistemas de captação específicos para L-triptofano, e AroP (Mee-Len, C. *et al.*, J. Bacteriol, American Society for Microbiology 167 (2), pág. 749- 753, agosto de 1986) é conhecido como um sistema de captação comum para aminoácidos aromáticos. No entanto, não foi previamente descrito a melhora da produtividade de uma substância alvo por melhora de um sistema de captação para um sub-produto da substância alvo.

### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Um objeto da presente invenção consiste em prover um método para produzir uma substância alvo como um L-aminoácido, antibiótico, vitamina, fator de crescimento ou substância fisiologicamente ativa usando uma bactéria, em que a produção de um subproduto é reduzida, e preferivelmente produção de substância alvo é melhorada.

É um outro objeto da presente invenção prover um método para a produção de uma substância alvo compreendendo uma bactéria que tem a capacidade de produzir a substância alvo em um meio, e coletar a

substância alvo do meio, em que referida bactéria é modificada de modo que o sistema para a captação da célula ou de um subproduto da substância alvo ou um substrato para um sistema de biossíntese da substância alvo é melhorado.

5                   É um outro objeto da presente invenção prover o método descrito acima, em que referido subproduto é selecionado dentre o grupo consistindo de um intermediário em uma via biossintética de referida substância alvo, um substrato em uma via biossintética de referida substância alvo, e um produto de outro sistema de biossíntese se ramificando da referida  
10 via.

                  É um outro objeto da presente invenção prover o método descrito acima, em que a bactéria pertence ao gênero *Escherichia*.

                  É um outro objeto da presente invenção prover o método descrito acima, em que referida substância alvo é L-fenilalanina e referido  
15 subproduto é L-triptofano.

                  É um outro objeto da presente invenção prover o método descrito acima, em que referido sistema pra captação de um subproduto é selecionado dentre o grupo consistindo de Mtr e TnaB.

                  É um outro objeto da presente invenção prover o método  
20 descrito acima, em que a atividade do referido sistema é aumentada por um método selecionado dentre o grupo consistindo de aumento do número de cópias de um gene *mtr* ou gene *tnaB*, e modificar uma seqüência regulatória de expressão de um gene *mtr* ou *tnaB*.

                  É um outro objeto da presente invenção prover o método  
25 descrito acima, em que referido gene *mtr* compreende uma seqüência de DNA selecionada dentre o grupo consistindo da seqüência de DNA que codifica uma seqüência de proteína mostrada em SEQ ID N° 2, a seqüência de DNA mostrada em SEQ ID No. 1, e a seqüência de DNA que codifica uma seqüência de proteína mostrada em SEQ ID No. 2, e que foi modificada para

ter substituições, deleções, inserções ou adições de um ou vários resíduos de aminoácidos em um ou vários sítios e tem, pelo menos, 70% de homologia para a seqüência mostrada em SEQ ID No. 2, em que referido gene *mtr* codifica uma proteína que tem a atividade de uma proteína Mtr.

5                   É um outro objeto da presente invenção prover o método descrito acima, em que referido gene *tnaB* compreende uma seqüência de DNA selecionada dentre o grupo consistindo de seqüência de DNA que codifica uma seqüência de proteína mostrada em SEQ ID No. 4, a seqüência de DNA mostrada em SEQ ID No. 3 e a seqüência de DNA que codifica uma  
10 seqüência de proteína mostrada em SEQ ID No. 4, e que foi modificada para ter substituições, deleções, inserções ou adições de um ou vários resíduos de aminoácidos em um ou vários sítios e tem, pelo menos, 70% de homologia para a seqüência mostrada em SEQ ID No. 4, em que referido gene *tnaB* codifica uma proteína que tem a atividade de uma proteína TnaB.

15                   É um outro objeto da presente invenção prover uma bactéria pertencendo ao gênero *Escherichia*, que tem a capacidade de produzir uma substância alvo e tem uma modificação selecionada dentre o grupo consistindo de melhora de um sistema para captação da célula de um subproduto da substância alvo; e melhora de um sistema para captação de  
20 célula de um substrato para um sistema de biossíntese da substância alvo.

                  É um outro objeto da presente invenção prover a bactéria descrita acima, em que referida substância alvo é L-fenilalanina, e referido subproduto é L-triptofano, e referido sistema para captação da célula é selecionado dentre o grupo consistindo de Mtr e TnaB.

25                   É um outro objeto da presente invenção prover a bactéria descrita acima, em que a atividade de Mtr ou TnaB é aumentada por um método selecionado dentre o grupo consistindo de aumento do número de cópias de um gene *mtr* ou gene *tnaB*, e modificar uma seqüência regulatória de expressão de um gene *mtr* ou gene *tnaB*.

É um outro objeto da presente invenção prover a bactéria ou o método como descrito acima, em que o referido gene *mtr* compreende uma seqüência de DNA selecionada dentre o grupo consistindo de seqüência de DNA que codifica uma seqüência de proteína mostrada em SEQ ID No. 2, a  
5 seqüência de DNA mostrada em SEQ ID No. 1, e a seqüência de DNA que codifica uma seqüência de proteína mostrada em SEQ ID No. 2, e que foi modificada para ter substituições, deleções, inserções ou adições de um ou vários resíduos de aminoácidos em um ou vários sítios e tem, pelo menos, 70% de homologia para a seqüência mostrada em SEQ ID No. 2, em que  
10 referido gene *mtr* codifica uma proteína que tem a atividade de uma proteína Mtr.

É um outro objeto da presente invenção prover o método ou bactéria como descrito acima, em que referido gene *tnaB* compreende uma seqüência de DNA selecionada dentre o grupo consistindo de seqüência de  
15 DNA que codifica uma seqüência de proteína mostrada em SEQ ID No. 4, a seqüência de DNA mostrada em SEQ ID No. 3, e a seqüência de DNA que codifica uma seqüência de proteína mostrada em SEQ ID No. 4, e que foi modificada para ter substituições, deleções, inserções ou adições de um ou vários resíduos de aminoácidos em um ou vários sítios e tem, pelo menos,  
20 70% de homologia para a seqüência mostrada em SEQ ID No. 4, em que o referido gene *tnaB* codifica uma proteína que tem a atividade de uma proteína TnaB.

De acordo com a presente invenção, quando a substância alvo como um L-aminoácido é produzido usando uma bactéria, a produção de um  
25 subproduto pode ser reduzida. De acordo com uma forma de realização preferida da presente invenção, a produção da substância alvo pode ser melhorada.

Além disso, quando uma bactéria é cultivada, nenhuma substância requerida para crescimento precisa ser adicionada ao meio. Além

disso, porque a quantidade de um subproduto no meio pode ser reduzida, a purificação da substância alvo do meio se torna fácil.

### DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO PREFERIDAS

5 Os inventores da presente invenção estudaram com assiduidade a fim de alcançar o objetivo acima. Como resultado, verificou-se que quando uma bactéria foi modificada de modo que um sistema para captação celular de um subproduto de uma substância alvo é melhorado, a produção deste subproduto foi reduzida, e assim obtiveram a presente  
10 invenção.

A bactéria da presente invenção produz uma substância alvo e é modificada de modo que um sistema para captação de célula de ou um subproduto da substância alvo ou de um substrato para um sistema de biossíntese da substância alvo é melhorado. A bactéria da presente invenção  
15 não é particularmente limitada desde que ela produza uma substância alvo e tenha um sistema para captação de célula ou de um subproduto da substância alvo ou de um substrato para o sistema de biossíntese da substância alvo. Além disso, desde que as exigências acima sejam atendidas, a presente invenção também pode ser aplicada a bactérias que não foram previamente  
20 usadas na indústria. A bactéria da presente invenção pode ter uma capacidade inerente para produzir uma substância alvo, ou a capacidade pode ser conferida por criação usando um método de mutação, uma técnica de DNA recombinante ou semelhante.

Os exemplos específicos da bactéria incluem bactéria  
25 pertencendo ao gênero *Escherichia*, como *Escherichia coli.*, bactéria corineforme como *Brevibacterium lactofermentum*, bactéria pertencendo ao gênero *Bacillus* como *Bacillus subtilis*, bactéria pertencendo ao gênero *Serratia*, como *Serratia marcescens*, e assim em diante. No entanto, a bactéria da presente invenção não é limitada a estes exemplos.

A expressão "produzir uma substância alvo" significa que, quando uma bactéria da presente invenção é cultivada em um meio, a bactéria demonstra uma capacidade para produzir a substância alvo em tal quantidade que a substância alvo pode ser coletada das células bacterianas ou do meio.

5 Preferivelmente, significa que a bactéria demonstra uma capacidade para produzir a substância alvo em uma quantidade que é maior do que a produzida por uma cepa de tipo selvagem ou não modificada da bactéria.

A substância alvo produzida pela presente invenção não é particularmente limitada desde que seja uma substância que possa ser  
10 produzida por uma bactéria. Os exemplos das mesmas incluem L-aminoácido, como L-fenilalanina, L-treonina, L-lisina, L-ácido glutâmico, L-leucina, L-isoleucina e L-valina. Além disso, a substância alvo pode ser qualquer uma das substâncias que podem ser biossintetizadas por bactérias incluindo ácidos nucleicos como ácido guanílico e ácido inosínico, vitaminas, antibióticos,  
15 fatores de crescimento, substâncias fisiologicamente ativas, etc, desde que um sistema de secreção exista para um intermediário ou substrato na biossíntese do mesmo. Além disso, a presente invenção pode ser usada para produzir uma substância que não é correntemente produzida por uso de uma bactéria desde que um sistema de captação celular para um subproduto da substância alvo ou  
20 um substrato para um sistema de biossíntese da substância alvo exista.

Os exemplos de bactérias produzindo L-fenilalanina incluem *Escherichia coli* AJ12741 (FERM P-13000, ver patente JP no. 3225597) e AJ12604 (FERM BP- 3579, ver pedido de patente européia acessível ao público 488 424), *Brevibacterium lactofermentum* AJ12637 (FERM BP-  
25 4160, ver pedido de patente francesa acessível ao público 2 686 898) e assim em diante. Além disso, exemplos de bactérias produzindo L-treonina como uma substância alvo incluem *Escherichia coli* VKPM B-3996 (RIA 1867, ver patente US 5 175 107), *Corynebacterium acetoacidophilum* AJ12318 (FERM BP-1172, ver patente US 5 188 949) e assim em diante. Os exemplos de

bactérias produzindo L-lisina incluem *Escherichia coli* AJ11442 (NRRL B-12185, FERM BP-1543, ver patente US 4 346 170), *Brevibacterium lactofermentum* AJ3990 (ATCC 31269, ver patente US 4 066 501) e assim em diante. Os exemplos de bactérias produzindo ácido L-glutâmico incluem

5 *Escherichia coli* Aj12624 (FERM BP-3853, ver pedido de patente francesa acessível ao público 2 680 178), *Escherichia coli* AJ13199 FERM P-15573, ver patente japonesa acessível ao público No. 7-203980), *Brevibacterium lactofermentum* AJ12475 (FERM BP-2922, ver patente US 5 272 067) e assim em diante. Os exemplos de bactérias produzindo L-leucina incluem

10 *Escherichia coli* AJ114878 (FERM P-5274, ver publicação de patente japonesa (Kokoku) no. 62-34397), *Brevibacterium lactofermentum* AJ3718 (FERM P-2516, ver patente US no. 3970 519) e assim em diante. Os exemplos de bactérias produzindo L-isoleucina incluem *Escherichia coli* KX141 (VKPM B-4781, ver pedido de patente européia acessível ao público

15 no. 519 113), *Brevibacterium flavum* AJ12149 (FERM BP- 759, ver patente US 4 656 135) e assim em diante. Os exemplos de bactérias produzindo L-valina incluem *Escherichia coli* VL1970 (VKPM B-4411, ver pedido de patente européia acessível ao público no.519 113), *Brevibacterium lactofermentum* AJ12341 (FERM BP-1763, ver patente US no. 5 188 948) e

20 assim em diante.

Na presente invenção, um "subproduto" de uma substância alvo significa uma substância diferente de substância alvo produzida como um subproduto durante a produção da substância alvo. Além disso, na presente invenção, se a bactéria não é modificada de modo que o sistema de

25 captação para a presente invenção é melhorado, o "subproduto" e o "substrato para o sistema de biossíntese da substância alvo" são secretados e, como resultado, acumulam em um meio quando a bactéria é cultivada, e um sistema para captação do subproduto ou o substrato na bactéria ou a outra bactéria existe.

O termo "substância alvo" e "subproduto" tem conceitos relativos e se a substância é uma substância alvo ou um subproduto depende do objeto a ser produzido. Por exemplo, quando L-fenilalanina deve ser produzida, L-fenilalanina é uma substância alvo e o L-triptofano produzido durante a produção de L-fenilalanina é um subproduto. Quando L-triptofano deve ser produzido, L-triptofano é uma substância alvo e L-fenilalanina produzida durante a produção de L-triptofano é um subproduto.

Os exemplos específicos de um subproduto da presente invenção incluem um intermediário em um via biossintética de uma substância alvo, um produto de outro sistema de biossíntese que se ramifica desta via e assim em diante. O intermediário ou substrato não é limitado a um intermediário ou substrato em um sistema de biossíntese único para a substância alvo, como um precursor, e pode ser um intermediário ou substrato em um sistema de biossíntese ou sistema metabólico de outra substância, por exemplo um intermediário ou substrato do sistema glicolítico quando a substância alvo é L-aminoácido. Abaixo, o acima mencionado "subproduto" ou "substrato" podem ser genericamente referidos como um subproduto, e descrições com relação ao subproduto são similarmente aplicáveis a um substrato.

Na presente invenção, o "sistema para a captação de célula (sistema de captação de células)" refere-se a uma proteína envolvida na captação em uma célula do subproduto acima mencionado, que foi secretado para o lado de fora de uma célula. O sistema de captação pode consistir de uma única proteína ou de duas ou mais proteínas. Além disso, dois ou mais tipos de sistemas de captação podem existir para um único tipo de subproduto.

A expressão "modificado de modo que um sistema de captação é melhorado" significa que a bactéria é modificada de modo que a quantidade de captação ou a taxa de captação do subproduto acima mencionado é

aumentada comparada com as de cepas não modificadas, por exemplo bactérias de tipo selvagem. Por exemplo, se a atividade de uma proteína constituindo o sistema de captação for aumentada como comparada com uma cepa de tipo selvagem ou não modificada por aumento da quantidade ou atividade específica da proteína, o sistema de captação acima mencionado é melhorado. A atividade de uma proteína constituindo o sistema de captação pode ser determinada pelo método descrito em Sarsero, J.P. *et al.*, J. Bacteriol. 177(2), 297-306, 1995, por exemplo quando a proteína é Mtr, TnaB, TyrP, PheP ou AroP. As atividades de NupC e NupG derivados de *Escherichia coli* podem ser determinadas pelo método descrito em J. Bacteriol. 183(16), 4900-4, agosto 2001. A atividade de GluABCD derivada de *Corynebacterium glutamicum* pode ser determinada pelo método descrito em J. Bacteriol. 177(5) 1152-8, março 1995. A atividade de BrnQ derivado de *Corynebacterium glutamicum* pode ser determinada pelo método descrito em Arch. Microbiol. 169(4) 303-12, abril de 1998. As atividades de LivFGHJKM e LivK derivadas de *Escherichia coli* podem ser determinadas pelos métodos descritos em J. Biol. Chem. 15, 265 (20), 11436-43, julho 1990; J. Bacteriol. 116, 1258-66, 1973; e J. Bacteriol. 174(1), 108-15, janeiro 1992. A atividade de LysP derivado de *Escherichia coli* pode ser determinada pelo método descrito em J. Bacteriol. 174 (10), 3242-9, maio de 1992. A atividade de ArtPIQMJ derivado de *Escherichia coli* pode ser determinada pelo método descrito em Mol. Microbiol. 17 (4), 675-86, agosto de 1995.

Como para bactérias de *Escherichia coli*, por exemplo, um exemplo de bactéria tipo selvagem a ser comparado é a cepa MG1655 de *Escherichia coli*.

Os exemplos de combinação de substância alvo, subproduto ou substrato em seu sistema de biossíntese e sistema de captação do mesmo são mostrados na tabela 1.

**Tabela 1**

Bactéria	Substância alvo	Subproduto	Gene de sistema de captação
<i>E. coli</i>	L-fenilalanina, L-tirosina	L-triptofano	<i>Mtr, maB</i>
<i>E. coli</i>	L-fenilalanina, L-triptofano, etc.	L-tirosina	<i>TryP</i>
<i>E. coli</i>	L-tirosina, L-triptofano, etc	L-fenilalanina	<i>PheP</i>
<i>E. coli</i>	Substâncias diferentes de Aminoácidos aromáticos	Aminoácidos aromáticos	<i>AroP, pheP, tyrP</i>
<i>E. coli</i>	Substâncias diferentes de aminoácido ramificado	Aminoácidos ramificados	<i>BrnQ, livFGHJKM</i>
<i>E. coli</i>	Substâncias diferentes de L-lisina	L-lisina	<i>LysP</i>
<i>E. coli</i>	Substância diferente de L-treonina e L-serina	L-treonina, L-serina	<i>TdcC, sdaC</i>
<i>E. coli</i>	Substância diferente de L-arginina	L-arginina	<i>ArtIJMPQ</i>
<i>E. coli</i>	Substância diferente de L-leucina, p.e. L-isoleucina, L-valina etc	L-leucina	<i>LivK</i>
<i>E. coli</i>	Substância diferente de uracila	Uracila	<i>UraA</i>
<i>E. coli</i>	Substâncias diferentes de nucleosídeos	Nucleosídeos	<i>NupC, nupG</i>
Bactérias corineformes	Substâncias diferentes de L-ácido glutâmico, p.e. L-glutamina, etc	L-ácido glutâmico	<i>GluABCD</i>
Bactérias corineformes	Substâncias diferentes de L-lisina	L-lisina	<i>lysI</i>

Um exemplo particularmente preferido de substância alvo da presente invenção é L-fenilalanina. Além disso, um exemplo do subproduto do mesmo é L-triptofano.

- 5 Um exemplo preferido da bactéria pertencendo ao gênero *Escherichia* produzindo L-fenilalanina é *Escherichia coli* Cepa AJ12741. Esta cepa foi construída por introdução de um plasmídeo pMGAL1 em *Escherichia coli* K-12 W3110, cepa que é deficiente nos genes *tyrR* e *tyrA* (W3110(*tyrR*, *tyrA*), /pMGAL1, patente JP no. 3225597). O plasmídeo
- 10 pMGAL1 contém genes codificando 3-deoxi-D-arabino-heptulonato-7-fosfato sintase (DS) para o qual a inibição de retro-alimentação é dessensibilizada, corismato mutase/ pifenato desidratase (CM-PD) para o qual a inibição de retro-alimentação é dessensibilizada e shikimato quinase. Esta cepa foi
- 15 depositada no National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry (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, Tsukubashi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japão) em 11 de junho de 1992, e recebeu um número de acesso de FERM P-13000. Então, ela foi convertida em um depósito internacional sob as provisões do Tratado de Budapeste em 14 de setembro de 1994, e recebeu um número de acesso de FERM BP-4796.

Além disso, a cepa AJ12604 de *Escherichia coli* acima mencionada também é um exemplo preferido de uma bactéria produzindo L-fenilalanina. Esta cepa foi construída por introdução de plasmídeos pBR-aroG4, que contém um gene codificando DS para o qual a inibição de retro-alimentação é dessensibilizada, e pACMAB, que contém um gene codificando CM-PRODUTO para o qual a inibição de retro-alimentação é dessensibilizada, em cepa K12 W3110 de *Escherichia coli* que é deficiente no gene *tryA* (pedido de patente europeia acessível ao público 488 424. Esta cepa foi depositada no National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry (atualmente a agência administrativa independente, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depository) em 28 de janeiro de 1992, e recebeu um número de acesso de FERM P-11975. então, ela foi convertida em um depósito internacional sob as provisões do Tratado de Budapeste em 26 de setembro de 1991, e recebeu um número de acesso de FERM BP-3579.

Os exemplos do sistema de captação de L-triptofano incluem Mtr e TnaB. O gene codificando Mtr (*mtr*) e o gene codificando TnaB (*tnaB*) de *Escherichia coli* já foram relatados (Heatwole, V.M. J. Bacteriol. 173, 108-115, 1991, Sarsero, J.P., J. Bacteriol. 173(10), 3231-3234, 1991). Estes genes podem ser obtidos, por exemplo, por PCR (reação de cadeia polimerase) usando um DNA cromossômico de *Escherichia coli* como um gabarito (Ver White T.J. *et al.*, Trends Genet. 5, 185, 1989). Os exemplos de iniciadores para amplificação de *mtr* incluem oligonucleotídeos tendo as seqüências de

nucleotídeo de SEQ ID No. 5 e 6. Os exemplos de iniciadores para amplificação de *tnaB* incluem oligonucleotídeos tendo as seqüências de nucleotídeos de SEQ ID No. 7 e 8. Os exemplos de fontes de DNA cromossômico incluem uma cepa de tipo selvagem de *Escherichia coli*, por exemplo a cepa W3110 (ATCC39936). Para *tnaB*, porque IS (seqüência de inserção) é inserida na cepa W3110 *tnaB*, e TnaB codificado por este gene não tem atividade (Kamath, A.V. *et al.*, J. Bacteriol. 176 (5), 1546- 1547, 1994), outras cepas bacterianas contendo TnaB funcional são usadas. Os exemplos de fontes para obter *tnaB* incluem a cepa MG1655 de *Escherichia coli* (ATCC700926), cepa JM109 e assim por diante. A cepa W3110 e a cepa MG1655 podem ser obtidas do American Type Culture Collection (10801 University Boulevard, Manassas, VA., 20110- 2209, USA). A cepa JM109 é comercialmente disponível de Takara Shuzo Co. Ltd. Etc.

A seqüência de nucleotídeos de *mtr* e a seqüência de aminoácidos de Mtr codificadas por este gene são mostradas nas SEQ ID N° 1 e 2. A seqüência de nucleotídeos de *tnaB* e a seqüência de aminoácidos de TnaB codificada por este gene são mostradas em SEQ ID No. 3 e 4.

*mtr* ou *tnaB* usados na presente invenção podem codificar Mtr ou TnaB, respectivamente, incluindo substituição, deleção, inserção ou adição de um ou vários resíduos de aminoácidos em um ou vários sítios desde que a atividade da proteína codificada, Mtr ou TnaB, não seja diminuída. O número de "vários" resíduos de aminoácidos usados aqui varia dependendo de posições de resíduos de aminoácidos em estrutura tri-dimensional da proteína e tipos de resíduos de aminoácidos. No entanto, é especificamente de 2 a 30, preferivelmente 2 a 20, mais preferivelmente 2 a 10.

Um DNA codificando uma proteína substancialmente idêntica à Mtr ou TnaB acima mencionados pode ser obtido por modificação da seqüência de nucleotídeo de *mtr* ou *tnaB*. Por exemplo, a mutagênese dirigida ao sítio pode ser empregada de modo que a substituição, deleção, inserção,

adição ou inversão de um resíduo ou resíduos de aminoácido<sup>o</sup>Correm em um sítio específico. Além disso, um DNA modificado como descrito acima também pode ser obtido por um tratamento de mutagênese convencionalmente conhecido. Os exemplos do tratamento de mutagênese incluem um método para o tratamento de um DNA antes do tratamento de mutação *in vitro* com hidroxilamina ou outro e um método para o tratamento de um microorganismo, por exemplo uma bactéria pertencendo ao gênero *Escherichia*, contendo um DNA antes do tratamento da mutação com irradiação de raio ultravioleta ou um agente de mutagênese usado em um tratamento de mutagênese comum como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), EMS e assim em diante.

Um DNA codificando uma proteína substancialmente idêntica a Mtr ou TnaB pode ser obtida por expressão de um DNA incluindo qualquer uma das mutações acima mencionadas em uma célula apropriada, e examinando a atividade do produto de expressão. Além disso, por exemplo, um DNA que é hibridizável com uma sonda tendo uma seqüência de nucleotídeos dos números de nucleotídeo 181 a 1425 de SEQ ID No. 1 (região de codificação de *mtr*) ou a seqüência de nucleotídeos de números de nucleotídeos 91 a 1338 de SEQ ID No. 3 (região de codificação de *tnaB*) ou uma parte destas seqüências sob condições estridentes e codifica uma proteína tendo a mesma atividade que Mtr ou TnaB pode ser obtida de um DNA codificando Mtr ou TnaB tendo uma mutação ou uma célula contendo este DNA. As "condições estridentes" referidas aqui são definidas como condições sob as quais um assim chamado híbrido específico é formado, e um híbrido não específico não é formado. É difícil expressar claramente esta condição por uso de qualquer valor numérico. No entanto, as condições estridentes incluem, por exemplo, condições sob as quais DNAs tendo uma alta homologia, por exemplo DNAs tendo uma homologia de 70% ou mais, preferivelmente 80% ou mais, mais preferivelmente 90% ou mais, mais

preferivelmente 95% ou mais, hibridizam uma com a outra, mas DNAs tendo uma homologia menor do que acima não hibridizam entre si. Alternativamente, as condições estringentes são exemplificadas por condições pelo que DNAs hibridizam um com o outro em uma concentração de sal correspondendo a condições típicas de lavagem para hibridização Southern, isto é, 1 x SSC, 0,1% SDS, preferivelmente 0,1 x SSC, 0,1% SDS a 60°C.

Uma seqüência parcial de seqüência de nucleotídeo de SEQ ID No. 1 ou 3, também pode ser usada como a sonda. Esta sonda pode ser produzida por PCR usando oligonucleotídeos preparados com base na seqüência de nucleotídeo de SEQ ID No. 1 ou 3, como iniciadores e um fragmento de DNA incluindo a seqüência de nucleotídeo de SEQ ID No. 1 ou 3 como um gabarito. Quando um fragmento de DNA tendo um comprimento de cerca de 300 bp é usado como a sonda, as condições de lavagem para hibridização podem ser 2 x SSC, 0,1% SDS a 50°C.

Os exemplos específicos de um DNA codificando uma proteína substancialmente idêntica a Mtr incluem um DNA codificando uma proteína tendo uma homologia de preferivelmente 70% ou mais, mais preferivelmente 80% ou mais, ainda preferivelmente 90% ou mais, mais preferivelmente 95% ou mais, com relação à seqüência de aminoácido de SEQ ID No. 2 e tendo a atividade comparável à de Mtr. Além disso, exemplos específicos de um DNA codificando substancialmente a mesma proteína como TnaB incluem DNA codificando uma proteína tendo homologia de preferivelmente 70% ou mais, mais preferivelmente 80% ou mais, ainda preferivelmente 90% ou mais, mais preferivelmente 95% ou mais, com relação à seqüência de aminoácido de SEQ ID No. 4, e tendo a atividade em um grau comparável ao de TnaB.

Um homólogo de *mtr* ou *tnaB* de outras bactérias pode ser obtido do mesmo modo que como usado para o *mtr* ou *tnaB* acima mencionado de *Escherichia coli*. Além disso, genes codificando sistemas de

captação diferentes de *mtr* ou *tnaB* também podem ser obtidos por PCR a partir de um DNA cromossômico de bactérias usando métodos bem conhecidos e comuns para obter genes.

Um DNA cromossômico pode ser preparado a partir de uma  
5 bactéria como doador de DNA, por, por exemplo, o método de Saito e Miura (ver Saito H, e Miura K, *Biochem. Biophys. Acta*, 72, 619, 1963; Seibutsu Kogaku Jikkensho (Text for Bioengineering Experiments), editado pela Society for Bioscience and Bioengineering, Japão, 97-98, Baifukan, 1992) ou semelhantes.

10 Se um DNA recombinante é preparado por ligação do gene obtido com um DNA vetor autonomamente replicável em uma célula de *Escherichia coli*, e/ou uma bactéria objetiva e introduzido em *Escherichia coli*, operações subseqüentes se tornam mais fáceis. Os exemplos de vetores autonomamente replicáveis em célula de *Escherichia coli* incluem pSTV29,  
15 pUC19, pUC18, pHSG299, pHSG399, pHSG398, RSF1010, pBR322, pACYC184, pMW219 e assim em diante.

Para preparar um DNA recombinante por ligação do gene obtido para um vetor que funciona em uma bactéria objetiva, o vetor pode ser digerido com enzimas de restrição provendo extremidades digeridas se  
20 casando com as extremidades do gene acima mencionado, e o gene acima mencionado e o vetor podem ser ligados por uso de uma ligase como T4 DNA ligase.

Um sistema de captação para um subproduto de uma substância alvo pode ser melhorado por melhora da expressão de um gene  
25 codificando uma proteína que é uma parte do sistema de captação. A quantidade de expressão do gene é aumentada por aumento do número de cópias do gene. Por exemplo, o fragmento de gene acima mencionado pode ser ligado a um vetor que funciona em uma bactéria, preferivelmente um vetor do tipo de múltiplas cópias, para preparar um DNA recombinante, que é

então usado para transformar o hospedeiro produzindo uma substância alvo. Além disso, o DNA recombinante acima mencionado pode ser introduzido em uma bactéria de tipo selvagem para obter uma cepa transformante, e então uma capacidade de produção de substância alvo pode ser conferida à cepa do transformante.

Qualquer um dos métodos de transformação conhecido que foi até agora relatado pode ser empregado para introdução de um DNA recombinante em uma bactéria. Por exemplo, um método de tratamento de células bacterianas recipientes com cloreto de cálcio de modo a aumentar a permeabilidade das células para DNA é conhecida e foi relatada para *Escherichia coli* K-12 (Mandel, M. e Higa, A. J. Mol. Biol. 53, 159, 1970), e um método para preparar células competentes de células que estão em fase de crescimento seguido por introdução de DNA nas mesmas é e também conhecido e foi relatado para *Bacillus subtilis* (Duncan, C.H. Wilson, G.A. e Young, F.E. Gene, 1, 153, 1977). Além disso, um método para fazer células recipientes de DNA em protoplastos ou esferoplastos, que podem facilmente absorver um DNA recombinante, seguido por introdução de DNA recombinante nas células receptoras de DNA, que é conhecido para *Bacillus subtilis*, actinomicetes e leveduras é também conhecido (Chang, S. e Choen, S.N., Molec. Gen. Genet. 168, 111, 1979; Bibb, M.J. Ward, J.M. e Hopwood, O.A. Nature, 274, 398, 1978, Hinnen, A. Hicks J. B. e Fink, G.R. Proc. Natl. Acad. Sci, USA 75, 1929, 1978). A transformação de microorganismos também pode ser realizada pelo método de pulso elétrico (patente japonesa acessível ao público no. 2- 207791).

O número de cópias de um gene também pode ser aumentado ao permitir cópias múltiplas do gene para existir em um DNA cromossômico da bactéria. A fim de introduzir cópias múltiplas do gene no DNA cromossômico, recombinação homóloga pode ser realizada usando uma seqüência que está presente no DNA cromossômico em um número de cópias

múltiplo como uma marcação. Como a seqüência presente em um DNA cromossômico em um número de cópias múltiplo, um DNA repetitivo ou repetição invertida presente na extremidade de um elemento transposável pode ser usado. Alternativamente, como descrito na patente japonesa  
5 acessível ao público no. 2-109985, cópias múltiplas de gene desejado podem ser introduzidas em um DNA cromossômico por incorporação dos mesmos em um transposon e transferindo o mesmo.

Além da amplificação de genes acima mencionada, um sistema de captação também pode ser melhorado por substituição de uma seqüência  
10 regulatória de expressão como um promotor do gene codificando o sistema de captação em um DNA cromossômico ou um plasmídeo por uma mais forte. Por exemplo, o promotor *lac*, promotor *trp*, promotor *trc* e assim em diante são conhecidos como promotores fortes. Além disso, como descrito na publicação de patente internacional WO 00/18935, um promotor também  
15 pode ser modificado por um mais forte por introdução da substituído de vários nucleotídeos na região de promotor do gene. A substituição ou modificação acima mencionada de um promotor melhora a expressão do gene codificando o sistema de captação, e assim o sistema de captação é melhorado. A modificação da seqüência regulatória de expressão pode ser combinada com  
20 aumento do número de cópia do gene.

A substituição da seqüência regulatória de expressão pode ser realizada, por exemplo, do mesmo modo que na substituição de gene usando um plasmídeo sensível a temperatura. Os exemplos de vetores tendo uma origem de replicação sensível a temperatura de *Escherichia coli* inclui, por  
25 exemplo, plasmídeo pMAN997 descrito na publicação internacional WO 99/03988, e assim em diante. Além disso, a substituição da seqüência regulatória de expressão também pode ser realizada por um método usando recombinase Red de fago  $\lambda$  (Datsenko, K.A. PNAS, 97(12), 6640- 6645, 2000).

Além disso como mostrado na seção de exemplo, a substituição da seqüência regulatória de expressão pode também ser realizada por um método em combinação com um sistema utilizando recombinase Red de fago  $\lambda$  e transdução P1 como se segue. Primeiro, a seqüência regulatória de expressão que é obtida por PCR, é introduzida em uma cepa derivada da cepa *E. coli*. W3110 usada para um doador por um método usando recombinase Red de fago  $\lambda$ . Então, a seqüência regulatória de expressão é transduzida em uma cepa de receptor a partir da cepa de doador pela transdução P1. A cepa de doador não está limitada desde que seja um derivado da cepa W3110 e possuir uma seqüência regulatória de expressão substituída.

Além disso, na bactéria da presente invenção, um sistema para captação de uma substância alvo em uma célula pode ser deletado ou degradado. Além disso, um sistema de excreção da substância alvo pode ser melhorado.

A substância alvo pode ser eficazmente produzida por cultivo da bactéria da presente invenção obtida como descrito acima em um meio para provocar o acúmulo da substância alvo no meio e coletar a substância alvo do meio.

A substância alvo da presente invenção pode ser produzida do mesmo modo que é geralmente produzida, exceto que a bactéria da presente invenção é usada. As condições de cultura podem ser selecionadas de modo apropriado dependendo da bactéria.

Por exemplo, o meio pode ser um meio típico contendo uma fonte de carbono, fonte de nitrogênio, íons inorgânicos e outros componentes orgânicos como requerido. Os sacarídeos como glucose, lactose, galactose, fructose, arabinose, maltose, xilose, trehalose, ribose e hidrolisado de amido, álcoois como glicerol, manitol e sorbitol e ácidos orgânicos como ácido glucônico, ácido fumárico, ácido cítrico, e ácido succínico podem ser usados como a fonte de carbono. Os sais de amônio inorgânicos como sulfato de amônio, cloreto de amônio, e fosfato de amônio, nitrogênio orgânico como

hidrolisado de soja, gás amônia, amônia aquosa e outros podem ser usados como a fonte de nitrogênio. Como para nutrientes de traço orgânicos, prefere-se adicionar as substâncias requeridas, por exemplo, vitaminas, como vitamina B1, ácidos nucleicos como adenina e RNA, extrato de levedura e outros em  
5 quantidades apropriadas. Além destas substâncias, quantidades pequenas de fosfato de cálcio, sulfato de magnésio, íon ferro, íon manganês e outros são adicionados como requerido. Se a bactéria da presente invenção for deficiente em gene *tyrA*, L-tirosina requerida para crescimento é adicionada ao meio.

No caso de *Escherichia coli*, por exemplo, a cultura é  
10 preferivelmente realizada sob condições aeróbicas durante cerca de 16 a 72 h. A temperatura da cultura é controlada para ser 30 a 45°C, e pH controlado a 5 a 8 durante a cultura. As substâncias inorgânicas ou orgânicas, ácidas ou alcalinas, assim como gás amônia e outros podem ser usados para ajustar o pH.

A coleta de substância alvo do meio pode ser realizada usando  
15 uma combinação de métodos bem conhecidos na técnica. Estes métodos tipicamente usam resinas de troca de íons, precipitação e outros dependendo da substância alvo.

### Exemplos

A presente invenção será explicada mais especificamente, com  
20 referência aos exemplos não limitativos.

#### Exemplo 1

<Construção de plasmídeo transportando gene *mtr* e plasmídeo transportando gene *maB*>

(1) Construção de plasmídeo transportando gene *mtr*

25 PCR foi realizado usando DNA cromossômico de *Escherichia coli* cepa W3110 como um gabarito e oligonucleotídeos tendo as seqüências de nucleotídeo de SEQ ID No. 5 e 6 como iniciadores. PCR foi realizada usando LATaq (Takara Shuzo) com um ciclo de 94°C durante 2 min (1 ciclo) seguido por 30 ciclos de 94°C durante 30 s, 55°C durante 30 s e 72°C durante

1 min 30 segundos. Um fragmento amplificado de cerca de 1,5 kb, incluindo um promotor e ORF de *mtr* foi obtido.

O fragmento acima amplificado foi purificado usando colunas MicroSpins<sup>®</sup> S400HR (Amarsham Pharmacia Biotech Inc.), então digerido com *SacI* e *KpnI* e ligado a pSTV28 e pSTV29 (Takara Shuzo) que foi  
5 similarmente digerido com *SacI* e *KpnI*. As células competentes de *Escherichia coli* JM 109 (Takara Shuzo) foram transformadas com esta mistura de reação. Os transformantes foram cultivados em uma placa LB contendo cloranfenicol, IPTG e X-Gal. As colônias brancas foram  
10 selecionadas. Plasmídeos transportando *mtr* pSTV28*mtr* e pSTV29*mtr* foram obtidos dos transformantes selecionados.

Em pSTV28*mtr*, o gene *mtr* foi inserido na mesma direção que o promotor lac. Por outro lado, em pSTV29*mtr*, o gene *mtr* foi inserido na direção oposta com relação ao promotor lac.

## 15 (2) Construção de plasmídeo transportando gene *tnaB*

PCR foi realizado usando DNA cromossômico de *Escherichia coli* cepa MG1655 como um gabarito e oligonucleotídeos tendo as seqüências de nucleotídeo de SEQ ID No. 7 e 8 como iniciadores. PCR foi realizada usando LATaq (Takara Shuzo) com um ciclo de 94°C durante 2 min (1 ciclo)  
20 seguido por 30 ciclos de 94°C durante 30 s, 55°C durante 30 s e 72°C durante 1 min 30 segundos. Um fragmento amplificado de cerca de 1,5 kb, incluindo ORF de *tnaB* foi obtido. *tnaB* formou um operon com *tnaA*, e nenhum promotor existia imediatamente a montante de *tnaB*.

O fragmento acima amplificado foi purificado usando colunas  
25 MicroSpins<sup>®</sup> S400HR (Amarsham Pharmacia Biotech Inc.), então digerido com *Sall* e *PstI* e ligado a pSTV28 e pSTV29 (Takara Shuzo) que foi similarmente digerido com *Sall* e *PstI*. As células competentes de *Escherichia coli* JM 109 (Takara Shuzo) foram transformadas com esta mistura de reação. Os transformantes foram cultivados em uma placa LB contendo cloranfenicol,

IPTG e X-Gal e as colônias brancas foram selecionadas. Plasmídeos transportando *tnaB* pSTV28*tnaB* e pSTV29*tnaB* foram obtidos dos transformantes selecionados.

Em pSTV28*tnaB*, o gene *tnaB* foi inserido na mesma direção que o promotor lac. Por outro lado, em pSTV29*tnaB*, o gene *tnaB* foi inserido na direção oposta com relação ao promotor lac.

<2> Construção de cepas melhoradas de *mtr* e *tnaB* e produção de L-fenilalanina

(1) Os plasmídeos acima mencionados pSTV28*mtr*, pSTV29*mtr*, pSTV28*tnaB* e pSTV29*tnaB* foram introduzidos em bactéria produzindo L-fenilalanina de *Escherichia coli*, a cepa AJ12741 (ver patente JP no. 3225597 a seguir também referida como "cepa R/GAL") em um modo convencional para obter R/GAL/pSTV28*mtr*, R/GAL/pSTV29*mtr*, R/GAL/pSTV28*tnaB* e R/GAL/pSTV29*tnaB*. As capacidades produtoras de L-fenilalanina destes transformantes e a cepa R/GAL foram então avaliadas.

20 ml de um meio tendo a seguinte composição foi introduzido em um frasco Sakaguchi (500 ml) e cada cepa bacteriana foi inoculada e cultivada a 37°C até toda a glucose ser consumida. As quantidades de L-fenilalanina (L-Phe) e L-triptofano (L-Trp) que tinham acumulado no meio após a cultura, foram medidas. Os resultados são mostrados na tabela 2.

Composição do meio (pH 7,0):

Glucose	40 g/l
Heptaidrato de sulfato de magnésio	1 g/l
Sulfato de amônio	16 g/l
Di-hidrogeno fosfato de potássio	1 g/l
Extrato de levedura	2 g/l
Heptaidrato de sulfato de ferro (I)	10 mg/l
Tetra- ou pentaidrato de sulfato de manganês	8 mg/l
L-tirosina	125 mg/l
Ampicilina	50 mg/l
Cloranfenicol	50 mg/l
(não adicionado para a cepa R/GAL)	
Carbonato de cálcio	30 g/l

**Tabela 2**

Cepa bacteriana	L-Phe (g/l)	L-Trp (mg/l)
R/GAL	6,8	60
R/GAL/pSTV28mtr	6,6	<1,5
R/GAL/pSTV29mtr	6,7	<1,5
R/GAL/pSTV28tnaB	6,6	<1,5
R/GAL/pSTV29tnaB	6,7	<1,5

Como mostrado na tabela 2, cepa R/GAL produziu L-triptofano como um subproduto. No entanto, as cepas melhoradas com *mtr* e cepas melhoradas com *tnaB* não produzem L-triptofano como um subproduto, e foram capazes de causar acúmulo de L-fenilalanina em uma quantidade comparável com a obtida com a cepa R/GAL.

### Exemplo 2

<1> Construção de cepa melhorada em promotor de gene *mtr* e cepa melhorada em promotor de gene *tnaB*

10 Por uso de um método que combine um sistema usando recombinase Red de fago  $\lambda$  (Datsenko, K.A. PNAS, 97(12), 6640- 6645, 2000) e transdução P1, o promotor  $P_L$  do fago  $\lambda$  foi inserido nas regiões de codificação do gene *mtr* e o gene *tnaB* no cromossomo *Escherichia coli* para construir uma cepa melhorada em promotor de gene *mtr* e cepa melhorada em  
15 promotor de gene *tnaB*

Primeiro, uma seqüência *attR* derivada de fago  $\lambda$  (1), um gene *cat* derivado de Tn9 (2), uma seqüência de promotor de Pa2 derivada de fago T7 (3), uma seqüência de gene *tet* derivada de pBR322, (uma seqüência parcial) (4), e uma seqüência *attL* derivada de fago  $\lambda$  (5) foram, cada,  
20 amplificadas por PCR. O fragmento (1) foi amplificado usando DNA  $\lambda$  como um gabarito e (1)f (SEQ ID No. 9) e (1)r (SEQ ID No. 10) como iniciadores. O fragmento (2) foi amplificado usando DNA cromossômico de *E. coli* tendo Tn9 como GM2159 e GM2150 como um gabarito, e (2)f (SEQ ID No. 11) e (2)r (SEQ ID No. 12) como iniciadores. O fragmento (3) foi amplificado  
25 usando DNA de fago T7 como um gabarito e (3)f (SEQ ID No. 13) e (3)r (SEQ ID No. 14) como iniciadores. O fragmento (4) foi amplificado usando

pBR322 como um gabarito, e (4) f (SEQ ID No. 15) e (4) r (SEQ ID No. 16) como iniciadores. O fragmento (5) foi amplificado usando DNA  $\lambda$  como um gabarito e (5) f (SEQ ID No. 17) e (5)r (SEQ ID No. 18) como iniciadores. Os acima mencionados GM2159 e GM2150 podem ser obtidos de *E. coli* Genetic Stock Center (Yale University, Dep. Biology, Osborn Memorial Labs. PO. Box 6666, New Haven, CT, USA 06511-7444).

Além disso, uma seqüência de terminador de operon *thr* (58 bp) (6) foi obtida por recombinação de DNAs sintéticos (6)f (SEQ ID No. 19) e (6)r (SEQ ID No. 20).

10 PCR de cruzamento foi realizado usando cada um dos fragmentos obtidos como na tabela 3, para obter um fragmento de DNA (a seguir, referido como "fragmento A") ao qual os fragmentos (1), (6), (2), (3), (4) e (5) foram ligados.

**Tabela 3**

Gabarito	Iniciador	Fragmento obtido
(1) e (6)	(1)f e (6)r2	(1) + (6)
(2) e (3)	(2)f e (3)r	(2) + (3)
(4) e (5)	(4)f e (5)r	(4) + (5)
(1) + (6) e (2) + (3)	(1)f e (3)r	(1) + (6) + (2) + (3)
(1) + (6) + (2) + (3) e (4) + (5)	(1)f e (5)r	(1) + (6) + (2) + (3) + (4) + (5)

15 Subseqüentemente, a seqüência de promotor  $P_L$  (seqüência SD existente a montante de *lacZ* é adicionada) foi amplificada por PCR usando DNA  $\lambda$  como um gabarito e um iniciador P1 (SEQ ID No. 21) e P2mtr (incluindo a seqüência ORF *mtr* de 36 bp, SEQ ID No. 22) ou P2tnab (incluindo a seqüência ORF *tnaB* de 36 bp, SEQ ID No. 23), PCR de  
20 cruzamento foi realizado usando este fragmento amplificado e fragmento A como gabaritos e um iniciador (1)fmtr (SEQ ID No. 24) ou (1)ftnab (SEQ ID No. 25) incluindo uma seqüência (36 bp) de uma região a montante de ORF do gene *mtr* ou o gene *tnaB* e o iniciador P2mtr ou P2tnab. Cada fragmento amplificado incluía uma seqüência de uma região a montante do gene *mtr* ou o gene *tnaB* e uma seqüência interna de ORF em ambas as extremidades. As  
25 seqüências de nucleotídeos destes fragmentos de DNA são mostradas em SEQ

ID No. 26 e 27. As estruturas dos fragmentos de DNA são mostradas na tabela 4.

**Tabela 4**

Posição em SEQ ID No. 26 ou 27	Componentes
1 a 36	Seqüência a montante de <i>gene mtr</i> ou <i>gene mtr</i>
37 a 202	<i>AttR</i> de fago $\lambda$
203 a 260	Terminador operon <i>thr</i> de <i>E. coli</i> K12
261 a 1043	Gene <i>cat</i> de Tn9
1043 a 1175	Promotor de <i>gene</i> prematuro (Pa2) de fago T7
1176 a 1521	Seqüência de <i>gene tet</i> derivada de pBR322
1522 a 1666	<i>AttL</i> de fago $\lambda$
1671 a 1933	Promotor $P_L$ de fago $\lambda$
1934 a 3178 ou 3181	<i>gene mtr</i> ou <i>gene tnaB</i>

Cada um dos fragmentos de DNA acima foi introduzido em um modo convencional na cepa TD-18, que é um derivado de *E. coli*. K-12 W3110, em que um plasmídeo auxiliar pKD46 foi previamente introduzido. pKD46 é conhecido como expressando recombinase Red de fago  $\lambda$  (PNAS, 97(12), 6640- 6645, 2000). Após ocorrer a substituição de gene, o plasmídeo pKD46 foi deletado dos transformantes.

Porque as cepas transformadas demonstram resistência a cloranfenicol, a desejada cepa melhorada em promotor de *gene mtr* ou *gene tnaB* pode ser selecionada de modo eficaz usando este marcador.

Então, as cepas melhoradas em promotor de *gene mtr* ou *gene tnaB* acima mencionadas foram infectadas com fago P1. Usando cada uma das cepas infectadas por fago P1 como um doador para transdução P1, uma região a montante do *gene mtr* ou *gene tnaB* ORF de bactéria produtora de L-fenilalanina, AJ12741 (cepa R/GAL) foi substituída com o promotor  $P_L$  pela transdução P1 usando resistência a cloranfenicol como um índice. Foi confirmado por PCR que a substituição de gene desejado ocorreu.

Ao introduzir cada fragmento de DNA amplificado pelo método acima mencionado em uma bactéria produzindo L-fenilalanina, a cepa AJ12741 (cepa R/GAL) como um hospedeiro, uma cepa bacteriana em que uma região a montante do ORF *gene mtr* ou *gene tnaB* é substituída com o promotor  $P_L$ , pode ser obtida.

<2> Produção de L-fenilalanina por cepa melhorada no promotor de *gene mtr*

e cepa melhorada no promotor de gene *tnaB*

A cepa R/GAL (RM11) em que a região a montante do ORF do gene *mtr* foi substituída com o promotor P<sub>L</sub> e a cepa R/GAL (Rtp32) em que uma região a montante do ORF do gene *tnaB* foi substituída com o promotor P<sub>L</sub>, foram obtidas como descrito acima. Estas cepas bacterianas foram cultivadas do mesmo modo que no exemplo 1 para produzir L-fenilalanina e as quantidades de L-fenilalanina e L-triptofano no meio foram medidas. Os resultados são mostrados na tabela 5.

**Tabela 5**

Cepa bacteriana	L-Phe (g/l)	L-Trp (mg/l)
R/GAL	6,8	60
RM11	6,9	<1,5
Rtp22	7,1	<1,5

Como na tabela 5, a cepa R/GAL produziu L-triptofano como um subproduto. No entanto, a cepa melhorada em promotor *mtr* RM11 e a cepa melhorada em promotor *tnaB* Rtp32 não produziram L-triptofano como um subproduto e acumularam L-fenilalanina em uma quantidade comparável com a obtida com a cepa R/GAL.

Apesar da invenção ter sido descrita em detalhes com referência a formas de realização preferidas da mesma, será evidente para os versados que várias mudanças podem ser feitas, e equivalentes empregados, sem sair do escopo da invenção. Cada um dos documentos acima mencionados, assim como documento de prioridade no estrangeiro, JP 2003-161181, é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Ajinomoto Co., Inc.  
 <120> Método para a produção de uma substância de marcação  
 <130> OP-C4047  
 <150> JP 2003-161181  
 <151> 05-06-2003  
 <160> 27  
 <170> PatentIn version 3.0  
 <210> 1  
 <211> 1550  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli  
 <220>  
 <221> CDC  
 <222> (181)..(1425)  
 <400> 1

```

cgtcgctggtt icgggggga igcglaaica tgcgigaaca gcgaacacaa tcigtaaaat      60
aatatataca gccccgattt ttaccatcgg ggcctttttt ctgctttttg tactcglgta      120
ctggtacagt gcaalgcaaa acaacgcagt cgcactattt ttcactggag agaagccctc      180
atg gca aca cta acc acc acc caa acg tca ccg tcg ctg cti ggc ggc      228
Met Ala Thr Leu Thr Thr Thr Gln Thr Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly
1           5           10           15
gig gig att atc ggc ggc acc att att ggc gca ggg atg ttt tct ctg      276
Val Val Ile Ile Gly Gly Thr Ile Ile Gly Ala Gly Met Phe Ser Leu
20           25           30
cca gig gtc atg tcc ggg gcg tgg ttt ttc tgg tca atg gcg gcg ctg      324
Pro Val Val Met Ser Gly Ala Trp Phe Phe Trp Ser Met Ala Ala Leu
35           40           45
atc ttt acc tgg ttc tgt atg ctg cat tcc ggc ttg atg att ctg gaa      372
Ile Phe Thr Trp Phe Cys Met Leu His Ser Gly Leu Met Ile Leu Glu
50           55           60
gct aac ctg aat tac aga atc ggt tcg agt ttt gac acc atc acc aaa      420
Ala Asn Leu Asn Tyr Arg Ile Gly Ser Ser Phe Asp Thr Ile Thr Lys
65           70           75           80
gat ttg ctg ggc aaa ggc tgg aac gig gtc aac ggc att tcc att gcc      468
Asp Leu Leu Gly Lys Gly Trp Asn Val Val Asn Gly Ile Ser Ile Ala

```

	85	90	95	
t t t g t g c t c t a t a t c c t g a c c t a t g c c t a t a t t t c t g c c a g t g g t t c g				516
Phe Val Leu Tyr Ile Leu Thr Tyr Ala Tyr Ile Ser Ala Ser Gly Ser				
	100	105	110	
a t t c t g c a t c a c a c c t t c g c a g a g a i g t c a c t a a a c g t c c g g c a c g g				564
Ile Leu His His Thr Phe Ala Glu Met Ser Leu Asn Val Pro Ala Arg				
	115	120	125	
g c g g c g g g t t t t g g t t t t g c a t t g c t g g t a g c g t t t g i g g t g t g g g t t g				612
Ala Ala Gly Phe Gly Phe Ala Leu Leu Val Ala Phe Val Val Trp Leu				
	130	135	140	
a g c a c t a a a g c c g t c a g t c g c a i g a c a g c g a t t g t g c t g g g g c g a a a				660
Ser Thr Lys Ala Val Ser Arg Met Thr Ala Ile Val Leu Gly Ala Lys				
	145	150	155	160
g t c a t t a c c t t c t t c c t c a c c t t t g g t a g c c t g c t g g g c a t g t g c a g				708
Val Ile Thr Phe Phe Leu Thr Phe Gly Ser Leu Leu Gly His Val Gln				
	165	170	175	
c c t g c g a c a t t g t t c a a c g t c g c c a a g c a a t g c g t c t t a t g c a c c g				756
Pro Ala Thr Leu Phe Asn Val Ala Glu Ser Asn Ala Ser Tyr Ala Pro				
	180	185	190	
t a t c t g t t g a t g a c c c t g c c g t t c t g t c t g c a t c g t t t g g t t a t c a c				804
Tyr Leu Leu Met Thr Leu Pro Phe Cys Leu Ala Ser Phe Gly Tyr His				
	195	200	205	
g g t a a c g t g c c a a g c c t g a t g a a g t a t t a c g g c a a a g a t c c g a a a a c c				852
Gly Asn Val Pro Ser Leu Met Lys Tyr Tyr Gly Lys Asp Pro Lys Thr				
	210	215	220	
a t c g t g a a a t g t c t g g t g t a c g g t a c g c t g a t g c g c t g g c g t g t a t				900
Ile Val Lys Cys Leu Val Tyr Gly Thr Leu Met Ala Leu Ala Leu Tyr				
	225	230	235	240
a c c a t c t g g t t g c t g g c g a c g a i g g g t a a c a t c c c g c g t c c g g a g t t t				948
Thr Ile Trp Leu Leu Ala Thr Met Gly Asn Ile Pro Arg Pro Glu Phe				
	245	250	255	
a t c g g t a t t g c a g a g a a g g g c g g t a a t a t t g a t g t g c t g g t a c a g c g c				996
Ile Gly Ile Ala Glu Lys Gly Gly Asn Ile Asp Val Leu Val Gln Ala				
	260	265	270	
t t a a g c g g c g t a c t g a a c a g c c g t a g t c t g g a t c t g c t g c t g g t c g t g				1044
Leu Ser Gly Val Leu Asn Ser Arg Ser Leu Asp Leu Leu Leu Val Val				
	275	280	285	
t t c t c a a a c t t t g c g g t a g c g a g t t c g t t c c t c g g c g t a a c g c t g g g t				1092
Phe Ser Asn Phe Ala Val Ala Ser Ser Phe Leu Gly Val Thr Leu Gly				
	290	295	300	
t t g t t t g a c t a t c t g g c a g a t c t g t t t g g t t t c g a c g a c t c g g c t g t g				1140
Leu Phe Asp Tyr Leu Ala Asp Leu Phe Gly Phe Asp Asp Ser Ala Val				
	305	310	315	320
g g c c g c t t g a a a a c g g c a t t g c t g a c c t t t g c c c c g c c a g t t g t g g g				1188
Gly Arg Leu Lys Thr Ala Leu Leu Thr Phe Ala Pro Pro Val Val Gly				

	325	330	335	
	egg ctg ttg ttc ccg aac gga ttc ctg tac gcc att ggt tat gct ggt			1236
	Gly Leu Leu Phe Pro Asn Gly Phe Leu Tyr Ala Ile Gly Tyr Ala Gly			
	340	345	350	
	tta gcg gct acc atc tgg gcg gca att gtt ccg gcg ctg tta gcc cgt			1284
	Leu Ala Ala Thr Ile Trp Ala Ala Ile Val Pro Ala Leu Leu Ala Arg			
	355	360	365	
	gca tcg cgt aaa cgc ttt ggc agc ccg aaa ttc cgc gtc tgg ggt ggc			1332
	Ala Ser Arg Lys Arg Phe Gly Ser Pro Lys Phe Arg Val Trp Gly Gly			
	370	375	380	
	aag ccg atg att gcg ctg att ctg gtg ttt ggc gtc ggc aac gca ctg			1380
	Lys Pro Met Ile Ala Leu Ile Leu Val Phe Gly Val Gly Asn Ala Leu			
	385	390	395	400
	gtg cat att tta tcg agc ttt aat tta ctg ccg gtg tat cag taa			1425
	Val His Ile Leu Ser Ser Phe Asn Leu Leu Pro Val Tyr Gln			
	405	410		
	tcagcggigc cttatccgac atttctgctg cctacacaat gccctgaigcg ctitcgcttat			1485
	caggctctatg taggacagcg ttgccagctc ggataaggct tcccgcgltta agacacacta			1545
	tccca			1550

&lt;212&gt; 2

&lt;211&gt; 414

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;400&gt; 2

Met	Ala	Thr	Leu	Thr	Thr	Thr	Gln	Thr	Ser	Pro	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly
1			5						10					15	
Val	Val	Ile	Ile	Gly	Gly	Thr	Ile	Ile	Gly	Ala	Gly	Met	Phe	Ser	Leu
			20				25							30	
Pro	Val	Val	Met	Ser	Gly	Ala	Trp	Phe	Phe	Trp	Ser	Met	Ala	Ala	Leu
			35				40							45	
Ile	Phe	Thr	Trp	Phe	Cys	Met	Leu	His	Ser	Gly	Leu	Met	Ile	Leu	Glu
			50			55					60				
Ala	Asn	Leu	Asn	Tyr	Arg	Ile	Gly	Ser	Ser	Phe	Asp	Thr	Ile	Thr	Lys
					70					75					80
Asp	Leu	Leu	Gly	Lys	Gly	Trp	Asn	Val	Val	Asn	Gly	Ile	Ser	Ile	Ala
					85					90					95
Phe	Val	Leu	Tyr	Ile	Leu	Thr	Tyr	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser
					100					105					110
Ile	Leu	His	His	Thr	Phe	Ala	Glu	Met	Ser	Leu	Asn	Val	Pro	Ala	Arg
					115					120					125
Ala	Ala	Gly	Phe	Gly	Phe	Ala	Leu	Leu	Val	Ala	Phe	Val	Val	Trp	Leu
					130					135					140
Ser	Thr	Lys	Ala	Val	Ser	Arg	Met	Thr	Ala	Ile	Val	Leu	Gly	Ala	Lys



ttaatactac agagtggcta taaggatggt agccactctc ttaccctaca tcctcaataa 60

caaaaatagc cticcicfaa aggtggcatc atg act gat caa gct gaa aaa aag	114
Met Thr Asp Gln Ala Glu Lys Lys	
1 5	
cac tct gca ttt tgg ggt gtt atg gtt ala gca ggt aca gla att ggt	162
His Ser Ala Phe Trp Gly Val Met Val Ile Ala Gly Thr Val Ile Gly	
10 15 20	
gga ggt atg ttt gct tta cct gtt gat ctt gcc ggt gcc tgg ttt ttc	210
Gly Gly Met Phe Ala Leu Pro Val Asp Leu Ala Gly Ala Trp Phe Phe	
25 30 35 40	
igg ggt gcc ttt atc ctt atc att gcc tgg ttt tca atg ctt cat tcc	258
Trp Gly Ala Phe Ile Leu Ile Ile Ala Trp Phe Ser Met Leu His Ser	
45 50 55	
ggg tta ttg tta tta gaa gca aat tta aat tat ccc gtc ggc tcc agt	306
Gly Leu Leu Leu Leu Glu Ala Asn Leu Asn Tyr Pro Val Gly Ser Ser	
60 65 70	
ttt aac acc atc acc aaa gat tta atc ggt aac acc tgg aac att atc	354
Phe Asn Thr Ile Thr Lys Asp Leu Ile Gly Asn Thr Trp Asn Ile Ile	
75 80 85	
agc ggt att acc gtt gcc ttc gtt ctc tat atc ctc act tat gcc tat	402
Ser Gly Ile Thr Val Ala Phe Val Leu Tyr Ile Leu Thr Tyr Ala Tyr	
90 95 100	
atc tct gct aat ggt gcg atc att agt gaa acg ala tca atg aat ttg	450
Ile Ser Ala Asn Gly Ala Ile Ile Ser Glu Thr Ile Ser Met Asn Leu	
105 110 115 120	
ggt tat cac gct aat cca cgt att gtc ggg atc tgc aca gcc att ttc	498
Gly Tyr His Ala Asn Pro Arg Ile Val Gly Ile Cys Thr Ala Ile Phe	
125 130 135	
glt gcc agc gla ttg tgg tta agt tgg tta gcc gcc agt cgt att acc	546
Val Ala Ser Val Leu Trp Leu Ser Ser Leu Ala Ala Ser Arg Ile Thr	
140 145 150	
tca ttg ttc ctc ggg ctg aag att atc tcc ttt gtg atc gtg ttt ggt	594
Ser Leu Phe Leu Gly Leu Lys Ile Ile Ser Phe Val Ile Val Phe Gly	
155 160 165	
tct ttt ttc ttc cag gtc gat tac tcc att ctg cgc gac gcc acc agc	642
Ser Phe Phe Phe Gln Val Asp Tyr Ser Ile Leu Arg Asp Ala Thr Ser	
170 175 180	
tcc act gcg gga acg tct tac ttc ccg tat atc ttt atg gct ttg ccg	690
Ser Thr Ala Gly Thr Ser Tyr Phe Pro Tyr Ile Phe Met Ala Leu Pro	
185 190 195 200	
gtg tgt ctg gcg tca ttt ggt ttc cac ggc aat att ccc agc ctg att	738
Val Cys Leu Ala Ser Phe Gly Phe His Gly Asn Ile Pro Ser Leu Ile	
205 210 215	
att tgc tat gga aaa cgc aaa gat aag tta atc aaa agc gtg gla ttt	786
Ile Cys Tyr Gly Lys Arg Lys Asp Lys Leu Ile Lys Ser Val Val Phe	
220 225 230	

ggl tcg ctg ctg gcg ctg gfg att tat ctc ttc tgg ctc tai tgc acc 834  
 Gly Ser Leu Leu Ala Leu Val Ile Tyr Leu Phe Trp Leu Tyr Cys Thr  
           235                                  240                                  245  
 atg ggg aat att ccg cga gaa agc ttt aag gcg att atc tcc tca ggc 882  
 Met Gly Asn Ile Pro Arg Glu Ser Phe Lys Ala Ile Ile Ser Ser Gly  
           250                                  255                                  260  
 ggc aac gtt gat tcg ctg gfg aaa tcg ttc ctc ggc acc aaa cag cac 930  
 Gly Asn Val Asp Ser Leu Val Lys Ser Phe Leu Gly Thr Lys Gln His  
 265                                  270                                  275                                  280  
 ggc att atc gag ttt tgc ctg ctg gfg ttc tct aac tta gct gtt gcc 978  
 Gly Ile Ile Glu Phe Cys Leu Leu Val Phe Ser Asn Leu Ala Val Ala  
                                   285                                  290                                  295  
 agt tcg ttc ttt ggt gtc acg ctg ggg ttg ttc gat tat ctg gcg gac 1026  
 Ser Ser Phe Phe Gly Val Thr Leu Gly Leu Phe Asp Tyr Leu Ala Asp  
                                   300                                  305                                  310  
 ctg ttt aag att gat aac tcc cac ggc ggg cgt ttc aaa acc gfg ctg 1074  
 Leu Phe Lys Ile Asp Asn Ser His Gly Gly Arg Phe Lys Thr Val Leu  
                                   315                                  320                                  325  
 tta acc ttc ctg cca cct gcg ttg ttg tat ctg atc ttc ccg aac ggc 1122  
 Leu Thr Phe Leu Pro Pro Ala Leu Leu Tyr Leu Ile Phe Pro Asn Gly  
           330                                  335                                  340  
 ttt att tac ggg atc ggc ggt gcc ggg ctg tgc gcc acc atc tgg gcg 1170  
 Phe Ile Tyr Gly Ile Gly Gly Ala Gly Leu Cys Ala Thr Ile Trp Ala  
 345                                  350                                  355                                  360  
 gtc att att ccc gca gfg ctt gca atc aaa gct cgc aag aag ttt ccc 1218  
 Val Ile Ile Pro Ala Val Leu Ala Ile Lys Ala Arg Lys Lys Phe Pro  
                                   365                                  370                                  375  
 aat cag atg ttc acg gtc tgg ggc ggc aat ctt att ccg gcg att gtc 1266  
 Asn Gln Met Phe Thr Val Trp Gly Gly Asn Leu Ile Pro Ala Ile Val  
                                   380                                  385                                  390  
 att ctc ttt ggt ata acc gfg att ttg tgc tgg ttc ggc aac gtc ttt 1314  
 Ile Leu Phe Gly Ile Thr Val Ile Leu Cys Trp Phe Gly Asn Val Phe  
                                   395                                  400                                  405  
 aac gfg tta cct aaa ttt ggc taa atccitcaag aagccageca ttcgctggct 1368  
 Asn Val Leu Pro Lys Phe Gly  
           410                                  415  
 tcttgccctc caggaaatca ctatgtcca aatggcaact cgccgatcc tccitacca 1428  
 cgtatgcttt gcgtcacctt ac 1450

<210> 4

<211> 415

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 4

Met Thr Asp Gln Ala Glu Lys Lys His Ser Ala Phe Trp Gly Val Met  
 1 5 10 15  
 Val Ile Ala Gly Thr Val Ile Gly Gly Gly Met Phe Ala Leu Pro Val  
 20 25 30  
 Asp Leu Ala Gly Ala Trp Phe Phe Trp Gly Ala Phe Ile Leu Ile Ile  
 35 40 45  
 Ala Trp Phe Ser Met Leu His Ser Gly Leu Leu Leu Leu Glu Ala Asn  
 50 55 60  
 Leu Asn Tyr Pro Val Gly Ser Ser Phe Asn Thr Ile Thr Lys Asp Leu  
 65 70 75 80  
 Ile Gly Asn Thr Trp Asn Ile Ile Ser Gly Ile Thr Val Ala Phe Val  
 85 90 95  
 Leu Tyr Ile Leu Thr Tyr Ala Tyr Ile Ser Ala Asn Gly Ala Ile Ile  
 100 105 110  
 Ser Glu Thr Ile Ser Met Asn Leu Gly Tyr His Ala Asn Pro Arg Ile  
 115 120 125  
 Val Gly Ile Cys Thr Ala Ile Phe Val Ala Ser Val Leu Trp Leu Ser  
 130 135 140  
 Ser Leu Ala Ala Ser Arg Ile Thr Ser Leu Phe Leu Gly Leu Lys Ile  
 145 150 155 160  
 Ile Ser Phe Val Ile Val Phe Gly Ser Phe Phe Phe Gln Val Asp Tyr  
 165 170 175  
 Ser Ile Leu Arg Asp Ala Thr Ser Ser Thr Ala Gly Thr Ser Tyr Phe  
 180 185 190  
 Pro Tyr Ile Phe Met Ala Leu Pro Val Cys Leu Ala Ser Phe Gly Phe  
 195 200 205  
 His Gly Asn Ile Pro Ser Leu Ile Ile Cys Tyr Gly Lys Arg Lys Asp  
 210 215 220  
 Lys Leu Ile Lys Ser Val Val Phe Gly Ser Leu Leu Ala Leu Val Ile  
 225 230 235 240  
 Tyr Leu Phe Trp Leu Tyr Cys Thr Met Gly Asn Ile Pro Arg Glu Ser  
 245 250 255  
 Phe Lys Ala Ile Ile Ser Ser Gly Gly Asn Val Asp Ser Leu Val Lys  
 260 265 270  
 Ser Phe Leu Gly Thr Lys Gln His Gly Ile Ile Glu Phe Cys Leu Leu  
 275 280 285  
 Val Phe Ser Asn Leu Ala Val Ala Ser Ser Phe Phe Gly Val Thr Leu  
 290 295 300  
 Gly Leu Phe Asp Tyr Leu Ala Asp Leu Phe Lys Ile Asp Asn Ser His  
 305 310 315 320  
 Gly Gly Arg Phe Lys Thr Val Leu Leu Thr Phe Leu Pro Pro Ala Leu  
 325 330 335  
 Leu Tyr Leu Ile Phe Pro Asn Gly Phe Ile Tyr Gly Ile Gly Gly Ala  
 340 345 350  
 Gly Leu Cys Ala Thr Ile Trp Ala Val Ile Ile Pro Ala Val Leu Ala



<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 8

ggctgcagcg caaagcatatc gtggtgaagg 30

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 9

cgctcaagtt agtataaa 18

<210> 10

<211> 54

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> iniciador (1)r

<400> 10

cctgacagtg cgggcttttt ttttcgacca ctgcagtctg ttacaggtca ctaa 54

<210> 11

<211> 54

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> iniciador (2)f

<400> 11

cccgcactgt caggtgcggg cttttttctg tgtaagctt cgacgaattt ctgc 54

<210> 12

<211> 54

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> iniciador (2)r

<400> 12

gcagcgtcaa ccgggcgctc tagctagata tcggatccga gattttcagg agct 54

<210> 13

<211> 54

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> iniciador (3)f

<400> 13

agctcctgaa aatctcgat ccgatatcta gctagagcgc ccggttgacg ctgc 54

<210> 14

<211> 54

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> iniciador (3)r

<400> 14

ctacgcgatc atggcgacca cacccgtcct gtggatctcc ggataagtag acag 54

<210> 15

<211> 54

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> iniciador (4)f

<400> 15

ttcgtgcgac ttatcaggct gtctacttat ccggagatcc acaggacggg tgtg 54

<210> 16

<211> 54

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> iniciador (4)r

<400> 16

cgaattctca tgtttgacag cttatcatcg ataagcttta atgcggtagt ttat 54

<210> 17

<211> 54

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> iniciador (5)f

<400> 17

ttagcaattt aactgtgata aactaccgca ttaaagctta tcgatgataa gctg 54

<210> 18

<211> 54

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> iniciador (5) r

<400> 18

ttttgcaggg gggcattggt tggtaggtga agatcttgaa gcctgctttt ttat 54

<210> 19

<211> 58

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> DNA sintético (6) f

<400> 19

ctgcagtggt cgaaaaaaaa agccccgact gtcaggtgcg ggcttttttc tgtgttaa 58

<210> 20

<211> 58

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> DNA sintético (6) r

<400> 20

ttaacacaga aaaaagccccg cacctgacag tgcgggcttt tttttcgac cactgcag 58

<210> 21

<211> 54

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> iniciador P1

<400> 21

tgccaactta gtataaaaaa gcaggcttca agatcttcac ctaccaaaca atgc 54

<210> 22

<211> 72

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> iniciador P2mtr

<400> 22

cgacggtgac gtttgggtgg tggtagtgt tgccatagcc tgtttccttc tagacggcca 60  
atgcttcggt tc 72

<210> 23

<211> 72

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> iniciador P2tnab

<400> 23

aaatgcagag tgcttttttt cagcttgatc agtcatagcc tgtttccttc tagacggcca 60  
atgcttcggt tc 72

<210> 24

<211> 54

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> iniciador (1) fmtr

<400> 24

gcgaacacaa tctgtaaaat aatatataca gccccgcgct caagttagta taaa 54

<210> 25

<211> 54

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> iniciador (1) ftwab

<400> 25

tcctcaataa caaaaatagc cttcctctaa aggtggegct caagttagta taaa

54

<210> 26

<211> 3178

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> gene fundido

<400> 26

```

gcgaacacaa iciglaaaal aatalatata gccccgcgci caagttagta laaaaaagct 60
gaacgagaaa cglaaaatga talaataatc aatalatata atagatttt gcataaaaaa 120
cagactacat aalacigtaa aacacaacat aigcagtcac latgaatcaa ctacttagat 180
gglatfagtg accigtaaca gactgcagtg gtcgaaaaaa aaagcccgcg cigtcaggig 240
cgggcitfff icigigltaa gcilcgacga atilcigcca itcatccgci lallatcact 300
tallcaggcg tagcaccagg cglltaaggg caccaataac igccllaaaa aaattacgcc 360
ccgcccigcc actcatcgca gtactgltgt aatcatata gcattctgcc gacatggaag 420
ccatcacaga cggcatgatg aacctgaalc gccagcggca lcagcaccti gtcgccitgc 480
glataatatt igcccattgt gaaaacgggg gcgaagaagt iglccatait ggccacgttt 540
aaatcaaac iggtgaaact caccagggga tggcigaga cgaaaaacat alliccaata 600
aaccctffag ggaataggc caggtilica ccgtaacacg ccacatctg cgaatalatg 660
tglagaaact gccggaaalc gtcgigtat lcactccaga gcgatgaaa cglltcagtt 720
tgclcatgga aaacggigta acaaggigta acactatccc atatcaccag ctaccgicti 780
tlatctgcca lacggaaltc cggatgagca tlatcaggc gggcaagaat gigaalaaag 840
gccgataaaa acttgigtct atlllcttt acggllctta aaaaggccgt aatatccagc 900
tgaacggict ggllataggt acatlgagca actgactgaa algcctcaa atgllcttta 960
cgalgccatt gggatatac aacggigta latccagta lllllctc catttagcti 1020
lcltagctc ctgaaaactl cggatccgat atctagctag agcggccggt tgacgticti 1080
aglltacct agcgallgti acttactgc atgtacttc atgllgcaa tactgtttt 1140
lctgctgact latcaggctg tclactatc cggagalca caggacgggt gtggtcgcca 1200

```

lgalcgcgta gtcgalagtg gclccaagla gcgaagcgag caggactggg cggcggccaa 1260  
 agcgglcgga caglgclccg agaacgggig cgcatalagaa ttgcatcaac gcatalagcg 1320  
 clagcagcac gccatagtga ciggcgaigc lgtcggaatg gacgataicc cgcaagaggc 1380  
 ccggcagtac cggcataaacc aagcctaigc ctacagcaic cagggtgacg gfgccgagga 1440  
 lgacgaigag cgcattgita gatttcatac acggtgccig actgcgilag caattiaaci 1500  
 glgataaact accgcattaa agcittaicga tgataagcig tcaaacatga gaattcgaaa 1560  
 tcaataatag attttatitl gactgalagt gacctgticg ttgcaacaaa ttgataagca 1620  
 atgctttttl ataaigccaa cttaglataa aaaagcaggc ttcaagatcl tcacctacca 1680  
 aacaalgccc cccigcaaaa aataaatca tataaaaaac atacagataa ccatcigcgg 1740  
 lgataaatta tcctcggcgg tgttgacata aataccacig gcggtgatac tgagcacatc 1800  
 agcaggacgc actgaccacc aigaaggiga cgcctttaa aattaagccc tgaagaaggg 1860  
 cagcattca agcagaaggc ttggggigt gtgatacga acgaagcatt ggccgctag 1920  
 aaggaaacag gctatggcaa cactaaccac cacccaaacg tcaccgicgc tgcctggcgg 1980  
 cgtggigtall atcggcggca ccatatigg cgcagggaig tttctcigc cagttgcat 2040  
 glccggggcg tggttttct ggtaaatgca ggcgcigat tttaccigt tctgtatgcl 2100  
 gcatccggc ttgatgattc tggaaactaa cctgaattac agaatcggll cgagtittga 2160  
 caccatcacc aaagattgc tggcacaagg ctggaacgig gtaaacggca ttccattgic 2220  
 ctltgtctc tataaccga cctatgccia tattctgccc aglgttcca ttctgcatca 2280  
 caccitcga gagatgicac taaacgtccc ggcacgggcg gcgggtttg gttttgcatl 2340  
 gctggtagcg ttgtgggtg ggttgagcac taaagccgtc agtcgatga cagcgattgt 2400  
 gctggggcg aaagcatta cctcttctc caccitggt agcctcigg ggcatgicga 2460  
 gccctgcaca ttgtcaacg tcgccgaaag caalgcicl tatgcaccg atctgtgat 2520  
 gaccctgccg tctgtctgg calcgittg ttatcacggt aacgtgcaa gccgatgaa 2580  
 gtattacggc aaagalccga aaacatcgt gaaalgctg gttacggta cgcgatggc 2640  
 gctggcctg talaccatcl ggttgctggc gacgatgggt aacatcccgc gtcgggagll 2700  
 talcgtatll gcagagaagg gcgtaalat tgatgtctg gtacaggcgt taagcggcgt 2760  
 actgaacagc cgtagctgg atctgtctc ggtcgtgtc tcaaacitlg cggtagcgag 2820  
 ttcttctc ggcgtaacgc tgggtttgt tgaclatcig gcagatctgt ttggttcca 2880  
 cgactcggct ggggcccgt tgaaacggc atgtctgacc ttgccccgc cagttgtggg 2940  
 gggcctgtt tccccgaac galccctgta cgcattggt tatgtggtl tagcggctac 3000  
 catctgggcg gcaatgttc cggcctgtt agcccgtgca tcgcgtaaac gctttggcag 3060  
 cccgaaatc cgcctcggg gttgcaagcc gatgatggc ctgattctgg tgtttggcgt 3120  
 cggcaacgca ctggctgata tttatcgag cttaattta ctgccggtl atcagtaa 3178

<210> 27

<211> 3181

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> gene fundido

<400> 27

iccicaalaa caaaaatagc cicciclaa aggigggccl caagllagla laaaaaagcl 60  
 gaacgagaaa cglaaaaiga lalaaalalc aalatalaa allagallll gcalaiaaaa 120  
 cagactlacaal aalactgtaa aacacaacal atgcaglcac latgaalcaa clactlagal 180  
 gglalltagig acciglaaca gacigcagig gicgaaaaaa aaagcccgc aiglcaggig 240  
 cgggcillll icigtgllaa gcllcgacga allcclgcca licalceget lallalcact 300  
 lallcaggcg tagcaccagg cglllaaggg caccaalaa lgccllaaaa aaallacgcc 360  
 ccgcccigcc acicalcgca glactgllg aallcattaa gcallcigcc gacalggag 420  
 ccalcacaga cggcalgalg aaccigaalc gccagcggca lcagcaccil gicgccllge 480  
 glalaaalal lgcccalggi gaaaacgggg gcgaagaagt lglccatal ggccacgll 540  
 aaalcaaaac lggllaaacl caccagggg lggcigaga cgaaaaacal allcicaata 600  
 aaccclllag ggaaalaggc cagllllca ccglacacg ccacalcig cgaalatalg 660  
 lgtagaaact gccggaaalc gicgllglal lcactccaga gcgalgaaa cglilcagll 720  
 lgcicalgga aaacggllg acaaggllg acacalccc alalcaccag clcaccgll 780  
 licallgcca lacggaalc cggalgagca licalcaggc gggcaagaal gigaalaaag 840  
 gccggalaaa aclllgcll allllclll acggllcilla aaaaggccgl aatalccagc 900  
 lgaacggllc ggllalaggi acallgagca acigalcgaa atgcclcaaa alglcllila 960  
 cgatgccall gggatalalc aacggllgla lalccaglla lllllcllc calllltagcl 1020  
 lclllagclc clgaaaalcl cggalccgal alcltagclag agcggccggll lgacgclgcl 1080  
 agllllaccl agcgalllg allclacigc allllacllc allllgllca laccgllll 1140  
 lcglcggact lalcaggclg lclacllalc cggagalcca caggacgggl gllgclgcca 1200  
 lgalcgcgla gicgalaglg gclccaagla gcgaagcggc caggacggg cggcggcca 1260  
 agcggllcggc cagllcclcg agaacggllg cgalagaaa llcalcaac gcalalagc 1320  
 clagcagcac gccalagla clggcgalgc lglcggaaag gacgatalcc cgcaagagc 1380  
 ccggcaglac cggcalaacc aagccalgc clacagcalt caggllgagc gllccgagga 1440  
 lgacgalgag cgcalglla gallclalac acggllcclg acllcgllag caalllaact 1500  
 glgalaacct accgallaa agcllalca lgalaaagcl lcaaaalga gaallcgaal 1560  
 lcaaaatag allllallll gacgalagll gaccgllcg llgcaaaaa llgalaagca 1620  
 allclllll alaatgcaa cltaglala aaaagcaggc llcaagalc lccclacca 1680  
 acaalgcc cclgcaaaa aalaaalca lalaaaaac alacagala ccalclcgcg 1740  
 lgalaaalla lclcggcg llglacata aalaccalc gcgllgala lgagcatalc 1800  
 agcaggacgc aclgaccacc algaagllg cgccllcaa aallaagccc lgaagaagg 1860  
 cagallcaaa agcagaaggc llggggllg llgatalgaa acgaagcail ggccgllag 1920  
 aaggaaacag gclatgacg alcaagclg aaaaagcac lclgcallll ggggllll 1980  
 glllalagca gllacaglla llggllgag llgllllgcl llaccgllg allllgccc 2040  
 lggclgllll llcggggll cclllalcl lalcalgccc llgllllcaa llclllcllc 2100  
 cggllallg llallagaag caalllcaa llalcccgc ggcclcagll llaacacal 2160  
 caccaaaag llalclglla acaccggaa calalacagc gllallaccg llgclllcgl 2220  
 lclclatalc clcclllag cclatalclc lglalagll gcgalcalla gigaacgal 2280  
 alcaatgaal llggllalc acgllaalc acgllllg llgallcgea cagccallll 2340  
 cglgcccagc glallgllg llagllcgl agccgccag cglallaccl callllcll 2400  
 cggcclgaag allalclcl llglalclg llggllcl llclllcllc agllcaglla 2460  
 clcclclg cgcgacgcca ccagclccac lggggaaag clllacllc cglatalcl 2520  
 latggclll cggllgllc llggllcail llgllllc llgcaalall ccagcclgal 2580  
 lallgclal ggaaaacgca aagalaagll aalcaaaagc llgllallg llcgcclgcl 2640  
 ggcclggll allalclcl lclggclla llgcacalgg gggaaalall cgcgagaaag 2700  
 clllaaggc allalclcl caggcggca cglgallc clggllaaal cglclclcg 2760  
 caccaaacag cacggcalla lcgallll cclgclggll llclllaact lagclllgcl 2820

cagllcgttc llgglgica cgciggggtl gllcgattal ciggcggacc lgtllaagat 2880  
 lgalaacicc cacggcgggc gllicaaaac cglcclgta accllccgc cacctgcgtl 2940  
 glglatcig atcllccga acggciltat llacgggalc gccggigccg gcciglgcgc 3000  
 caccaiclgg gcggicaila llcccgagl gcllgcaalc aaagclcgca agaagllcc 3060  
 caatcagaig llcacggicl ggggcggcaa lcllallccg gcgaligica llclcllgg 3120  
 lalaaccgig alllllgcl gglcggcaa cgtclltaac glltlaccia aalllgcia 3180  
 a 3181

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir uma substância alvo, caracterizado pelo fato de compreender

5 (a) cultivar uma *Escherichia coli* que tem uma capacidade de produzir a substância alvo em um meio, e

(b) coletar a substância alvo do meio,

em que referida *Escherichia coli* é modificada de modo que um sistema para a captação da célula de um subproduto da substância alvo é melhorado por um método selecionado do grupo consistindo de

10 (a) aumentar o número de cópias de um gene *mtr* ou um gene *tnaB*, e

(b) modificar uma sequência regulatória de expressão de um gene *mtr* ou *tnaB*, em que dita substância alvo é L-fenilalanina, e dito subproduto é L-triptofano,

15 em que dito gene *mtr* compreende uma sequência de DNA mostrada na SEQ ID NO: 1; e

em que dito gene *tnaB* compreende uma sequência de DNA mostrada na SEQ ID NO: 3.

20 2. *Escherichia coli*, caracterizada pelo fato de ter capacidade de produzir uma substância alvo e tem uma modificação de melhora de um sistema para captação da célula de um subproduto da substância alvo por um método selecionado do grupo consistindo de:

(a) aumentar o número de cópias de um gene *mtr* ou um gene *tnaB*, e

25 (b) modificar uma sequência regulatória de expressão de um gene *mtr* ou *tnaB*,

em que dita substância alvo é L-fenilalanina, e dito subproduto é L-triptofano,

em que dito gene *mtr* compreende uma sequência de DNA

mostrada na SEQ ID NO: 1; e

em que dito gene *tnaB* compreende uma sequência de DNA mostrada na SEQ ID NO: 3.

RESUMO

“MÉTODOS PARA PRODUZIR UMA SUBSTÂNCIA ALVO, EM  
*ESCHERICHIA COLI*”

5 Uma substância alvo é produzida por cultivo de uma bactéria que tem a capacidade de produzir a substância alvo em um meio para provocar o acúmulo de referida substância alvo no meio e coletar a substância alvo do meio, em que a bactéria é modificada como um sistema para captação de um subproduto da substância alvo ou um substrato para um sistema de biossíntese da substância alvo na célula bacteriana.