

PI 04005775
PI 04005775



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

CARTA PATENTE Nº PI 0400577-5

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 0400577-5

(22) Data do Depósito: 20/02/2004

(43) Data da Publicação do Pedido: 07/12/2004

(51) Classificação Internacional: C12P 13/04

(30) Prioridade Unionista: 26/02/2003 RU 2003105269

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

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

(72) Inventor: EKATERINA ALEKSEEVNA SVRASOVA; TATYANA ANATOLIEVNA MICHURINA; YURI IVANOVICH KOZLOV; ELENA VIKTOROVNA SYCHEVA

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 23/12/2014, observadas as condições legais.

Expedida em: 23 de Dezembro de 2014.

Assinado digitalmente por:

Júlio César Castelo Branco Reis Moreira
Diretor de Patentes

“PROCESSO PARA PRODUZIR UM L-AMINOÁCIDO”

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Campo da invenção

A presente invenção refere-se à biotecnologia, especificamente
5 a um processo para produzir L-aminoácidos através de fermentação de pentoses e mais especificamente a um processo para produzir L-aminoácidos por fermentação, utilizando mistura de arabinose e/ou xilose juntamente com glucose como a fonte de carbono. A fonte de carbono não dispendiosa compreendendo a mistura de hexoses e pentoses de frações de hemicelulose
10 de biomassa celulósica poderia ser utilizada para a produção comercial de L-aminoácidos, como por exemplo, L-isoleucina, L-histidina, L-treonina e L-triptofano.

Descrição da técnica relacionada

Convencionalmente os L-aminoácidos têm sido produzidos
15 industrialmente por um processo de fermentação utilizando-se cepas de microorganismos diferentes. O meio de fermentação para o processo deve conter quantidades suficientes de fontes diferentes de carbono e nitrogênio.

Tradicionalmente, vários carboidratos tais como hexoses, pentoses, trioses; vários ácidos e álcoois orgânicos, são utilizados como uma fonte de carbono. As hexoses incluem glucose, frutose, manose, sorbose, galactose e semelhantes. As pentoses incluem arabinose, xilose, ribose e semelhantes. Mas os carboidratos mencionados acima e outras fontes tradicionais de carbono, como os melaços, milho, cana-de-açúcar, amido, seus hidrolisados, etc. utilizados na indústria são ainda bastante dispendiosos e é
25 desejada a redução do preço do L-aminoácido produzido.

A biomassa celulósica é uma matéria-prima favorável para a produção de L-aminoácidos por ser ela rapidamente disponível e menos dispendiosa do que os carboidratos, milho, cana de açúcar ou outras fontes de carbono. O nível típico de celulose, hemicelulose e lignina na biomassa é de

aproximadamente 40 - 60% de celulose, 20 - 40% de hemicelulose, 10 - 25% de lignina e 10% de outros componentes. A fração de celulose consiste de polímeros de hexose de açúcar, glucose. A fração de hemicelulose é composta na sua maior parte de açúcares de pentoses, incluindo xilose e arabinose. A 5 composição de várias matérias-primas de biomassa é mostrada na tabela 1. (http://www.ott.doe.gov/biofuels/understanding_biomass.html).

Tabela 1

Material	Açúcares com seis carbonos	Açúcares com cinco carbonos	Lignina	Cinza
Madeiras duras	39-50%	18-28%	15-28%	0,3-1,0%
Madeiras moles	41-57%	9-12%	24-27%	0,1-0,4%

Informação mais detalhada sobre a composição de mais de 150 amostras de biomassa é summarizada em "Biomass Feedstock Composition and 10 Property Database" (<http://www.ott.doe.gov/biofuels/progs/search1.cgi>).

Espera-se que o processo industrial para a conversão efetiva de biomassa celulósica em matéria-prima de fermentação utilizável (tipicamente mistura de carboidratos) será desenvolvido em futuro próximo. Assim sendo, espera-se que a utilização de fontes energéticas 15 renováveis, tais como celulose e hemicelulose, para a produção de compostos úteis, aumente em futuro próximo (Aristidou A., Pentila.M., Curr. Opin. Biotechnol, abril de 2000, 11:2, 187-198). Mas a grande maioria dos artigos e patentes publicados (ou solicitações de patente) descrevem a utilização de biomassa celulósica por biocatalizadores 20 (bactérias e fermentos) para a produção de etanol, que se espera, seja um combustível alternativo. Tais processos compreendem a fermentação de biomassa celulósica utilizando cepas diferentes modificadas de Zymomonas mobilis (Deanda K. et al, Appl. Environ. Microbiol., dezembro de 1996, 62:12, 4465 -70; Mohagheghi A. et al, Appl. Biochem., 25 Biotechnol, 2002, 98-100:885-98; Lawford H.G., Rousseau J.D., Appl.

Biochem. Biotechnol, 2002, 98-100:429-48; solicitações de patente PCT de números WO95/28476, WO98/50524), cepas modificadas de *Escherichia coli* (Dien B.S. et al, Appl. Biochem. Biotechnol, 2.000, 84 - 86:181-96; Nichols N.N. et al, Appl. Microbiol. Biotechnol., julho de 2001, 56:1-2, 5 120-5; patente US de número 5.000.000). O xilitol poderia ser produzido por fermentação de xilose a partir de açúcares hemicelulósicos utilizando *Candida tropicalis* (Walther T. et al, Appl. Biochem. Biotechnol., 2001, 91-93:423-35). 1,2-propanodiol poderia ser produzido por fermentação de arabinose, frutose, galactose, glucose, lactose, maltose, sacarose, xilose, e a 10 combinação dos mesmos, utilizando-se a cepa recombinante de *Escherichia coli* (patente US de número 6.303.352). Também foi demonstrado que o ácido 3-desidroshiquímico poderia ser obtido pela fermentação da mistura de glucose/xilose/arabinose utilizando-se a cepa de *Escherichia coli* e as concentrações e rendimentos mais elevados de ácido 3-desidroshiquímico 15 foram obtidos quando a mistura de glucose/xilose/arabinose foi utilizada como a fonte de carbono quando xilose ou glucose sozinhas foram utilizadas como uma fonte de carbono (Kai Li e J. W. Frost, Biotechnol. Prog., 1999, 15, 876-883). Sabe-se que a *Escherichia coli* pode utilizar pentoses, tais como a L-arabinose e a D-xilose. O transporte de L-arabinose 20 para a célula é executado através de dois sistemas indutíveis: permease de baixa afinidade (K_m em torno de 0,1 mM) codificada pelo araE e de alta afinidade (K_m de 1 a 3 μM) codificada pelo operon araFG. O gene araF codifica uma proteína de ligação periplasmática (306 aminoácidos) com função receptora quimiotática, e o lócus araG codifica uma proteína de 25 membrana interna. O açúcar é metabolizado através de um conjunto de enzimas codificadas pelo operon araBAD: uma isomerase (codificada pelo gene AraA), que converte reversivelmente a aldose em L-ribulose; uma quinase (codificada pelo gene araB) que fosforila a quetose em L-ribulose 5-fosfato; e L-ribulose-5-fosfato-4-epimerase (codificada pelo gene araD),

que catalisa a formação de D-xilose-5-fosfato (*Escherichia coli* e *Salmonella*, Segunda edição, editor chefe: F.C.Neidhardt, ASM Press, Washington D.C., 1996).

A maioria das cepas de *E.coli* crescem em D-xilose, mas é necessária uma mutação para que a cepa K-12 cresça no composto. A utilização dessa pentose é através de um caminho indutível catabólito-repressível envolvendo o transporte ao longo da membrana citoplasmica por duas permeases indutíveis (não ativas em D-ribose ou D-arabinose), a isomerização em D-xilulose, e a fosferilação dependente de ATP da pentulose para gerar D-xilulose-5-fosfato. O sistema de transporte de alta afinidade (K_m 0,3 a 3 μM) depende de uma proteína de ligação periplasmica (37.000 Da) e provavelmente é controlada por um composto de alta energia. O sistema de baixa afinidade (K_m de cerca de 170 μM) é energizado por força próton motiva. Este sistema D-xilose-proton-simport é modificado pelo gene *xylE*. O aglomerado do gene principal que especifica a utilização de D-xilose é *xylAB(RT)*. O gene *xylA* codifica a isomerase (54.000 Da) e o gene *xylB* codifica a quinase (52.000 Da). O operon contém dois pontos de partida transpcionais, um deles sendo colocado antes do quadro aberto de leitura do *xyl*. Mas ele não é essencial aqui. Como a permease de baixa afinidade é especificada pelo *xylE* não ligado, o lócus do *xylT* provavelmente codifica o sistema de transporte de alta afinidade e portanto deve conter pelo menos dois genes (um para uma proteína periplasmica e um para a proteína de membrana integral (*Escherichia coli* e *Salmonella*, Segunda edição, editor chefe: F.C.Neidhardt, ASM Press, Washington D.C., 1996)).

A introdução dos genes de *E.coli* mencionados acima que modificam a L-arabinose isomerase, L-ribuloquinase, L-ribulose 5-fosfato 4-epimerase, xilose isomerase e xiluloquinase, alem da transaldolase e da transquetolase possibilitam que um micrório, como o *Zymomonas mobilis*,

metabolize a arabinose e xilose em etanol (WO/ 9528476, WO98/50524). Diferentemente, o gene Zymomonas que codifica a desidrogenase de álcool (ADH) e a descarboxilase do piruvato (PDH) são úteis para a produção de etanol pelas cepas de Escherichia coli (Dien B.S. et al, Appl. Biochem. Biotechnol, 2.000, 84 - 86:181-96; patente US de número 5.000.000).

5 Mas atualmente não há nenhum relatório descrevendo um processo para a produção do L-aminoácido por fermentação de mistura de glucose e pentoses, tais como arabinose e xilose.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

10 Um objetivo da presente invenção é fornecer um processo para produzir o L-aminoácido a partir de uma mistura de açúcar hexose, como glucose, e açúcares pentoses, tais como xilose ou arabinose, através da cultura do microorganismo de produção do L-aminoácido em um meio de cultura contendo a mistura de açúcares. Uma matéria-prima de fermentação obtida de
15 biomassa celulósica poderá ser utilizada como uma fonte de carbono para o meio de cultura. Um microorganismo utilizado é capaz de crescer na matéria-prima de fermentação e ser eficiente na produção do L-aminoácido utilizando a matéria-prima de fermentação consistindo de xilose e arabinose juntamente com glucose, como a fonte de carbono.

20 Um objetivo da presente invenção é fornecer um processo para a produção de L-aminoácido, que compreende o cultivo da bactéria de produção de L-aminoácido em um meio de cultura e a retirada do meio de cultura do L-aminoácido a ser produzido e acumulado, onde o meio de cultura contém uma mistura de açúcares de glucose e pentose.

25 Um outro objetivo da presente invenção é apresentar o processo conforme descrito acima, onde os açúcares de pentose são arabinose e xilose.

Um outro objetivo da presente invenção é apresentar o processo conforme descrito acima, onde a mistura de açúcares é uma mistura

de matérias-primas de açúcares obtidos de biomassa celulósica.

Um outro objetivo da presente invenção é apresentar o processo conforme descrito acima, onde a bactéria de produção do L-aminoácido é a bactéria pertencente ao gênero Escherichia.

5 Um outro objetivo da presente invenção é apresentar o processo conforme descrito acima, onde a bactéria de produção do L-aminoácido é modificada para ter uma taxa aumentada de utilização de açúcares de pentose.

10 Um outro objetivo da presente invenção é apresentar o processo conforme descrito acima, onde o L-aminoácido a ser produzido é a L-isoleucina.

Um outro objetivo da presente invenção é apresentar o processo conforme descrito acima, onde a bactéria tem uma expressão aumentada do gene pela biossíntese de isoleucina.

15 Um outro objetivo da presente invenção é apresentar o processo conforme descrito acima, onde o L-aminoácido a ser produzido é a L-histidina.

20 Um outro objetivo da presente invenção é apresentar o processo conforme descrito acima, onde a bactéria tem uma expressão aumentada do gene pela biossíntese de histidina.

Um outro objetivo da presente invenção é apresentar o processo conforme descrito acima, onde o L-aminoácido a ser produzido é a L-treonina.

25 Um outro objetivo da presente invenção é apresentar o processo conforme descrito acima, onde a bactéria tem uma expressão aumentada do gene pela biossíntese da L-treonina.

Um outro objetivo da presente invenção é apresentar o processo conforme descrito acima, onde o L-aminoácido a ser produzido é o L-triptofano.

Ainda um outro objetivo da presente invenção é apresentar o processo conforme descrito acima, onde a bactéria tem uma expressão aumentada do gene pela biossíntese de L-triptofano.

DESCRÍÇÃO DAS REALIZAÇÕES PREFERIDAS

5 Revelou-se que a cepa conhecida de produção do L-aminoácido poderia utilizar eficientemente os açúcares de pentoses juntamente com glucose e produzir L-aminoácido em quantidades comparáveis com as quantidades de L-aminoácidos produzidos por fermentação de glucose. Exemplos de cepas produtoras de L-aminoácidos
10 incluem uma cepa pertencente ao gênero Escherichia.

Em outras palavras, a presente invenção descreve o uso de cepas recombinantes de organismos simples para a produção do L-aminoácido a partir de fontes sub-utilizadas de biomassa, tais como celulose e hemicelulose, que representam uma porção grande de madeira e de partes não
15 comestíveis de plantas.

Assim sendo, a presente invenção foi completada.

O método para produzir L-aminoácido inclui a produção de L-isoleucina por fermentação de mistura de açúcares de glucose e pentose, tais como arabinose e xilose. O método para a produção de L-aminoácido também
20 inclui a produção de L-histidina por fermentação de mistura de açúcares de glucose e pentose, como arabinose e xilose. O método para a produção de L-aminoácido também inclui a produção de L-treonina por fermentação de mistura de açúcares de glucose e pentoses, tais como arabinose e xilose. O
25 método de produção de L-aminoácido também inclui a produção de L-triptofano por fermentação de mistura de açúcares de glucose e pentose, tais como arabinose e xilose. Tal mistura de açúcares de glucose e pentose utilizada como uma matéria-prima de fermentação poderia ser obtida de fontes sub-utilizadas de biomassa de plantas.

A presente invenção será explicada em detalhes abaixo.

Na presente invenção, "bactéria de produção de L-aminoácido" significa uma bactéria que tem uma habilidade de acumular L-aminoácido em um meio, quando a bactéria da presente invenção é cultivada no meio. A habilidade de produção de L-aminoácido poderá ser fornecida ou aumentada 5 através de cultivo. O termo "bactéria de produção de L-aminoácido" utilizado aqui também significa uma bactéria que é capaz de produzir e acumular L-aminoácido em um meio de cultura em uma quantidade maior do que uma cepa selvagem ou original, e de preferência significa que o microorganismo é capaz de produzir e acumular em um meio, uma quantidade não menor do que 0,5 10 g/litro, mais de preferência não menos de 1,0 g/litro do L-aminoácido visado. O L-aminoácido inclui, L-alanina, L-arginina, L-asparagina, ácido L-aspartico, L-cisteína, ácido L-glutâmico, L-glutamina, L-glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-Lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L-tirosina e L-valina.

15 O termo "uma bactéria pertencente ao gênero Escherichia" significa que a bactéria é classificada como gênero Escherichia de acordo com classificação conhecida por uma pessoa adestrada em microbiológica. Exemplos de microorganismos pertencente ao gênero Escherichia utilizados na presente invenção incluem Escherichia coli (E.coli).

20 Exemplos de bactéria produtora de L-aminoácido pertencente ao gênero Escherichia são descritos abaixo.

Bactéria produtora de L-isoleucina

Cepa da E.coli AJ12919 como a bactéria pertencente ao gênero Escherichia tendo a habilidade para produzir L-isoleucina (publicação de patente 25 japonesa em aberto de número 8-47397); cepas de E.coli VL 1892 e KX141 (VKPM B- 4781) (US 5.658.766); cepas de E. coli H-9146 (FERM BP-5055) e H-9156 (FERM BP-5056) (US 5.695.972); cepas de E.coli H-8670 (FERM BP-4051) e H-8683 (FERM BP-4052) (US 5.460.958); cepas de E. coli FERM BP-3757 (US 5474918) e semelhantes são incluídas. A cepa de VKPM B-3996 na

qual o operon ilv é amplificado (cepa TDV5) é também uma bactéria preferida de produção de L-isoleucina (Hashiguchi K. et al, Biosci. Biotechnol. Biochem., 1999, 63(4), 672-9).

Bactéria produtora de L-histidina

5 Cepa 24 de E.coli (VKPM B-5945, RU2003677) como a bactéria pertencente ao gênero Escherichia tendo a habilidade de produzir L-histidina; cepa 80 de E.coli (VKPM B-7270, RU 2119536); cepas de E. coli NRRL B- 12116 - B12121 (US 4388405); cepas de E. coli H-9342 (FERM BP-6675) e H-9343 (FERM BP-6676) (US 6344347); cepa de E. coli H-9341
10 (FERM BP-6674) (EP1085087); cepa de E. coli AI80/pFM201 (US 6.258.554) e semelhantes são incluídas.

Bactéria produtora de L-treonina

15 Cepa de E. coli TDH6/pVIC40 (VKPM B-3996) (patentes US de número 5.175.107, e US 5.705.371) como a bactéria pertencente ao gênero Escherichia tendo a habilidade de produzir L-treonina; cepa de E. coli NRRL-21593 (patente US de número 5.939.307), cepa de E. coli FERM BP-3756 (patente US de número 5.474.918), cepas de E. coli FERM BP-3519 e FERM BP-3520 (patente US de número 5.376.538), cepa de E. coli MG442 (Gusyatiner et al., Genetika (em russo),14, 947-956 (1978), cepas de E. coli VL643 e VL2055 (EP 1149911 A) e semelhantes são incluídas.
20

Bactéria produtora de L-triptofano

25 Cepas de E. coli JP4735/pMU3028 (DSM10122) e JP6015/pMU91 (DSM10123) como a bactéria pertencente ao gênero Escherichia tendo a habilidade de produzir L-triptofano, deficiente na sintetase de triptofanil-tRNA codificada pelo gene mutante trpS (patente US de número 5.756.345); cepa de E. coli SV164 (pGHS) tendo uma alela serA liberada da inibição de resposta por serina (patente US de número 6.180.373); cepas de E. coli AGX17 (pGX44) (NRRL B-12263) e AGX6(pGX50)aroP (NRRL B-12264) deficiente na triptofanase de enzima (patente US de número

4.371.614); cepa de *E. coli* AGX17/pGX50, pACKG4-pps na qual uma habilidade de produzir fosfoenolpiruvato é aumentada (WO97/08333, patente US 6.319.696) e semelhantes são incluídas.

As cepas produtoras de L-aminoácidos acima mencionadas 5 poderão ser ainda mais modificadas para o aumento da taxa de assimilação de pentose ou para o aumento da habilidade biossintética do L-aminoácido pelo largo escopo de métodos bem conhecidos pela pessoa adestrada na técnica.

A taxa de utilização de açúcares de pentose poderia ser aumentada pela amplificação de genes de assimilação de pentose, tais como 10 os genes araFG e araBAD para arabinose, e os genes xylE e xylAB(RT) para xilose, ou através de mutações nos sistemas de assimilação de glucose (PTS e não-PTS), tais como as mutações ptsG (Nichols N.N. et al, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001, julho, 56:1-2, 120-5).

A habilidade biossintética da bactéria produtora de L-aminoácido poderá ser ainda mais melhorada pela expressão aumentada de 15 um ou mais genes, que são envolvidos na biossíntese do L-aminoácido. Tais genes incluem o operon ilvGMEDA, que de preferência é composto de um gene ilvA de codificação de treonina desaminase liberada substancialmente da inibição por L-isoleucina (patente US 5.998.178), para a bactéria produtora de 20 L-isoleucina. Tal gene também inclui o operon de histidina, que de preferência é composto do gene hisG de codificação de ATP fosforibosil transferase para o qual a inibição de resposta por L-histidina é desensibilizada (patentes russas de número 2003677 e 2119536), para a bactéria produtora de 25 L-histidina. Tais genes incluem também o operon treonina, que de preferência é composto de um gene de codificação de aspartate quinase-homoserina desidrogenase para o qual a inibição de resposta para L-treonina é desensibilizada (publicação de patente japonesa de número 1-29559), para a bactéria produtora de L-treonina. E tais genes também incluem o operon trpEDCBA, que de preferência é composto do gene trpE de codificação de

antranilate sintase liberada da inibição de resposta por L-triptofano; o gene serA liberado da inibição de resposta por serina; o gene pps fornecendo o caminho comum de ácidos aromáticos com fosfoenolpiruvato, para a bactéria L-triptofano. A habilidade das bactérias para também produzirem L-triptofano 5 poderá ser ainda mais melhorada fornecendo às bactérias a deficiência nas enzimas utilizando L-triptofano, que de preferência é composto de triptofanil-tRNA sintetase deficiente codificado pelo gene mutante trpS ou triptofanase deficiente codificado pelo gene mutante aroP.

O processo da presente invenção inclui o processo para a 10 produção de um L-aminoácido, compreendendo as etapas de cultivo da bactéria produtora do L-aminoácido em um meio de cultura, para permitir que o L-aminoácido seja produzido e acumulado no meio de cultura, e a extração do L-aminoácido do meio de cultura, onde o meio de cultura contém uma mistura de açúcares de glucose e pentose. O processo da presente invenção também inclui 15 um processo para a produção de L-isoleucina, compreendendo as etapas de cultivo da bactéria produtora de L-isoleucina em um meio de cultura, para permitir que a L-isoleucina seja produzida e acumulada no meio de cultura, e a extração da L-isoleucina do meio de cultura, onde o meio de cultura contém uma mistura de açúcares de glucose e pentose. O método da presente invenção 20 também inclui um método para produzir L-histidina, compreendendo as etapas de cultivo da bactéria produtora de L-histidina da presente invenção em um meio de cultura, para permitir que a L-histidina seja produzida e acumulada no meio de cultura, e a extração da L-histidina do meio de cultura, onde o meio de cultura contém uma mistura de açúcares de glucose e pentose. O método da presente 25 invenção também inclui um método para produzir L-treonina, compreendendo as etapas de cultivo da bactéria produtora de L-treonina da presente invenção em um meio de cultura, para permitir que a L-treonina seja produzida e acumulada no meio de cultura, e a extração da L-treonina do meio de cultura, onde o meio de cultura contém uma mistura de açúcares de glucose e pentose. O método da

presente invenção também inclui um método para a produção de L-triptofano, compreendendo as etapas de cultivo da bactéria produtora de L-triptofano da presente invenção em um meio de cultura, para permitir que o L-triptofano seja produzido e acumulado no meio de cultura, e a extração do L-triptofano do meio de cultura, onde o meio de cultura contém uma mistura de açúcares de glucose e pentose.

Uma mistura de açúcares de pentose, como xilose e arabinose, juntamente com açúcar de hexose, como glucose, poderia ser obtida de fontes sub-utilizadas de biomassa. Glucose, xilose, arabinose e outros carboidratos poderão ser liberados da biomassa da planta por vapor e/ou hidrólise ácida concentrada, hidrólise ácida diluída, hidrólise utilizando enzimas, como celulose, ou tratamento alcalino. Quando o substrato é material celulósico, a celulose poderá ser hidrolisada em açúcares simultaneamente ou separadamente e também fermentada em L-aminoácido. Como a hemicelulose geralmente é mais fácil de ser hidrolisada em açúcares do que a celulose, é preferível se pré-hidrolisar o material celulósico, separar as pentoses e então hidrolisar a celulose pelo tratamento com vapor, ácido, álcali, celuloses ou combinações dos mesmos para formar glucose.

Uma mistura consistindo de proporções diferentes de glucose/xilose/arabinose é utilizada neste estudo para ficar próxima da composição da mistura de matéria-prima de glucose e pentoses, que poderia potencialmente ser derivada de hidrolisados de plantas. A proporção de cada pentose na mistura variou de 12% a 50% do teor total de carboidratos (ver a seção de exemplos).

Na presente invenção, o cultivo, a extração e a purificação do L-aminoácido do meio e semelhantes poderão ser executados de uma forma similar ao método de fermentação convencional onde um aminoácido é produzido utilizando-se um microorganismo. Um meio utilizado para a cultura poderá ser um meio sintético ou um meio natural, desde que o meio

inclua uma fonte de carbono e uma fonte de nitrogênio e minerais e, se necessário, quantidades apropriadas de nutrientes que o microorganismo requer para crescer.

A fonte de carbono poderá incluir vários carboidratos, tais como glucose, sacarose, arabinose, xilose e outros açúcares de pentose e hexose, os quais a bactéria aminoácido poderia utilizar como uma fonte de carbono. Glucose, xilose, arabinose e outros carboidratos poderão ser uma parte da mistura de matérias-primas de açúcares obtidos de biomassa celulósica. Na presente invenção, a proporção de açúcares de glucose e pentose de preferência é 10:0,5-50, mais de preferência 10:1-25, mais de preferência 10:2-10.

Os açúcares de pentose adequados para a fermentação pela presente invenção incluem, mas não são limitados a xilose e arabinose. Quando a xilose e a arabinose são utilizadas como açúcares de pentose, a relação de xilose e arabinose de preferência é 1:0,5-10, mais de preferência é 1:1-5, mais de preferência é 1:2-3.

Como a fonte de nitrogênio, vários sais de amônio tais como amônia e sulfato de amônio, outros compostos hidrogenados tais como aminas, uma fonte natural de nitrogênio como peptona, hidrolisado de soja e um microorganismo fermentativo digerido são utilizados. Como minerais, monofosfato de potássio, sulfato de magnésio, cloreto de sódio, sulfato ferroso, sulfato de manganês, cloreto de cálcio, e semelhantes são utilizados. Algum nutriente adicional pode ser adicionado ao meio, se necessário. Por exemplo, se o microorganismo requer L-treonina para crescer (auxotrofia de treonina) a quantidade suficiente de L-treonina pode ser adicionada ao meio para o cultivo.

O cultivo é executado de preferência sob condições aeróbicas, tais como uma cultura com agitação, e uma cultura com agitação e com aeração, em uma temperatura de 20 a 40°C, de preferência de 31 a 38°C. O pH da cultura usualmente é entre 5 e 9, de preferência entre 6,5 e 7,2. O pH

da cultura pode ser ajustado com amônia, carbonato de cálcio, vários ácidos, várias bases, e soluções tampão. Usualmente um cultivo de 1 a 5 dias leva ao acúmulo do L- aminoácido visado no meio líquido.

Depois do cultivo, os sólidos, tais como células, podem ser
5 removidos do meio líquido por centrifugação ou filtração por membrana, e então o L-aminoácido visado pode ser recolhido e purificado por métodos de troca de íons, concentração e cristalização.

EXEMPLOS

A presente invenção será mais concretamente explicada abaixo
10 com referência aos seguintes exemplos não limitantes.

Exemplo 1: Produção de L-isoleucina por bactérias produtoras de L-isoleucina em fermentação de mistura de glucose e pentoses

A cepa TDV5 de *E. coli* produtora de L-isoleucina foi utilizada como uma cepa para a produção de L-isoleucina por fermentação da mistura de glucose e pentoses. A cepa TDV5 é derivada da cepa de *E. coli* TDH6/pVIC40 (VKPM B-3996), na qual o operon é amplificado adicionalmente (plasmídeo pMWD5) (Hashigushi K. et al, Biosci. Biotechnol. Biochem., 1999, 63(4), 672 -9).

Para se obter a cultura de semente, a cepa foi cultivada a 37°C durante 7 h em um caldo LB e adicionada ao meio de fermentação na proporção de 1/20 (v/v). 2 ml da cultura de semente foram transferidos para um tubo de teste de 20 x 200 mm com o meio de fermentação contendo açúcares diferentes ou misturas dos mesmos, e cultivados a 37°C durante 72 h com um agitador rotativo. Depois do cultivo, uma quantidade acumulada de L-isoleucina no meio foi determinada por TLC. Foram utilizadas placas TLC de 10 x 15 cm revestidas com camadas de 0,11 mm de sílica gel Sorbfill sem indicador fluorescente (Stock Company Sorbpolymer, Krasnodar, Rússia). As placas Sorbfil foram desenvolvidas com uma fase móvel:propan-2-ol: acetato de etila: amônia aquosa a 25%: água = 80:80:25:50 (v/v). Uma solução (2%)

de ninidrina em acetona foi utilizada como um reagente de visualização. Os resultados (dados de pelo menos três experiências independentes) são apresentados na tabela 2.

Composição do meio de fermentação (g/l):

5	Carboidratos	40,0
	(NH ₄) ₂ SO ₄	18,0
	K ₂ HPO ₄	2,0
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,0
	Tiamina HCl	0,02
10	CaCO ₃	25,0

A glucose e o sulfato de magnésio são esterilizados em separado. CaCO₃ seco por aquecimento é esterilizado a 180°C durante 2 h. O pH é ajustado em 7,0.

Tabela 2

Carboidratos			OD ₅₄₀	L-isoleucina g/l
D-glucose	L-arabinose	D-xilose		
6%	-	-	16,0 ± 2,3	15,0 ± 0,6
-	6%	-	10,6 ± 1,3	5,2 ± 0,3
-	-	6%	11,1 ± 0,4	8,4 ± 0,5
3%	3%	-	11,9 ± 2,0	9,5 ± 2,8
3%	-	3%	14,1 ± 0,3	12,8 ± 1,9
3%	1,5%	1,5%	12,8 ± 1,5	11,8 ± 1,8
1,5%	3%	1,5%	12,7 ± 1,2	10,4 ± 2,3
1,5%	1,5%	3%	14,1 ± 1,1	11,8 ± 0,5

15 Pode ser visto da tabela 2, que a cepa TDV5 de E. coli produtora de L-isoleucina pode utilizar eficientemente os açúcares de pentose na mistura com glucose e produzir L-isoleucina em quantidades comparáveis com a quantidade de L-isoleucina produzida por fermentação utilizando somente glucose.

20 Exemplo 2: Produção de L-histidina por bactéria produtora de L-histidina em fermentação de mistura de glucose e pentoses

A cepa 80 de E. coli produtora de L-histidina foi utilizada como uma cepa para produzir L-histidina por fermentação de mistura de

glucose e pentoses. A cepa 80 de *E. coli* (VKPM B-7270) é descrita em detalhes na patente russa RU 2119536.

Para obter-se a cultura de semente, a cepa foi cultivada em um agitador rotativo (250 rpm) a 27°C durante 6 h em tubos de teste de 40 ml (diâmetro de 18 mm) contendo 2 ml de caldo L com 3% de glucose. Então o meio de fermentação foi inoculado por 2 ml (5%) de material de semente. A fermentação foi executada em um agitador rotativo (250 rpm) a 27°C durante 6,5 h em tubos de teste de 40 ml contendo 2 ml de meio de fermentação.

Depois do cultivo, uma quantidade acumulada de L-histidina no meio de cultura foi determinada por cromatografia em papel. A composição da fase móvel é como se segue: butanol:acetato:água = 4:1:1 (v/v). Uma solução (0,5%) de ninidrina em acetona foi utilizada como um reagente de visualização. Os resultados são apresentados na tabela 3.

Composição do meio de fermentação (g/l):

15	Carboidratos	100,0
	Mameno (hidrolisado de proteína de soja)	0,2 de TN
	L-treonina	0,8
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	25,0
20	K_2HPO_4	2,0
	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1,0
	$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,01
	$\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,01
	Tiamina HCl	0,001
25	Betaína	2,0
	CaCO_3	6,0

Glucose, L-treonina e sulfato de magnésio são esterilizados separadamente. CaCO_3 seco por aquecimento é esterilizado a 110°C durante 30 minutos. O pH é ajustado para 6,0 por KOH antes da esterilização.

Tabela 3

Carboidratos			OD ₄₅₀	L-histidina g/l
D-glucose	L-arabinose	D-xilose		
10%	-	-	33,8	13,0
-	10%	-	30,5	14,2
-	-	10%	sem crescimento	-
5%	5%	-		13,6
5%	-	5%		7,8
5%	2,5%	2,5%		10,2
5%	1,25%	3,75%		6,6
5%	3,75%	1,25%		13,9
2,5%	3,75%	3,75%		9,0

Pode ser visto da tabela 3, que a cepa 80 de *E. coli* produtora de L-histidina poderia utilizar eficientemente os açúcares de pentose na mistura com glucose e produzir L-histidina em quantidade comparável com a 5 quantidade de L-histidina produzida por fermentação utilizando somente glucose.

Exemplo 3: Produção de L-treonina pela bactéria produtora de L-treonina em fermentação de mistura de glucose e pentoses.

A cepa TDH6/pVIC40 (VKPM B-3996) de *E. coli* produtora de 10 L-treonina foi utilizada como uma cepa para a produção de L-treonina por fermentação de uma mistura de glucose e pentoses. A cepa TDH6/pVIC40 de *E. coli* é descrita em detalhes na patente US de número 5.175.107.

Para obter-se a cultura de semente, a cepa foi cultivada em um agitador rotativo (250 rpm) a 32°C durante 18 h em tubos de teste de 40 ml 15 (diâmetro de 18 mm) contendo 2 ml de caldo L com 4% de glucose. Então o meio de fermentação foi inoculado com 2 mililitros (5%) de material de semente. A fermentação foi executada em um agitador rotativo (250 rpm) a 32°C durante 24 h em tubos de teste de 40 ml contendo 2 ml de meio de fermentação.

20 Depois do cultivo, uma quantidade acumulada de L-treonina no meio foi determinada por TLC. As placas Sorbfil (Stock Company Sorbpolymer, Krasnodar, Rússia) foram desenvolvidas com uma fase móvel: propan-3-ol: acetona: água: amônia aquosa a 25% = 25:25:7:6 (v/v). Uma

solução (2%) de ninidrina em acetona foi utilizada como um reagente de visualização. Os resultados (dados de pelo menos três experiências independentes) são apresentados na tabela 4.

Composição do meio de fermentação (g/l):

5	Carboidratos	40,0
	(NH ₄) ₂ SO ₄	10,0
	K ₂ HPO ₄	1,0
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,4
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,02
10	MnSO ₄ ·5H ₂ O	0,02
	Tiamina HCl	0,0002
	Extrato de levedura	1,0
	CaCO ₃	20,0
15	Glucose e sulfato de magnésio foram esterilizados separadamente. CaCO ₃ seco por aquecimento foi esterilizado a 180°C durante 2 h. O pH foi ajustado em 7,0. Foi introduzido um antibiótico no meio, depois da esterilização.	

Tabela 4

Carboidratos			OD ₄₅₀	L-treonina g/l
D-glucose	L-arabinose	D-xilose		
4%	-	-	13,8 ± 0,5	14,1 ± 1,0
-	4%	-	15,8 ± 0,2	14,9 ± 0,4
-	-	4%	13,1 ± 0,1	16,6 ± 0,1
2%	2%	-	13,7 ± 0,2	15,9 ± 0,3
2%	-	2%	14,2 ± 0,5	14,5 ± 1,1
2%	1%	1%	13,3 ± 0,4	15,8 ± 0,6
1%	2%	1%	14,6 ± 0,3	16,6 ± 0,8
1%	1%	2%	15,6 ± 0,7	12,4 ± 1,9

Pode ser visto da tabela 4, que a cepa TDH6/pVIC40 de *E. coli* produtora de L-treonina poderia utilizar eficientemente açúcares de pentose na mistura com glucose e produzir L-treonina em uma quantidade comparável com a quantidade de L-treonina produzida por fermentação utilizando-se somente a glucose.

Exemplo 4: produção de L- triptofano pela bactéria produtora de L-triptofano em fermentação de mistura de glucose e pentoses.

A cepa SV164 (pGH5) de *E. coli* produtora de triptofano foi utilizada como uma cepa para a produção de triptofano por fermentação de mistura de glucose e pentoses. A cepa SV164 (pGH5) é descrita em detalhes na patente US de número 6.180.373 ou na patente europeia de número 0662143.

Para obter-se a cultura de semente, a cepa0 foi cultivada em um agitador rotativo (250 rpm) a 37°C durante 18 h em tubos de teste de 40 ml (diâmetro de 18 mm) contendo 3 ml de caldo L com 4% de glucose e suplementado com 20 µg/ml de tetraciclina (marcador do plasmídeo pGH5). Então 3 ml de meio de fermentação contendo tetraciclina (20 µg/ml) em tubos de teste de 20 x 200 mm foram inoculados por 0,3 ml das culturas obtidas e cultivados a 37°C durante 48 h com um agitador rotativo a 250 rpm.

A composição do meio de fermentação é apresentada na tabela 5.

15 **Tabela 5**

Seções	Componente	Concentração final, g/l
A	KH ₂ PO ₄	1,5
	NaCl	0,5
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5
	L-Metionina	0,05
	L-Fenilalanina	0,1
	L-Tirosina	0,1
	Mameno (N total)	0,07
B	Glucose	40,0
	MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,3
C	CaCl ₂	0,011
D	FeSO ₄ x 7H ₂ O	0,075
	Citrato de sódio	1,0
E	Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,00015
	H ₃ BO ₃	0,0025
	CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,00007
	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,00025
	MnCl ₂ x 4H ₂ O	0,0016
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,0003
	HCl de tiamina	0,005
F	CaCO ₃	30,0
G	Piridoxina	0,03

A seção A tinha um pH de 7,1 ajustado por NH₄OH. Cada seção foi esterilizada em separado.

Depois do cultivo, a quantidade de triptofano acumulada no meio foi determinada por TLC. Foram utilizadas placas de TLC de 10 x 15 cm revestidas com camadas de 0,11 mm de sílica gel Sorbfil sem indicador fluorescente (Stock Company Sorbpolymer, Krasnodar, Rússia). As placas 5 Sorbfil foram desenvolvidas com uma fase móvel: propan-2-ol:acetato de etila: amônia aquosa a 25%:água = 40:40:7:16 (v/v). Uma solução (2%) de ninidrina em acetona foi utilizada como um reagente de visualização. Os dados obtidos (dados de pelo menos três experiências independentes) são apresentados na tabela 6.

10 **Tabela 6**

Carboidratos			OD ₅₆₀	L-triptofano g/l
D-glucose	L-arabinose	D-xilose		
4%	-	-	10,5 ± 0,1	4,7 ± 0,2
-	4%	-	1,6 ± 0,1	traços
-	-	4%	0,7 ± 0,1	traços
2%	2%	-	9,1 ± 1,0	5,2 ± 0,1
2%	-	2%	9,1 ± 0,2	3,8 ± 0,1
-	2%	2%	6,2 ± 1,1	0,9 ± 0,1
1,33%	1,33%	1,33%	9,2 ± 0,3	4,4 ± 0,1
0,4%	1,8%	1,8%	3,6 ± 0,2	3,8 ± 0,1

Pode ser visto da tabela 6, que a cepa SV164 (pGH5) de E. coli produtora de L-triptofano poderia utilizar eficientemente os açúcares de pentose na mistura com glucose e produzir L-triptofano em quantidade comparável com a quantidade de L-triptofano produzida por fermentação 15 utilizando somente glucose.

Embora a invenção tenha sido descrita com referência a realizações preferidas da mesma, ficará aparente para uma pessoa adestrada na técnica que várias modificações podem ser feitas, e utilizados equivalentes, sem se afastar do escopo da invenção. Cada um dos documentos mencionados 20 anteriormente, incluindo o documento de prioridade estrangeira, RU 2003105269, são incorporados aqui como referência na sua integridade.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para produzir um L-aminoácido, caracterizado pelo fato de que compreende o cultivo da bactéria produtora do L-aminoácido, e a extração do L-aminoácido do meio de cultura,

5 em que o meio de cultura contém uma mistura de açúcares de glicose e pentose,

em que a proporção de açúcares de glicose e pentose é de 10:0,5 a 10:50, e

10 em que a bactéria é capaz de produzir e acumular, no meio de cultura, uma quantidade não menor do que 0,5 g/L do L-aminoácido.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que os açúcares de pentose são arabinose e xilose.

15 3. Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a mistura de açúcares é uma matéria-prima de mistura de açúcares obtida de biomassa celulósica.

4. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a bactéria produtora do L-aminoácido é a bactéria pertencente ao gênero *Escherichia*.

20 5. Processo de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a bactéria produtora do L-aminoácido é modificada para ter uma taxa aumentada de utilização de açúcares de pentose.

6. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o L-aminoácido é L-isoleucina.

25 7. Processo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a bactéria tem uma expressão aumentada do gene pela biossíntese de L-isoleucina.

8. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o L-aminoácido é L-histidina.

9. Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado

pelo fato de que a bactéria tem uma expressão aumentada do gene pela biossíntese de L-histidina.

10. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o L-aminoácido é L-treonina.

5 11. Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a bactéria tem uma expressão aumentada dos genes para biossíntese de L-treonina.

12. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o L-aminoácido é L-triptofano.

10 13. Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a bactéria tem uma expressão aumentada dos genes para biossíntese de L-triptofano.

RESUMO**“PROCESSO PARA PRODUZIR UM L-AMINOÁCIDO”**

É apresentado um processo para a produção de um L-aminoácido, como L-isoleucina, L-histidina, L-treonina e L-triptofano, 5 utilizando uma bactéria que pertence ao gênero Escherichia, que compreende o cultivo da bactéria produtora do L-aminoácido em um meio de cultura e a extração do L-aminoácido do meio de cultura, onde o meio de cultura contém uma mistura de açúcares de glucose e pentose, como arabinose e xilose.