



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

(11) PI 1100666-8 B1



(22) Data do Depósito: 12/01/2011

(45) Data de Concessão: 13/10/2020

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

(51) Int.Cl.: C12P 13/04.

(30) Prioridade Unionista: 15/01/2010 RU 2010101136.

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

(72) Inventor(es): EKATERINA ALEKSEEVNA SAVRASOVA; SHUNSUKE YAMAZAKI; KAZUHIRO TAKUMI; NATALIA VIKTOROVNA STOYNOVA; GEN NONAKA.

(57) Resumo: MÉTODO PARA PRODUZIR UM L-AMINOÁCIDO É descrito um método para produzir um L-aminoácido usando uma bactéria da família Enterobacteriaceae, em que a bactéria contém uma proteína que é capaz de conferir resistência à inibição do crescimento por L-cisteína.

“MÉTODO PARA PRODUZIR UM L-AMINOÁCIDO”

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Campo técnico

5 A presente invenção diz respeito à indústria microbiológica e, especificamente, a um método para produzir um L-aminoácido usando uma bactéria da família *Enterobacteriaceae* que apresenta uma proteína derivada de uma bactéria que pertence ao gênero *Pantoea*, e a proteína é capaz de conferir resistência à cisteína.

Descrição da técnica relacionada

10 De maneira convencional, L-aminoácidos são produzidos industrialmente por métodos de fermentação que utilizam cepas de microrganismos obtidas de fontes naturais, ou mutantes destas. Tipicamente, os microrganismos são modificados para melhorar os rendimentos da produção de L-aminoácidos.

15 Muitas técnicas para melhorar os rendimentos da produção de L-aminoácido foram relatadas, incluindo transformação de microrganismos com DNA recombinante (patente US 4.278.765). Outras técnicas para melhorar os rendimentos da produção incluem aumentar as atividades de enzimas envolvidas na biossíntese de aminoácidos e/ou
20 dessensibilização das enzimas alvo para a inibição da retroalimentação pelo L-aminoácido resultante (patentes US 4.346.170, 5.661.012 e 6.040,160).

É revelada uma nova cepa microbiana que é adequada para a produção fermentativa de L-cisteína, L-cistina, N-acetil-serina que é produzida a partir da conversão não enzimática de derivados de O-acetil-L-serina, e/ou tiazolidina. Esta nova cepa superexpressa pelo menos um gene
25 que codifica uma proteína que medeia liberação celular de antibióticos ou outras substâncias que são tóxicas para o microrganismo (EP 0885962).

Um fragmento cromossômico foi identificado em um banco de genes de *Escherichia coli*, que é capaz de aumentar o rendimento de

cisteína em uma cepa de produção industrial. A subclonagem e análise genética mostraram que um quadro de leitura aberto que codifica um produto de 299 aminoácidos, denominado Orf299, foi o responsável. O Orf299 foi sintetizado no sistema polimerase/promotor T7 e exibiu as propriedades de uma proteína de membrana integral. Estes resultados indicaram adicionalmente que ORF299 codifica uma bomba de exportação responsável por excretar diferentes metabólitos da via da cisteína (Dassler T. et al, Mol. Microbiol.; 36 (5):1101-12(2000).

Descobriu-se que o gene ORF yfiK é capaz de aumentar a produção de cisteína quando superexpresso em uma cepa de produção de *E. coli* industrial. O produto do gene yfiK é uma proteína de membrana integral com cerca de seis hélices transmembranas preditas, e que pertence à família RhtB de proteínas de exportação. A superprodução de YfiK a partir de um plasmídeo leva a secreção evidente e paralela de O-acetil-L-serina e cisteína no meio, mas apenas quando o organismo possui uma serina transacetilase que é insensível à inibição da retroalimentação por cisteína. Quando O-acetil-L-serina em excesso é adicionada ao meio, este requisito para a presença de uma serina transacetilase insensível à retroalimentação durante a secreção de cisteína pode ser evitado tanto no transformante que carrega yfiK quanto na cepa tipo selvagem. Um mutante yfiK delta não mostrou nenhum fenótipo e nem foi capaz de exportar O-acetil-L-serina e cisteína quando transformado com um plasmídeo que carrega ydeD, um exportador alternado, previamente caracterizado, O-acetil-L-serina/cisteína. Uma vez que um mutante duplo ydeDK mostrou o mesmo padrão, parece que YfiK e YdeD agem independentemente. A necessidade da célula regular o tamanho da estrutura interna de O-acetil-L-serina por meio da síntese de proteínas exportadoras pode estar relacionada ao fato deste composto (quando suprido externamente) inibe o crescimento. A superexpressão tanto de ydeD quanto de yfiK alivia esta inibição e

aumenta a resistência a azaserina, que é um análogo de O-acetil-L-serina (Franke I et.al., J Bacteriol.;185(4):1161-6(2003)).

A montagem do citocromo bd e citocromos periplasmáticos de *E. coli* exige o transportador CydDC do cassete de ligação de ATP, cujo substrato é conhecido. A comparação de SDS-PAGE bidimensional do periplasma de cepas tipo selvagem e mutante *cydD* revelou que a última é deficiente em várias proteínas de ligação de transporte periplásmico, mesmo apesar de nenhuma proteína principal simples estar ausente no periplasma de *cydD*. Ao contrário, CydDC exporta a partir do citoplasma para o aminoácido cisteína do periplasma, o que pode ser demonstrado adicionalmente usando vesículas de membrana revertidas que transportam cisteína radiomarcada para dentro de uma maneira independente não acoplada ATP-dependente. Novos fenótipos de *cydD* pleiotrópicos foram relatados, incluindo aqueles com sensibilidade a benzilpenicilina e ditiotreitol, e aqueles com perda de mobilidade. Estes dois fenótipos estão de acordo com defeitos periplasmáticos na formação de ligação de dissulfeto. A presença de cisteína exógena foi capaz de reverter estes fenótipos e afetar os níveis de citocromos periplasmáticos tipo c nas cepas *cydD* e tipo selvagem, mas não de restaurar citocromo d. De acordo com CydDC, que é um exportador de cisteína, o mutante *cydD* crescido foi hipersensível a altas concentrações de cisteína e produziu maiores níveis de cisteína citoplasmáticos, assim como foi um mutante defeitivo em ORF299 que codificou um transportador da principal superfamília facilitadora. Um mutante duplo *cydD* ORF299 foi extremamente sensível à cisteína e apresentou maiores níveis de cisteína citoplasmáticos, ao passo que a superexpressão CydDC conferiu resistência a altas concentrações de cisteína extracelular. Parece que provavelmente o CydDC é responsável pela exportação de cisteína, que é crucial para homeostase redox no periplasma (Pittman M.S. et al., J Biol Chem.;277(51):49841-9(2002)).

Além de YdeD e YfiK, que foram previamente relatados como proteínas exportadoras de L-cisteína em *E. coli*, foi analisado o efeito de 33 genes transportadores putativos de medicamento em *E. coli* na exportação e superprodução de L-cisteína. A superexpressão dos genes

5 acrD, acrEF, bcr, cusA, emrAB, emrKY, ybjYZ e yojIH reverteu a inibição do crescimento de células e *E. coli* com tnaA interrompido por L-cisteína. O gene tnaA é o principal gene de cisteína dessulfidrase. Observa-se que a superexpressão destes oito genes reduz níveis intracelulares de L-cisteína após cultivo na presença de L-cisteína. Ensaio de transporte de aminoácido

10 mostraram que a superexpressão de Bcr, que confere resistência à biciclomicina e tetraciclina, promove especificamente a exportação de L-cisteína dirigida pela energia gerada a partir do gradiente de prótons. Quando uma cepa de *E. coli* com tnaA interrompido que expressa o gene cysE alterado foi transformado com um plasmídeo que carrega o gene bcr, o

15 transformante produziu mais L-cisteína do que as células que carregam apenas o vetor. Um ensaio com gene repórter sugeriu que o gene bcr é expresso de maneira constitutiva em níveis substanciais. Estes resultados indicam que o transportador Bcr de multi-medicamentos na principal família facilitadora está envolvido na exportação e superprodução de L-

20 cisteína em células de *E. coli* geneticamente modificadas (Yamada S. et al., Appl Environ Microbiol.;72(7):4735-42 (2006)).

Mas, atualmente, não existe nenhum relato de uso de uma bactéria com uma proteína derivada de bactérias que pertencem ao gênero *Pantoea*, e que é capaz de conferir resistência à inibição do crescimento por

25 L-cisteína na bactéria, com o propósito de produzir L-aminoácidos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Os aspectos do assunto em questão revelados atualmente podem incluir melhorar a produtividade de cepas produtoras de L-aminoácidos e fornecer um método para produzir L-aminoácidos não

aromáticos e aromáticos usando estas cepas.

Os aspectos anteriores foram atingidos pela descoberta de que uma atividade protéica que confere a uma bactéria resistência à inibição do crescimento por L-cisteína pode resultar na melhora da produção de L-aminoácidos, tais como L-treonina, L-lisina, L-cisteína, L-metionina, L-leucina, L-isoleucina, L-valina, L-histidina, glicina, L-serina, L-alanina, L-asparagina, ácido L-aspártico, L-glutamina, ácido L-glutâmico, L-prolina, L-arginina, L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano.

A presente invenção fornece uma bactéria da família *Enterobacteriaceae* com uma maior capacidade para produzir aminoácidos, tais como L-treonina, L-lisina, L-cisteína, L-metionina, L-leucina, L-isoleucina, L-valina, L-histidina, glicina, L-serina, L-alanina, L-asparagina, ácido L-aspártico, L-glutamina, ácido L-glutâmico, L-prolina, L-arginina, L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano.

É um aspecto da presente invenção fornecer um método para produzir um L-aminoácido que compreende cultivar uma bactéria da família *Enterobacteriaceae* em um meio de cultura, e coletar o L-aminoácido do meio de cultura, em que a bactéria é capaz de produzir L-aminoácido, e foi modificada para aumentar uma atividade de uma proteína que é capaz de conferir a uma bactéria resistência à inibição do crescimento por L-cisteína, em que a dita proteína é selecionada do grupo que consiste em:

(A) a proteína de SEQ ID NO: 2; ou sua variante, e

(B) a proteína de SEQ ID NO: 4; ou sua variante.

É um aspecto adicional da presente invenção fornecer o método da maneira descrita anteriormente, em que a expressão de um DNA que codifica a dita proteína na dita bactéria é melhor.

É um aspecto adicional da presente invenção fornecer o método da maneira descrita anteriormente, em que a dita bactéria é

transformada com um DNA que codifica a dita proteína.

É um aspecto adicional da presente invenção fornecer o método da maneira descrita anteriormente, em que o DNA é selecionado do grupo que consiste nos genes c0011 e d0663.

5 É um aspecto adicional da presente invenção fornecer o método da maneira descrita anteriormente, em que a bactéria foi modificada para aumentar pelo menos uma atividade da proteína (B) ou sua variante, e foi modificada adicionalmente para aumentar a expressão de um DNA que codifica a proteína de SEQ ID NO: 6; ou sua variante.

10 É um aspecto adicional da presente invenção fornecer o método da maneira descrita anteriormente, em que o DNA é o gene c09478.

É um aspecto adicional da presente invenção fornecer o método da maneira descrita anteriormente, em que a bactéria pertence ao gênero *Escherichia*.

15 É um aspecto adicional da presente invenção fornecer o método da maneira descrita anteriormente, em que a bactéria pertence ao gênero *Pantoea*.

É um aspecto adicional da presente invenção fornecer o método da maneira descrita anteriormente, em que a bactéria é *Escherichia coli*.

20 É um aspecto adicional da presente invenção fornecer o método da maneira descrita anteriormente, em que a bactéria é *Pantoea ananatis*.

É um aspecto adicional da presente invenção fornecer o método da maneira descrita anteriormente, em que o dito L-aminoácido é selecionado do grupo que consiste em um L-aminoácido aromático e um L-aminoácido não aromático.

25 É um aspecto adicional da presente invenção fornecer o método da maneira descrita anteriormente, em que o dito L-aminoácido

aromático é selecionado do grupo que consiste em L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano.

É um aspecto adicional da presente invenção fornecer o método da maneira descrita anteriormente, em que o dito L-aminoácido não aromático é selecionado do grupo que consiste em L-treonina, L-lisina, L-cisteína e derivados de L-cisteína, L-metionina, L-leucina, L-isoleucina, L-valina, L-histidina, glicina, L-serina, L-alanina, L-asparagina, ácido L-aspártico, L-glutamina, ácido L-glutâmico, L-prolina, L-arginina e O-acetil-L-serina.

É um aspecto adicional da presente invenção fornecer o método da maneira descrita anteriormente, em que o dito L-aminoácido é selecionado do grupo que consiste em L-cisteína, L-valina, L-leucina, L-Isoleucina, L-treonina, ácido L-glutâmico, L-glicina, L-alanina, L-histidina e O-acetil-L-serina.

A presente invenção é descrita em detalhes a seguir.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DOS DESENHOS

A figura 1 mostra curvas de crescimento de cepas que carregam os plasmídeos pSTV-c0011PF e pSTV-PA36ccd em um meio contendo cisteína.

DESCRIÇÃO DAS MODALIDADES EXEMPLARES

1. Bactéria

A bactéria pode ser uma bactéria da família *Enterobacteriaceae* produtora de L-aminoácido, em que a bactéria apresenta uma proteína derivada de bactérias que pertencem ao gênero *Pantoea*, e a dita proteína é capaz de conferir resistência à inibição do crescimento por L-cisteína.

O termo "bactéria produtora de L-aminoácido" pode significar uma bactéria que apresenta uma capacidade para produzir e excretar um L-aminoácido em um meio, quando a bactéria é cultivada no

meio.

O termo "bactéria produtora de L-aminoácido" também pode significar uma bactéria que é capaz de produzir e causar acúmulo de um L-aminoácido em um meio de cultura em uma quantidade maior que uma
 5 cepa tipo selvagem ou parental de *E. coli*, tal como *E. coli* K-12 e, preferivelmente, pode significar que o microrganismo é capaz de causar acúmulo em um meio de uma quantidade não menor que 0,5 g/L e, em uma outra modalidade, não menor que 1,0 g/L, do L-aminoácido alvo. A palavra "L-aminoácido" pode incluir L-alanina, L-arginina, L-asparagina, ácido L-
 10 aspártico, L-cisteína, ácido L-glutâmico, L-glutamina, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L-tirosina, L-valina e O-acetil-L-serina.

O termo "L-aminoácido aromático" pode incluir L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano. O termo "L-aminoácido não
 15 aromático" pode incluir L-treonina, L-lisina, L-cisteína e derivados de L-cisteína, L-metionina, L-leucina, L-isoleucina, L-valina, L-histidina, glicina, L-serina, L-alanina, L-asparagina, ácido L-aspártico, L-glutamina, ácido L-glutâmico, L-prolina, L-arginina e O-acetil-L-serina. L-treonina, L-lisina, L-cisteína, L-leucina, L-histidina, ácido L-glutâmico, L-
 20 fenilalanina, L-triptofano, L-prolina, L-arginina e O-acetil-L-serina são outras modalidades.

Algumas das L-cisteínas produzidas pela bactéria podem mudar para L-cistina no meio para a formação de uma ligação de dissulfeto. S-sulfocisteína pode ser gerada pela reação de L-cisteína e
 25 ácido tiosulfúrico, que estão ambos presentes no meio (Szczepkowski T. W., Nature, vol. 182 (1958)). Quando a S-sulfocisteína é produzida no meio, ela pode ser convertida em L-cisteína por redução com um agente redutor tal como ditiotreitól. Além do mais, a L-cisteína que é gerada nas células bacterianas pode ser condensada com uma cetona, aldeído ou, por

exemplo, ácido pirúvico, que também está presente nas células, para produzir um derivado de tiazolidina por meio do hemitiocetal intermediário (refere-se a RU Japonesa 2992010). O derivado de tiazolidina e hemitiocetal pode existir como uma mistura equilibrada.

5 Quando um derivado de tiazolidina de L-cisteína é produzido no meio, a L-cisteína pode ser produzida coletando o derivado de tiazolidina do meio para romper o equilíbrio da reação entre o derivado de tiazolidina e L-cisteína, de maneira tal que a L-cisteína seja produzida em excesso. Portanto, a capacidade de produzir L-cisteína não é limitada à capacidade
10 de acumular apenas L-cisteína no meio ou células, mas também inclui a capacidade de acumular L-cistina ou derivados destas, tal como S-sulfocisteína, um derivado de tiazolidina, um hemitiocetal, ou um mistura destes no meio.

Alguns dos derivados de L-cisteína, tais como γ -
15 glutamilcisteína, glutathione, cistationina, homocisteína, metionina, e S-adenosilmetionina, por exemplo, podem ser biossintetizados a partir de cisteína como um importante material de partida. Os derivados de L-cisteína também podem incluir metilcisteína, etilcisteína, carbocisteína, sulfocisteína, acetilcisteína, e assim por diante. A L-cisteína obtida da
20 maneira descrita anteriormente pode ser usada para produzir estes derivados de L-cisteína.

A produção fermentativa destes compostos pode ser atingida usando os microrganismos produtores correspondentes como cepas hospedeiras com combinações de capacidade de super produzir
25 cisteína. Portanto, a capacidade de produzir L-cisteína inclui os compostos anteriores, tais como γ -glutamilcisteína, glutathione, cistationina, homocisteína, metionina, e S-adenosilmetionina, que produzem cisteína como um importante intermediário.

Para transmitir a capacidade de produzir os compostos

biossintetizados a partir de cisteína tais como γ -glutamilcisteína, glutathione, cistationina, homocisteína, metionina e S-adenosilmetionina, métodos empregados de maneira convencional na reprodução de bactérias corineformes ou bactérias do gênero *Escherichia* (ver "Amino Acid Fermentation", Gakkai Shuppan Center (Ltd.), 1ª Edição, publicado em 30 de maio de 1986, pp. 77-100) podem ser usados. Tais métodos incluem produzir um microrganismo com as propriedades de um mutante auxotrófico, uma cepa resistente análoga, ou um mutante de regulação metabólica, ou construir uma cepa recombinante, de maneira tal que ela superexpresse uma enzima de biossíntese correspondente. Diminuir as atividades de enzimas que catalisam as reações que ramificam a via principal, e/ou estão envolvidas na degradação de um composto correspondente ou seus intermediários, também pode ser efetivo no aumento do produto. Aqui, na reprodução de cada uma das bactérias produtoras, uma ou mais das propriedades descritas anteriormente podem ser transferidas. A expressão de enzima(s) de biossíntese correspondente(s) pode ser melhor sozinha ou em combinações de duas ou mais. Além do mais, a transferência de propriedades, tais como uma mutação auxotrófica, resistência análoga, ou mutação de regulação metabólica, podem ser combinadas com os métodos de melhorar as enzimas de biossíntese.

A frase "bactéria que apresenta uma resistência à inibição do crescimento por L-cisteína" pode significar uma bactéria derivada de uma cepa de bactéria como a cepa mãe, e que apresenta propriedades genéticas de maneira tal que ela possa crescer em um meio contendo a L-cisteína. Um meio sólido pode ser usado.

A bactéria que é resistente à inibição do crescimento por L-cisteína mostra crescimento mais favorável comparado com a cepa mãe, quando cultivada em um meio contendo a L-cisteína. Por exemplo, uma bactéria que pode formar colônias em 20 horas de cultivo a 34 °C em placas

com meio mínimo M9 contendo 50 μ M ou mais, ou em um outro exemplo, 200 μ M de L-cisteína, pode ser resistente à L-cisteína.

As cepas que carregam os genes da maneira descritos anteriormente, que podem crescer mais rápido do que a cepa controle em um meio contendo 50 μ M L-cisteína, ou em um outro exemplo 200 μ M, indicam que este gene ou locus gênico pode conferir resistência a cisteína.

A família *Enterobacteriaceae* inclui bactérias que pertencem aos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Photorhabdus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Morganella*, *Yersinia*, etc. Especificamente, podem ser usados aqueles classificados na família *Enterobacteriaceae* de acordo com a taxonomia usada pela base de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/TaxonomyBrowser/wwwtax.cgi?id=91347>).

Uma bactéria que pertence ao gênero *Escherichia* ou *Pantoea* pode ser usada. A frase "uma bactéria que pertence ao gênero *Escherichia*" pode significar que a bactéria é classificada no gênero *Escherichia*, de acordo com a classificação conhecida pelos versados na técnica de microbiologia. Exemplos de uma bactéria que pertence ao gênero *Escherichia* podem incluir, mas sem limitação, *Escherichia coli* (*E. coli*). A bactéria que pertence ao gênero *Escherichia* é particularmente não limitada, entretanto, por exemplo, bactérias descritas por Neidhardt, F.C. et al. (*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1208, Tabela 1) podem ser usadas.

A frase "uma bactéria que pertence ao gênero *Pantoea*" pode significar que a bactéria é classificada como o gênero *Pantoea*, de acordo com a classificação conhecida pelos versados na técnica de microbiologia. Algumas espécies de *Enterobacter agglomerans* foram recentemente reclassificadas em *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*, *Pantoea stewartii* ou similares, com base na análise da sequência de

nucleotídeos de RNAr 16S, etc (International Journal of Systematic Bacteriology, Julho de 1989, 39(3).p.337-345). Além do mais, algumas bactérias que pertencem ao gênero *Erwinia* foram reclassificadas como *Pantoea ananatis* ou *Pantoea stewartii* (International Journal of Systematic Bacteriology, Jan. 1993, 43 (1), pp.162-173). Cepas típicas da bactérias *Pantoea* incluem, mas sem limitação, *Pantoea ananatis*, *Pantoea stewartii*, *Pantoea agglomerans* e *Pantoea citrea*. Exemplos específicos incluem as cepas a seguir: *Pantoea ananatis* AJ13355 (FERM BP-6614, publicação de patente EP 0952221), *Pantoea ananatis* AJ 13356 (FERM BP-6615, publicação de patente EP 0952221), *Pantoea ananatis* AJ 13601 (FERM BP-7207, publicação de patente EP 0952221), *Pantoea ananatis* SC17 (FERM BP-11091, publicação de patente EP 0952221). Uma cepa resistente λ -Red é *Pantoea ananatis* SC17(0) (VKPM B-9246, aplicação RU 2006134574). A cepa SC17 foi depositada no National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depository (address: Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japão) em 4 de fevereiro de 2009 no Budapest Treaty, e determinado um número de acesso de FERM BP-11091. A cepa SC17(0) foi depositada no Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM), GNII Genetika (address: Russia, 117545 Moscou, 1 Dorozhny proezd. 1) em 21 de setembro de 2005 com um número de acesso de VKPM B-9246, e então convertida para depósito internacional no Budapest Treaty em 13 de outubro de 2006.

De acordo com o assunto em questão aqui revelado, uma bactéria da família *Enterobacteriaceae* é modificada para aumentar uma atividade da proteína com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 ou sua variante, ou a proteína com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, ou sua variante, ou ou atividades de destas duas proteínas.

Em uma modalidade do assunto em questão aqui revelado,

quando a bactéria foi modificada para aumentar pelo menos a proteína com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, ou sua variante, a bactéria é modificada adicionalmente para aumentar a expressão de um DNA que codifica a proteína de SEQ ID NO: 6; ou sua variante.

5 Exemplos da proteína que apresenta a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, ou sua variante, incluem o gene c0411. Exemplos da proteína que apresenta a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 ou sua variante incluem o gene c0663. Exemplos da proteína que apresenta a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 ou sua variante
10 incluem o gene c09478.

A sequência de nucleotídeos do gene c0011 da cepa *P. ananatis* SC17 e a sequência de aminoácidos de proteína codificada pelo gene c0011 são mostradas em SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO: 2, respectivamente.

15 A sequência de nucleotídeos do gene d0663 da cepa *P. ananatis* SC17 e a sequência de aminoácidos de proteína codificada pelo gene d0663 são mostradas em SEQ ID NO: 3 e SEQ ID NO: 4, respectivamente.

20 A sequência de nucleotídeos do gene c09478 da cepa *P. ananatis* SC17 e a sequência de aminoácidos de proteína codificada pelo gene c09478 são mostradas em SEQ ID NO: 5 e SEQ ID NO: 6, respectivamente.

25 Uma vez que podem existir algumas diferenças nas sequências de DNA entre os gêneros ou cepas da família *Enterobacteriaceae*, os genes c0011, d0663 e c09478 não são limitados aos genes mostrados em SEQ ID No:1, SEQ ID No:3 e SEQ ID No:5, mas podem incluir genes homólogos a SEQ ID No:1, SEQ ID No:3 e SEQ ID No:5.

O gene c0011 pode codificar a proteína putativa

transmembrana de *Klebsiella pneumoniae* (acesso ao GenBank número ABR77369.1), proteína hipotética KCO 01469 de *Citrobacter koseri* (acesso ao GenBank número ABV 12602.1), superfamília Permease (DMT) de *Acinetobacter baumannii* (acesso ao GenBank número ABO 12139.2), e
 5 proteína putativa de membrana de *Pseudomonas aeruginosa* (acesso ao GenBank número ABR86455.1).

O gene d0663 pode codificar a proteína exportadora de lisina (LYSE/YGGA) de *Erwinia tasmaniensis* (acesso ao GenBank número CA095150.1), proteína putativa de membrana de *Pectobacterium*
 10 *atrosepticum* (acesso ao GenBank número CAG76207.1), proteína de transporte provável de *Chromobacterium violaceum* (acesso ao GenBank número AAQ59575. 1), e proteína exportadora de lisina (LYSE/YGGA) de *Burkholderia vietnamiensis* (acesso ao GenBank número AB058107.1).

Portanto, a variação de proteína codificada por o genes c0011,
 15 d0663 e c09478 pode apresentar um homologia de não menos que 80 %, em um outro exemplo, não menos que 90 %, em um outro exemplo, não menos que 95 % ou, em um outro exemplo, não menos que 98 % e, em um outro exemplo, não menos que 99 %, com relação às sequências totais de aminoácidos mostradas em SEQ ID No:2, SEQ ID No:4, e SEQ ID No:6,
 20 respectivamente, enquanto a proteína confere resistência a cisteína. A frase "variação de proteína" pode significar proteínas que apresentam mudanças em suas sequências, quer estas mudanças sejam deleções, inserções, adições ou substituições de aminoácidos. Inúmeras mudanças nas variações de proteínas dependem da posição na estrutura tridimensional da proteína
 25 ou o tipo de resíduos de aminoácidos. Isto pode ser 1 a 30, em um outro exemplo, 1 a 15 e, em um outro exemplo, 1 a 5 em SEQ ID No:2, SEQ ID No:4 e SEQ ID No:6. Estas mudanças nas variações podem ocorrer em regiões da proteína que não são críticas para a estrutura tridimensional da proteína. Isto é em decorrência de alguns aminoácidos apresentarem alta

homologia com um outro e, assim, a estrutura tridimensional não é afetada por uma mudança como esta.

A homologia entre duas sequências de aminoácidos pode ser determinada usando métodos bem conhecidos, por exemplo, o programa de computador BLAST 2.0, que calcula três parâmetros: pontuação, identidade e similaridade. Neste pedido, "homologia" pode significar "identidade".

A substituição, deleção, inserção ou adição de um ou vários resíduos de aminoácidos pode ser mutação(s) conservativa(s), de maneira tal que a atividade seja mantida. Uma mutação conservativa representativa pode ser uma substituição conservativa. Exemplos de substituições conservativas incluem substituição de Ser ou Thr por Ala, substituição de Gin, His ou Lys por Arg, substituição de Glu, Gin, Lys, His ou Asp por Asn, substituição de Asn, Glu ou Gin por Asp, substituição de Ser ou Ala por Cys, substituição de Asn, Glu, Lys, His, Asp ou Arg por Gin, substituição de Asn, Gin, Lys ou Asp por Glu, substituição de Pro por Gly, substituição de Asn, Lys, Gin, Arg ou Tyr por His, substituição de Leu, Met, Val ou Phe por Ile, substituição de Ile, Met, Val ou Phe por Leu, substituição de Asn, Glu, Gin, His ou Arg por Lys, substituição de Ile, Leu, Val ou Phe por Met, substituição de Trp, Tyr, Met, Ile ou Leu por Phe, substituição de Thr ou Ala por Ser, substituição de Ser ou Ala por Thr, substituição de Phe ou Tyr por Trp, substituição de His, Phe ou Trp por Tyr, e substituição de Met, Ile ou Leu por Val.

Portanto, os genes c0011, d0663 e c09478 podem ser variações que hibridizam em condições hostis com a sequência de nucleotídeos mostradas em SEQ ID No: 1, SEQ ID No:3 e SEQ ID No:5, respectivamente, ou sondas que podem ser preparadas a partir destas sequências de nucleotídeos, contanto que uma proteína funcional seja codificada. "Condições hostis" incluem aquelas nas quais um híbrido

específico, por exemplo, um híbrido com homologia de não menos que 60 % e, em um outro exemplo, não menos que 70 % e, em um outro exemplo, não menos que 80 % e, em um outro exemplo, não menos que 90 % e, em um outro exemplo, não menos que 95 % e, em um outro exemplo, não menos que 98 % e, ainda em um outro exemplo, não menos que 99 %, é formado e um híbrido não específico, por exemplo, um híbrido com homologia menor que o anterior, não é formado. Por exemplo, condições hostis são exemplificadas lavando uma vez ou mais e, em um outro exemplo, duas ou três vezes, em uma concentração de sal de SDS 1 xSSC, 0,1 % e, em um outro exemplo, 0,1 x SSC, 0,1 %, a 60°C. A duração das lavagens depende do tipo de membrana usada para manchar e, via de regra, pode ser a que é recomendada pelo fabricante. Por exemplo, a recomendação a duração das lavagens para a membrana de náilon Hybond N+ (Amersham) em condições hostis é 15 minutos. A lavagem pode ser realizada 2 a 3 vezes. O comprimento da sonda pode ser selecionado adequadamente dependendo das condições de hibridização, e pode ser 100 bp to 1 kbp.

A frase "uma bactéria foi modificada para aumentar uma atividade de uma proteína" significa que a atividade da proteína na célula é maior comparada ao microrganismo não modificado, por exemplo, uma cepa parental ou tipo selvagem. A atividade da proteína pode ser maior na célula melhorando a expressão do gene que codifica a proteína.

Exemplos de tal modificação podem incluir aumentar o número de cópias de gene expresso por célula, aumentar o nível de expressão do gene, e assim por diante. A quantidade do número de cópias de um gene expresso pode ser medida, por exemplo, restringindo o DNA cromossômico seguido por Southern blotting usando uma sonda com base na sequência de genes, hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) e similares. O nível da expressão gênica pode ser medido por vários

métodos conhecidos incluindo Northern blotting, PCR-RT quantitativa e similares.

De maneira mais concreta, a melhora da expressão do gene c0011, d0663 ou c09478 pode ser obtida aumentando o número de cópias do gene c0011, d0663 ou c09478, modificando uma sequência regulatória de expressão do gene c0011, d0663 ou c09478, amplificando um gene que codifica um fator regulatório que é responsável por aumentar a expressão do gene c0011, d0663 ou c09478s, respectivamente, ou interrompendo ou enfraquecendo um gene que codifica um fator regulatório que é responsável por reduzir a expressão do gene c0011, d0663 ou c09478, respectivamente, usando uma transformação ou uma técnica de recombinação homóloga.

Por exemplo, um DNA recombinante pode ser preparado ligando um fragmento de gene contendo o gene c0011, d0663 ou c09478 a um vetor, preferivelmente um vetor multicópias, que pode se replicar no microrganismo hospedeiro, e introduzir o vetor resultante no microrganismo hospedeiro.

O número de cópias do gene c0011, d0663 ou c09478 também pode ser maior integrando cópias múltiplas do gene into um DNA cromossômico de um microrganismo. A fim de integrar cópias múltiplas do gene c0011, d0663 ou c09478 em um DNA cromossômico de um microrganismo, recombinação homóloga pode ser realizada alvejando uma sequência que existe em múltiplas cópias em um DNA cromossômico. O DNA repetitivo e invertido que se repete na extremidade de um transposon pode ser usado. Alternativamente, da maneira revelada em JP2-109985A, também é possível incorporar o gene c0011, d0663 ou c09478 em um transposon, e permitir que ele seja transferido de maneira tal que múltiplas cópias do gene sejam integradas no DNA cromossômico. A integração do gene c0011, d0663 ou c09478 no

cromossomo pode ser confirmada por hibridização do tipo southern usando uma sonda com uma sequência parcial dos genes c0011, d0663 ou c09478.

A melhora da expressão do gene c0011, d0663 ou c09478 também pode ser obtida substituindo uma sequência regulatória de expressão, incluindo um promotor do gene c0011, d0663 ou c09478, em um DNA cromossômico ou em um plasmídeo, por uma mais forte, da maneira descrita em W000/18935. Por exemplo, o promotor lac, promotor trp, promotor trc, promotor PL, e assim por diante, são conhecidos como promotores fortes. Além do mais, também é possível introduzir várias substituições de nucleotídeo em uma região promotora para o gene c0011, d0663 ou c09478, de maneira tal que o promotor é mais forte. Um método para avaliar o tamanho dos promotores e exemplos de promotores fortes são revelados em Goldstein et al. (Prokaryotic promoters in biotechnology. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 1995, 1, 105-128). Além do mais, sabe-se que uma sequência espaçadora entre o sítio de ligação do ribossomo (RBS) e códon de iniciação da tradução, especialmente vários nucleotídeos exatamente à montante do códon de iniciação, apresenta uma grande influência na eficiência da tradução. Portanto, esta sequência pode ser modificada. As sequências regulatórias de expressão dos genes c0011, d0663 e c09478 podem ser identificadas usando um vetor para identificação promotora ou software de análise genética tal como GENETYX. A expressão também pode ser melhorada prolongando o tempo de vida do RNAm. Além do mais, a atividade enzimática também pode ser maior prevenindo a degradação da proteína enzimática.

A fim de melhorar uma atividade da proteína codificada pelo gene c0011, d0663 ou c09478, uma mutação que aumenta uma capacidade de exportação de L-aminoácido pode ser introduzida no gene c0011, d0663 ou c09478. Exemplos de mutações que aumentam a atividade da proteína

codificada pelo gene c0011, d0663 ou c09478 (Proteína C0011, D0663 ou C09478) incluem uma mutação de sequência de promotor que aumenta a transcrição dos genes c0011, d0663 ou c09478, e uma mutação de região codificadora do gene c0011, d0663 ou c09478 que aumenta a atividade específica da proteína 00011, D0663 ou C09478 proteína.

Métodos de preparação de plasmídeo DNA, digestão e ligação de DNA, transformação, seleção de um oligonucleotídeo como um oligoiniciador e similares podem ser métodos típicos bem conhecidos pelos versados na técnica. Estes métodos são descritos, por exemplo, em Sambrook, J., Fritsch, E.F., e Maniatis, T., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

Bactérias produtora de L-aminoácido

Bactérias que são capazes de produzir tanto um L-aminoácido aromático quanto um não aromático podem ser usadas.

A bactéria pode ser obtida introduzindo um gene que codifica uma proteína capaz de conferir resistência a cisteína em uma bactéria, que apresenta inerentemente a capacidade para produzir L-aminoácidos. Alternativamente, a bactéria pode ser obtida transmitindo a capacidade para produzir L-aminoácidos a uma bactéria que já apresenta uma proteína capaz de conferir resistência a cisteína.

Bactérias que produzem L-treonina

Exemplos de cepas mães que podem ser usadas para produzir bactérias produtoras de L-treonina incluem, mas sem limitação, cepas que pertencem ao gênero *Escherichia*, tais como *E. coli* TDH-6/pVIC40 (VKPM B-3996) (patente US 5.175.107, patente US 5.705.371), *E. coli* 472T23/pYN7 (ATCC 98081) (patente US 5.631.157), *E. coli* NRRL-21593 (patente US 5.939.307), *E. coli* FERM BP-3756 (patente US 5.474.918), *E. coli* FERM BP-3519 e FERM BP-3520 (patente US

5.376.538), *E. coli* MG442 (Gusyatiner et al., Genetika (em russo), 14, 947-956 (1978)), *E. coli* VL643 e VL2055 (EP 1149911 A) e similares.

A cepa TDH-6 é deficiente no gene *thrC*, bem como é capaz de assimilar sacarose, e o gene *ilvA* apresenta uma mutação do tipo hipomórfica. Esta cepa também apresenta uma mutação no gene *rhtA*, que transmite resistência a altas concentrações de treonina ou homoserina. A cepa B-3996 contém o plasmídeo pVIC40 que foi obtido inserindo um operon *thrA**BC que inclui um gene *thrA* mutante em um vetor derivado de RSF 1010. Este gene *thrA* mutante codifica aspartoquinase homoserina desidrogenase I que apresenta substancialmente inibição desensibilizada da retroalimentação por treonina. A cepa B-3996 foi depositada em 19 de novembro de 1987 na All-Union Scientific Center de Antibiotics (Rússia, 117105 Moscou, Nagatinskaya Street 3-A) com o número de acesso RIA 1867. A cepa também foi depositada no Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (Rússia, 117545 Moscou, 1st Dorozhny proezd, 1) em 7 de abril de 1987 com o número de acesso B-3996.

E. coli VKPM B-5318 (EP 0593792B) também pode ser usada como um cepa mãe para produzir bactérias produtoras de L-treonina da presente invenção. A cepa B-5318 é prototrófica com relação a isoleucina e um repressor C1 de fago lambda sensível à temperatura e promotor PR substituem a região regulatória do operon treonina no plasmídeo pVIC40. A cepa VKPM B-5318 foi depositada no Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) em 3 de maio de 1990 com o número de acesso de VKPM B-5318.

A bactéria pode ser modificada adicionalmente para melhorar a expressão de um ou mais dos genes a seguir:

- o gene *thrA* mutante que codifica aspartoquinase homoserina desidrogenase I resistente a inibição da retroalimentação por treonina;

- o gene thrB que codifica homoserina quinase;
- o gene thrC que codifica treonina sintase;
- o gene rhtA que codifica uma proteína putativa transmembrana;
- 5 - o gene asd que codifica aspartato- β -semialdeído desidrogenase; e
- o gene aspC que codifica aspartato aminotransferase (aspartatotransaminase).

O gene thrA que codifica aspartoquinase homoserina desidrogenase I de *Escherichia coli* foi elucidado (posições de nucleotídeos 337 a 2799, acesso ao GenBank no.NC_000913.2, gi: 49175990). O gene thrA está localizado entre os thrL e thrB no cromossomo de *E. coli* K-12. O gene thrB que codifica homoserina quinase de *Escherichia coli* foi elucidado (posições de nucleotídeos 2801 a 3733, acesso ao GenBank no.NC_000913.2, gi: 49175990). O gene thrB está localizado entre os genes thrA e thrC no cromossomo de *E. coli* K-12. O gene thrC que codifica treonina sintase de *Escherichia coli* foi elucidado (posições de nucleotídeos 3734 a 5020, acesso ao GenBank no.NC_000913.2, gi: 49175990). O gene thrC está localizado entre o gene thrB e o quadro de leitura aberto yaaX no cromossomo de *E. coli* K-12. Todos os três genes funcionam como um único operon treonina. Para melhorar a expressão do operon treonina, a região atenuadora que afeta a transcrição pode ser removida do operon (W02005/049808, W02003/097839).

UM gene thrA mutante que codifica aspartoquinase homoserina desidrogenase I resistente a inibição da retroalimentação por treonina, bem como, os genes thrB e thrC podem ser obtidos como um operon do plasmídeo pVIC40 bem conhecido, que está presente na cepa de *E. coli* VKPM B-3996 produtora de treonina. Plasmídeo pVIC40 é descrito em detalhes na patente US 5.705.371.

O gene *rhtA* existe em 18 min no cromossomo de *E. coli* próximo ao *glnHPQ* operon, que codifica componentes do sistema de transporte de glutamina. O gene *rhtA* é idêntico ao ORF1 (gene *ybiF*, posições de nucleotídeos 764 a 1651, número de acesso ao GenBank
 5 AAA218541, gi:440181) e está localizado entre os genes *pexB* e *ompX*. A unidade que expressa uma proteína codificada pelo ORF1 designou o gene *rhtA* (*rht*: resistência a homoserina e treonina). Igualmente, revelou-se que a mutação *rhtA23* é uma substituição A por G na posição 1, com relação ao códon inicial ATG (Resumos do 17th International Congress of
 10 Biochemistry and Molecular Biology in conjugation with Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, São Francisco, Califórnia, 24-29 de agosto de 1997, resumo nº 457. EP 1013765 A).

O gene *asd* de *E. coli* já foi elucidado (posições de nucleotídeos 3572511 a 3571408, acesso ao GenBank no. NC 000913.1,
 15 gi:16131307), e pode ser obtido por PCR (reação em cadeia da polimerase; refere-se a White, T.J. et al., Trends Genet., 5, 185 (1989)) utilizando oligoiniciadores preparados com base na sequência de nucleotídeos do gene. O gene *asds* de outros microrganismos pode ser obtido de uma maneira similar.

20 Igualmente, o gene *aspC* de *E. coli* já foi elucidado (posições de nucleotídeos 983742 a 984932, acesso ao GenBank no. NC 000913.1, gi:16128895), e pode ser obtido por PCR. O gene *aspCs* de outros microrganismos pode ser obtido de uma maneira similar.

Bactérias produtoras de L-lisina

25 Exemplos de bactérias produtoras de L-lisina que pertencem ao gênero *Escherichia* incluem mutantes com resistência ao análogo de L-lisina. O análogo de L-lisina inibe o crescimento de bactérias que pertencem ao gênero *Escherichia*, mas esta inibição é total ou parcialmente dessensibilizada quando L-lisina está presente em um meio. Exemplos do

análogo de L-lisina incluem, mas sem limitação, oxalisina, hidroxamato de lisina, S-(2-aminoetil)-L-cisteína (AEC), γ -metilisina, α -clorocaprolactam, e assim por diante. Mutantes com resistência a estes análogos de lisina podem ser obtidos submetendo bactérias que pertencem
5 ao gênero *Escherichia* a um tratamento de mutagênese artificial convencional. Exemplos específicos de cepas bacterianas usadas para produzir L-lisina incluem *Escherichia coli* AJ11442 (FERM BP-1543, NRRL B-12185; ver patente US 4.346.170) e *Escherichia coli* VL611. Nestes microrganismos, a inibição da retroalimentação de aspartoquinase
10 por L-lisina é dessensibilizada.

A cepa WC 196 pode ser usada como uma bactéria *Escherichia coli* produtora de L-lisina. Esta cepa bacteriana foi reproduzida conferindo resistência a AEC à cepa W3110, que foi derivada de *Escherichia coli* K-12. A cepa resultante foi designada cepa *Escherichia coli* AJ 13069 e foi depositada no National Institute of Bioscience and
15 Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology (atualmente National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary, Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japão) em 6
20 de dezembro de 1994 e recebeu um número de acesso de FERM P-14690. A seguir, foi convertido em um depósito internacional nas provisões do Budapest Treaty em 29 de setembro de 1995, e recebeu um número de acesso de FERM BP-5252 (patente US 5.827.698).

Exemplos de cepas mães que podem ser usadas para
25 produzir bactérias produtoras de L-lisina também incluem cepas nas quais a expressão de um ou mais genes que codificam uma enzima biossintética de L-lisina é melhor. Exemplos de tais genes incluem, mas sem limitação, genes que codificam di-hidrodipicolinato sintase (dapA), aspartoquinase (lysC), di-hidrodipicolinato reductase (dapB), diamminopimelato decarboxilase

(lysA), diaminopimelato desidrogenase (ddh) (patente US 6.040.160), fosfoenolpiruvato carboxilase (ppc), aspartato semialdeído desidrogenase (asd), e aspartase (aspA) (EP 1253195 A). Além do mais, as cepas mães podem ter maior expressão do gene envolvido na eficiência de energia (cyo) (EP 1170376 A), do gene que codifica nicotinamida nucleotídeo transidrogenase (pntAB) (patente US 5.830.716), do gene ybjE (W02005/073390) ou combinações destes.

Exemplos de cepas mães que podem ser usadas para produzir bactérias produtoras de L-lisina também incluem cepas com atividade menor ou eliminada de uma enzima que catalisa uma reação que gera um composto, sem ser L-lisina, por ramificação da via biossintética de L-lisina. Exemplos de tais enzimas incluem homoserina desidrogenase, lisina decarboxilase (patente US 5.827.698), e a enzima málica (W02005/010175).

Bactérias produtoras de L-cisteína

Os exemplos de cepas mães que podem ser usadas para produzir bactérias produtoras de L-cisteína incluem, mas sem limitação, cepas que pertencem ao gênero *Escherichia*, tal como *E. coli* JM15 que é transformada com diferentes alelos *cysE*, que codificam serina acetiltransferases resistentes à retroalimentação (patente US 6.218.168, pedido de patente RU 2003121601); *E. coli* W3110 com genes superexpressos que codificam proteínas adequadas para selecionar substâncias tóxicas para células (patente US 5.972.663); cepas de *E. coli* cepas com menor atividade de cisteína dessulfidrase (JP 11155571A2); *E. coli* W3110 com maior atividade de um regulador transcricional positivo para regulação de cisteína codificada pelo gene *cysB* (WO0127307A1) e similares.

Bactérias que produzem derivados de L-cisteína

Exemplos de cepas mães que podem ser usadas para dar

origem a bactérias que produzem derivados de L-cisteína incluem, mas sem limitação, as cepas descritas a seguir. A capacidade para produzir γ -glutamilcisteína pode ser atingida, por exemplo, melhorando a atividade de γ -glutamilcisteína sintetase e/ou diminuindo a atividade de glutathione sintetase. A capacidade para produzir glutathione pode ser atingida melhorando a atividade de γ -glutamilcisteína sintetase e/ou glutathione sintetase. O uso de γ -glutamilcisteína sintetases mutantes que não são submetidos a inibição da retroalimentação por glutathione também pode conferir e/ou melhorar a capacidade para produzir glutathione. Métodos para produção microbiana de glutathione são sumarizados em Yin et al. (Yin Li, Gongyuan Wei, Jian Chen. Appl Microbiol Biotechnol (2004) 66: 233-242). A capacidade para produzir metionina pode ser atingida conferindo resistência à auxotrófico de L-treonina ou norleucina (Patente japonesa submetida à inspeção pública No.2000-139471). A inativação do repressor de metionina e/ou melhoria da via biossintética de metionina (isto é, homoserina O-succiniltransferase e cistationina γ -sintase) também podem ser efetivas em conferir e melhorar a capacidade para produzir metionina (Patente japonesa submetida à inspeção pública No.2000-139471). Além do mais, o uso de homoserina O-succiniltransferases mutantes que não são submetidas á inibição da retroalimentação por metionina também pode conferir e/ou melhorar a capacidade para produzir metionina. Uma vez que a cistationina e homocisteína são intermediários da biossíntese de metionina, parte dos métodos para produzir metionina descritos anteriormente pode ser aplicada para sua produção. Exemplos específicos para melhorara a produção de cistationina são descritos na patente JP submetida à inspeção pública No.2003-010654 (utilização de auxotrófico de metionina) e patente JP submetida à inspeção pública No.2005-16842 (suplemento de cisteína ou homoserina nos meios produtivos). Uma vez que a cistationina é uma

precursora de homocisteína, estes métodos podem ser aplicados à produção de homocisteína. A capacidade para produzir S-adenosilmetionina pode ser atingida melhorando metionina adenosiltransferase (patente EP No.0647712, patente EP No.1457569) e/ou MdfA em bomba de efluxo (patente US No.7410789).

L-leucina-bactérias produtoras

Exemplos de cepas mães que podem ser usadas para produzir bactérias produtoras de L-leucina incluem, mas sem limitação, cepas que pertencem ao gênero *Escherichia*, tais como *E. coli* resistente a leucina (por exemplo, a cepa 57 (VKPM B-7386, patente US 6,124,121)) ou análogos de leucina, incluindo (3-2-tienilalanina, 3-hidroxileucina, 4-azaleucina, 5,5,5-trifluoroleucina (JP 62-34397 B e JP 8-70879 A); cepas de *E. coli* obtidas pelo método de engenharia genética descrito em W096106926; *E. coli* H-9068 (JP 8-70879 A) e similares.

A bactéria pode ser melhor aumentando a expressão de um ou mais genes envolvidos na biossíntese de L-leucina. Exemplos incluem genes do operon *leuABCD*, que são preferivelmente representados por um gene *leuA* mutante que codifica isopropilmalato sintase que não é submetida à inibição da retroalimentação por L-leucina (patente US 6.403.342). Além do mais, a bactéria pode ser melhor aumentando a expressão de um ou mais genes que codificam proteínas que são responsáveis pela secreção de L-aminoácidos da célula bacteriana. Exemplos de tais genes incluem os genes *b2682* e *b2683* (genes *ygaZH*) (EP 1239041 A2).

Bactérias produtoras de L-histidina

Exemplos de cepas mães que podem ser usadas para produzir bactérias produtoras de L-histidina incluem, mas sem limitação, cepas que pertencem ao gênero *Escherichia*, tais como *E. coli* cepa 24 (VKPM B-5945, RU2003677); *E. coli* cepa 80 (VKPM B-7270,

RU2119536); *E. coli* NRRL B-12116 - B 12121 (patente US 4.388.405); *E. coli* H-9342 (FERM BP-6675) e H-9343 (FERM BP-6676) (patente US 6.344.347); *E. coli* H-9341 (FERM BP-6674) (EP 1085087); *E. coli* A180/pFM201 (patente US 6.258.554) e similares.

5 Exemplos de cepas mães que podem ser usadas para produzir bactérias produtoras de L-histidina também incluem cepas nas quais a expressão de um ou mais genes que codificam uma enzima biossintética de L-histidina é melhorada. Exemplos de tais genes incluem genes que codificam ATP fosforribosiltransferase (hisG), fosforribosil AMP
10 cicloidrolase (hisJ), fosforribosil-ATP pirofosfoidrolase (hisIE), fosforribosilformimino-5-aminoimidazol carboxamida ribotídeo isomerase (hisA), amidotransferase (hisH), histidinol fosfato aminotransferase (hisC), histidinol fosfatase (hisB), histidinol desidrogenase (hisD) e assim por diante.

 Sabe-se que as enzimas biossintéticas de L-histidina
15 codificada por hisG e hisBHAFI são inibidas por L-histidina e, portanto, uma capacidade de produzir L-histidina também pode ser eficientemente melhorada introduzindo uma mutação na ATP fosforribosiltransferase que transmite resistência à inibição da retroalimentação (patente RU 2003677 e 2119536).

20 Exemplos específicos de cepas com uma capacidade de produzir L-histidina incluem *E. coli* FERM-P 5038 e 5048, que transformaram um vetor que carrega um DNA que codifica uma enzima biossintética de L-histidina (JP 56-005099 A), cepas de *E. coli* transformadas com *rht*, um gene para uma exportação de aminoácido (EP
25 101671 OA), *E. coli* 80 cepa transmitida com resistência à sulfaguanidina, DL-1,2,4 triazol-3-alanina e estreptomicina (VKPM B-7270, patente RU 2119536) e assim por diante.

Bactérias produtoras de ácido L-glutâmico

Exemplos de cepas mães que podem ser usadas para produzir

bactérias produtoras de ácido L-glutâmico incluem, mas sem limitação, cepas que pertencem ao gênero *Escherichia*, tal como *E. coli* VL334thrC+(EP 1172433). A *E. coli* VL334 (VKPM B-1641) é uma cepa auxotrófica de L-isoleucina e L-treonina com mutações nos genes thrC e
 5 ilvA (patente US 4.278.765). Um alelo tipo selvagem do gene thrC foi transferido pelo método de transdução geral usando um bacteriófago P1 que foi crescido em células de *E. coli* K12 tipo selvagem (VKPM B-7). Em função disso, uma cepa auxotrófica de L-isoleucina VL334thrC+ (VKPM B-8961), que é capaz de produzir ácido L-glutâmico, foi obtida.

10 Exemplos de cepas mães que podem ser usadas para produzir bactérias produtoras de ácido L-glutâmico incluem, mas sem limitação, cepas que são deficientes na atividade de α -cetoglutarato desidrogenase, ou cepas em que um ou mais genes que codificam uma enzima biossintética de ácido L-glutâmico são melhoradas. Exemplos dos genes envolvidos na
 15 biossíntese de ácido L-glutâmico incluem genes que codificam glutamato desidrogenase (gdhA), glutamina sintetase (glnA), glutamato sintetase (gltAB), isocitrato desidrogenase (icdA), aconitato hidratase (acnA, acnB), citrato sintase (gltA), fosfoenolpiruvato carboxilase (ppc), piruvato carboxilase (pyc), piruvato desidrogenase (aceEF, lpdA), piruvato quinase
 20 (pyM, pykF), fosfoenolpiruvato sintase (ppsA), enolase (eno), fosfogliceromutase (pgmA, pgml), fosfoglicerato quinase (pgk), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gapA), triose fosfato isomerase (tpiA), frutose bis-fosfato aldolase (fbp), fosfofrutoquinase (pfkA, pfkB) e glicose fosfato isomerase (pgi).

25 Exemplos de cepas que foram modificadas, de maneira tal que expressão do gene citrato sintetase, do gene fosfoenolpiruvato carboxilase, e/ou do gene glutamato desidrogenase é/são melhor(s), incluem aquelas reveladas em EP1078989A, EP955368A, e EP952221A.

Exemplos de cepas que foram modificadas, de maneira tal

que expressão do gene citrato sintetase e/ou do gene fosfoenolpiruvato carboxilase seja reduzida e/ou seja deficiente na atividade α -cetoglutarato desidrogenase, incluem aquelas reveladas em EP1078989A, EP955368A e EP952221A.

5 Exemplos de cepas mães que podem ser usadas para produzir as bactérias produtoras de ácido L-glutâmico também incluem cepas com atividade menor ou eliminada de uma enzima que catalisa a síntese de um composto, sem ser ácido L-glutâmico, pela ramificação de uma via de biossíntese de ácido L-glutâmico. Exemplos de tais enzimas
10 incluem isocitrato liase (aceA), α -cetoglutarato desidrogenase (sucA), fosfotransacetilase (pta), acetato quinase (ack), sintase de ácido acetohidroxi (ilvG), acetolactato sintase (ilvI), formato acetiltransferase (pfl), lactato desidrogenase (ldh) e glutamato decarboxilase (gadAB). Bactérias que pertencem ao gênero *Escherichia* deficiente na atividade α -
15 cetoglutarato desidrogenase ou com uma atividade menor de α -cetoglutarato desidrogenase, e métodos para obtê-los, são descritos em patentes US. Especificamente, estas cepas incluem as seguintes:

E. coli W31 10sucA::Km^R

E. coli AJ12624 (FERM BP-3853)

20 *E. coli* AJ12628 (FERM BP-3 854)

E. coli AJ12949 (FERM BP-4881) 5.378.616 e 5.573.945.

E. coli W3110sucA::Km^R é uma cepa obtida pelo interrompimento do gene α -cetoglutarato desidrogenase (daqui por diante referido como "gene sucA ") de *E. coli* W3110. Esta cepa é completamente
25 deficiente na α -cetoglutarato desidrogenase.

Outros exemplos de bactérias que produzem ácido L-glutâmico incluem aquelas que pertencem ao gênero *Escherichia* e apresentam resistência a um antimetabólito de ácido aspártico. Estas cepas também podem ser deficientes na atividade de α -cetoglutarato

desidrogenase e incluem, por exemplo, *E. coli* AJ13199 (FERM BP-5807) (patente US 5.908.768), FFRM P-12379, que apresenta adicionalmente uma baixa capacidade de decomposição de ácido L-glutâmico (patente US 5.393.671); AJ 13138 (FERM BP-5565) (patente US 6.110.714) e similares.

5 Exemplos de bactérias produtoras de ácido L-glutâmico incluem cepas mutantes que pertencem ao gênero *Pantoea* que são deficientes na atividade de α -cetoglutarato desidrogenase ou apresentam uma menor atividade de α -cetoglutarato desidrogenase, e podem ser obtidas da maneira descrita anteriormente. Tais cepas incluem *Pantoea ananatis* AJ
10 13356. (patente US 6.331.419). *Pantoea ananatis* AJ 13356 foram depositadas no National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry (atualmente, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, International Patent Organism Depositary,
15 Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566, Japão) em 19 de fevereiro de 1998, com um número de acesso de FERM P-16645. Foram então convertidas em um depósito internacional nas provisões de Budapest Treaty, em 11 de janeiro de 1999, e receberam um número de acesso de FERM BP-6615. *Pantoea ananatis* AJ13356 é
20 deficiente na atividade de α -cetoglutarato desidrogenase em função do interrompimento do gene de subunidade α KGDH-E I (sucA). A cepa anterior foi identificada como *Enterobacter agglomerans* quando foi isolada e depositada como a *Enterobacter agglomerans* AJ13356. Entretanto, foi recentemente re-classificada como *Pantoea ananatis*, com base no
25 sequenciamento de nucleotídeo de RNAr 16S, e assim por diante. Embora AJ13356 tenha sido depositada no depositário anteriormente mencionado como *Enterobacter agglomerans*, com propósitos desta especificação, são descritas como *Pantoea ananatis*.

bactérias produtoras de L-fenilalanina

Exemplos de cepas mães que podem ser usadas para produzir bactérias produtoras de L-fenilalanina incluem, mas sem limitação, cepas que pertencem ao gênero *Escherichia*, tais como *E. coli* AJ12739 (tyrA::Tn10, tyrR) (VKPM B-8197); *E. coli* HWI089 (ATCC 55371) que carrega o gene pheA34 mutante (patente US 5.354.672); *E. coli* MWEK 101-b (KR8903681); *E. coli* NRRL B-12141, NRRL B-12145, NRRL B-12146 e NRRL B-12147 (patente US 4.407.952). Também, como uma cepa mãe, *E. coli* K-12 [W3110 (tyrA)/pPHAB (FERM BP-3566), *E. coli* K-12 [W31 10 (tyrA)/pPHAD] (FERM BP-12659), *E. coli* K-12 [W3110 (tyrA)/pPHATerm] (FERM BP-12662) e *E. coli* K-12 [W31 10 (tyrA)/pBR-aroG4, pACMAB] denominadas como AJ 12604 (FERM BP-3579) podem ser usadas (EP 488424 B 1). Além do mais, bactérias produtoras de L-fenilalanina, que pertencem ao gênero *Escherichia* com uma maior atividade da proteína codificada pelo gene yedA ou o gene yddG, também podem ser usadas (pedidos de patente US 2003/0148473 A1 e 2003/0157667 A1).

Bactérias produtoras de L-triptofano

Exemplos de cepas mães que podem ser usadas para produzir as bactérias produtoras de L-triptofano incluem, mas sem limitação, cepas que pertencem ao gênero *Escherichia*, tais como *E. coli* JP4735/pMU3028 (DSM 10122) e JP6015/pMU91 (DSM 10 123), que é deficiente na triptofanoil-RNAt sintetase codificada por gene trpS mutante (patente US 5.756.345); *E. coli* SV 164 (pGH5) com um alelo serA que codifica fosfoglicerato desidrogenase livre da inibição da retroalimentação por serina e um alelo trpE que codifica antranilato sintase livre da inibição da retroalimentação por triptofano (patente US 6.180.373); *E. coli* AGX17 (pGX44) (NRRL B-12263) e AGX6(pGX50)aroP (NRRL B-12264) deficiente na enzima triptofanoase (patente US 4.371.614); *E. coli* AGX17/pGX50,pACKG4-pps, na qual a capacidade de produzir

fosfoenolpiruvato é melhor (W09708333, patente US 6.319.696) e similares podem ser usadas. Bactérias produtoras de L-triptofano que pertencem ao gênero *Escherichia* com uma melhor atividade da proteína identificada e codificada pelo gene *yedA* ou pelo gene *yddG* também podem ser usadas (pedidos de patente US 2003/0148473 A1 e 2003/0157667 A1).

Exemplos de cepas mães que podem ser usadas para produzir as bactérias produtoras de L-triptofano também incluem cepas nas quais uma ou mais atividades das enzimas selecionadas de antranilato sintase, fosfoglicerato desidrogenase e triptofano sintase são melhoradas. A antranilato sintase e fosfoglicerato desidrogenase são ambas submetidas à inibição da retroalimentação por L-triptofano e L-serina, de maneira tal que uma mutação que dessensibiliza a inibição da retroalimentação possa ser introduzida nestas enzimas. Exemplos específicos de cepas com uma mutação como esta incluem uma *E. coli* SV164, que carrega antranilato sintase dessensibilizada e uma cepa transformante obtida introduzindo na *E. coli* SV 164 o plasmídeo pGH5 (WO 94/0803 1), que contém um gene *serA* mutante que codifica fosfoglicerato desidrogenase dessensibilizada por retroalimentação.

Exemplos de cepas mães que podem ser usadas para produzir as bactérias produtoras de L-triptofano também incluem cepas nas quais o operon triptofano, que contém um gene que codifica antranilato sintase dessensibilizada, foi introduzido (JP 57-71397 A, JP 62-244382 A, patente US 4.371.614). Além do mais, a capacidade de produzir L-triptofano pode ser transferida melhorando a expressão de um gene que codifica triptofano sintase, entre os operons triptofano (*trpBA*). A triptofano sintase inclui subunidades α e β , que são codificadas pelos genes *trpA* e *trpB*, respectivamente. Além do mais, a capacidade de produzir L-triptofano pode ser maior melhorando a expressão do operon

isocitrato liase-malato sintase (W02005/103275).

Bactérias produtoras de L-prolina

Exemplos de cepas mães que podem ser usadas para produzir bactérias produtoras de L-prolina incluem, mas sem limitação, cepas que pertencem ao gênero *Escherichia*, tal como *E. coli* 702ilvA (VKPM B-8012), which é deficiente no gene ilvA e é capaz de produzir L-prolina (EP 1172433). A bactéria pode ser melhor aumentando a expressão de um ou mais genes envolvidos na biossíntese de L-prolina. Exemplos de tais genes para bactérias produtoras de L-prolina que são preferidos incluem o gene proB, que codifica glutamato quinase a partir da qual a inibição da retroalimentação por L-prolina é dessensibilizada (patente DE 3127361). Além do mais, a bactéria pode ser melhor aumentando a expressão de um ou mais genes que codificam proteínas que excretam L-aminoácido da célula bacteriana. Tais genes são exemplificados pelos genes b2682 e b2683 (ygaZHgenes) (EP1239041 A2).

Exemplos de bactérias que pertencem ao gênero *Escherichia*, que apresentam uma atividade para produzir L-prolina, incluem as cepas de *E. coli* a seguir: NRRL B-12403 e NRRL B-12404 (patente GB 2075056), VKPM B-8012 (pedido de patente RU 2000124295), mutantes de plasmídeo descritos na patente DE 3127361, mutantes de plasmídeo descritos por Bloom F.R. et al (The 15th Miami winter symposium, 1983, p. 34) e similares.

Bactérias produtoras de L-arginina

Exemplos de cepas mães que podem ser usadas para produzir bactérias produtoras de L-arginina incluem, mas sem limitação, cepas que pertencem ao gênero *Escherichia*, tais como *E. coli* cepa 237 (VKPM B-7925) (pedido de patente US 2002/058315 A1) e suas cepas derivadas que carregam N-acetilglutamato sintase mutante (pedido de patente RU 2001112869), *E. coli* cepa 382 (VKPM B-7926) (EPI 170358A1), uma

cepa que produz arginina na qual o gene *argA* que codifica N-acetilglutamate sintetase é introduzido (EP 1170361 A 1) e similares.

Exemplos de cepas mães que podem ser usadas para produzir bactérias produtoras de L-arginina também incluem cepas nas quais a expressão de um ou mais genes, que codificam uma enzima biossintética de L-arginina, são melhorados. Exemplos de tais genes incluem genes que codificam N-acetilglutamil fosfato redutase (*argC*), ornitina acetil transferase (*argJ*), N-acetilglutamato quinase (*argB*), acetilornitina transaminase (*argD*), ornitina carbamoil transferase (*argF*), ácido argininosuccínico sintetase (*argG*), ácido argininosuccínico liase (*argH*), e carbamoil fosfato sintetase (*carAB*).

Bactérias produtoras de L-valina

Exemplos de cepas mães que podem ser usadas para produzir bactérias produtoras de L-valina incluem bactérias que pertencem ao gênero *Escherichia*, tais como H-81 (VKPM B-8066), NRRL B-12287 e NRRL B-12288 (patente US 4.391.907), VKPM B-4411 (patente US 5.658.766), VKPM B-7707 (pedido de patente EP 1016710A2) ou similares.

Exemplo de cepas mães que podem ser usadas para produzir bactérias produtoras de L-valina incluem, mas sem limitação, cepas que foram modificadas para superexpressar o operon *ilvGMEDA* (patente US 5.998.178). É desejável remover a região do operon *ilvGMEDA*, que é exigido para atenuação de maneira tal que expressão do operon não seja atenuada pela L-valina que é produzida. Além do mais, o gene *ilvA* no operon pode ser interrompido de maneira tal que a atividade da treonina deaminase seja menor.

Exemplos de cepas mães que podem ser usadas para produzir bactérias produtoras de L-valina também incluem mutantes com uma mutação de amino-acil RNAt sintetase (patente US 5.658.766). Por exemplo, *E. coli* VL 1970, que apresenta uma mutação no gene *ileS* que

codifica isoleucina RNAt sintetase, pode ser usada. *E. coli* VL 1970 foi depositada no Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (Rússia, 117545 Moscou, 1st Dorozhny Proezd, 1) em 24 de junho de 1988 com número de acesso VKPM B-4411.

5 Além do mais, mutantes que exigem ácido lipóico para crescimento e/ou que precisam de H⁺-ATPase também podem ser usados como cepas mães (W096/06926).

Bactérias produtoras de L-isoleucina

Exemplos de cepas mães que podem ser usadas para
10 produzir bactérias produtoras de L-isoleucina incluem, mas sem limitação, mutantes com resistência a 6-dimetilaminopurina (JP 5-304969 A), mutantes com resistência a um análogo de isoleucina, tal como hidroxamato de tiaisoleucina e isoleucina, e mutantes adicionalmente com resistência a hidroxamato de DL-etionina e/ou arginina (JP 5-130882 A).
15 Além do mais, cepas recombinantes transformadas com genes que codificam proteínas envolvidas na biossíntese de L-isoleucina, tais como treonina deaminase e acetoidroxate sintase, também podem ser usadas como cepas mães (JP 2-458 A, FR 0356739, e patente US 5.998.178).

Bactérias produtoras de L-tirosina

20 Exemplos de bactérias produtoras de tirosina incluem bactérias do gênero *Escherichia* com um gene de prefenato desidratase dessensibilizado (tyrA). O produto de expressão deste gene é dessensibilizado para inibição por tirosina (pedido de patente EP submetido à inspeção pública 1616940).

25 2. Método para produzir L-aminoácido

É descrito um método para produzir um L-aminoácido cultivando uma bactéria, da maneira aqui descrita, em um meio de cultura para produzir e excretar o L-aminoácido no meio, e coletando o L-aminoácido do meio.

O cultivo, coleta e purificação de um L-aminoácido do meio e similares podem ser realizados de uma maneira similar aos métodos convencionais de fermentação, em que um aminoácido é produzido usando uma bactéria.

5 O meio usado para cultivo pode ser tanto um meio sintético quanto um natural, contanto que o meio inclua uma fonte de carbono e uma fonte de nitrogênio e minerais e, se necessário, quantidades apropriadas de nutrientes que a bactéria exige para crescimento. Como fonte de carbono, sacarídeos tais como glicose, frutose, sacarose, melão e
10 hidrolisado de amido, e ácidos orgânicos, tais como ácido fumárico, ácido cítrico e ácido succínico, álcool tal como etanol e glicerol, podem ser usados. Como fonte de nitrogênio, vários sais de amônio tais como amônia e sulfato de amônio, outros compostos de nitrogênio tais como aminas, uma fonte natural de nitrogênio tais como peptona, hidrolisado de soja e
15 microrganismo fermentativo digerido, podem ser usados. Como minerais, monofosfato de potássio, sulfato de magnésio, cloreto de sódio, sulfato ferroso, sulfato de manganês, cloreto de cálcio e similares, podem ser usados. Como vitaminas, tiamina, extrato de levedura e similares podem ser usadas.

20 O cultivo pode ser realizado em condições aeróbicas, tais como agitando e/ou balançando com aeração, em uma temperatura de 20 a 40 °C ou, em um outro exemplo, 30 a 38 °C. O pH da cultura é em geral entre 5 e 9 ou, em um outro exemplo, entre 6,5 e 7,2. O pH da cultura pode ser ajustado com amônia, carbonato de cálcio, vários ácidos, várias
25 bases e tampões. Em geral, um cultivo de 1 a 5 dias leva ao acúmulo do L-aminoácido alvo no meio líquido.

Após o cultivo, os sólidos tais como células podem ser removidos do meio líquido por centrifugação ou filtração de membrana, e a seguir o L-aminoácido pode ser coletado e purificado por troca iônica

(Nagai, H. et al, Separation Science and Technology, 39(16), 3691-3710), concentração, método de separação de membrana (Patentes Japonesas submetidas à inspeção pública 9-164323 e 9-173792), métodos de cristalização (W02008/078448, W02008/078646) e/ou outros métodos.

5 O L-aminoácido coletado pode conter células bacterianas, componentes do meio, umidade, e metabólitos de subproduto do microrganismo além do L-aminoácido. A pureza do L-aminoácido coletado é, por exemplo, 50 % ou mais, 85 % ou mais, ou ainda 95 % ou mais (patente US 5.431.933, pedido de patente JP 1-214636, patentes US
10 4.956.471, 4.777.051, 4.946.654, 5.840.358, 6.238.714, pedido de patente publicado US 2005/0025878).

A L-Cisteína obtida da maneira descrita anteriormente pode ser usada para a produção de derivados de L-cisteína. Os derivados de L-cisteína incluem metilcisteína, etilcisteína, carbocisteína, sulfocisteína,
15 acetilcisteína, e assim por diante.

Além do mais, quando um derivado de tiazolidina de L-cisteína acumula-se no meio, a L-cisteína pode ser produzida mudando o equilíbrio da reação entre o derivado de tiazolidina e L-cisteína no lado da L-cisteína. Além do mais, quando S-sulfocisteína acumula-se no meio, ela
20 pode ser convertida em L-cisteína por redução, usando um agente redutor tal como ditioneitol.

Exemplos

A presente invenção será explicada de maneira mais concreta a seguir, com referência aos exemplos não limitantes a seguir.

25 Exemplo 1. Superexpressão de cada um dos gene c0011 e um locus gênico d0663-c09478.

1-1. Clonagem de gene c0011 de *P. ananatis* SC17.

Um fragmento de DNA, contendo aproximadamente 300nt à montante e 200nt à jusante do ORF de c0011, foi obtido por PCR de DNA

genômico de *P. ananatis* SC17 usando oligoiniciadores P1 (SEQ ID NO: 7) e P2 (SEQ ID NO: 8) com PrimeSTAR DNA polimerase (Takara Bio Inc.) (5 segundos a 98 °C, 10 segundos a 55 °C, 4 minutos a 72 °C por 30 ciclos após 5 minutos a 94 °C).

5 O fragmento de DNA de 1,4 kb obtido foi clonado em um plasmídeo pSTV29 (Takara Bio Inc.), usando sítios BamHI designados na extremidade 5' de cada oligoiniciador para obter o plasmídeo pSTV-c0011PF, em que o gene c0011 foi orientado na mesma direção como o promotor lacZ localizado em pSTV29.

10 1-2. Clonagem do locus gênico d0663 c09478 de *P. ananatis* SC17.

Um fragmento de DNA contendo aproximadamente 200nt à jusante do ORF de d0663, por meio de aproximadamente 200nt à jusante do ORF de c09478, foi obtido por PCR de DNA genômico de *P. ananatis* SC17 usando oligoiniciadores P3(SEQ ID NO: 9) e P4(SEQ ID NO: 10) com PrimeSTAR DNA polimerase (Takara Bio Inc.) (5 segundos a 98 °C, 10 segundos a 55 °C, 3 minutos a 72 °C, por 30 ciclos após 5 minutos a 94 °C). O fragmento de DNA de 2,6 kb obtido foi clonado em pSTV29 usando sítios BamHI designados na extremidade 5' de cada oligoiniciador para obter o plasmídeo pSTV-PA36ccd, em que o gene c09478 foi orientado na mesma direção como o promotor lacZ localizado em pSTV29.

20 1-3. Efeito de c0011 e d0663-c09478 na resistência a cisteína.

Para testar o efeito do gene c0011 e o locus gênico contendo dois genes, d0663 e c09478, quanto a resistência de cisteína, pSTV-c0011PF e pSTV-PA36ccd, e o vetor pSTV29 correspondente como um controle, foram introduzidos na cepa de *E. coli* MG 1655 (ATCC47076, ATCC 700926) e cada transformante cresceu em meio mínimo M9 (Sambrook et al., Molecular cloning, 3rd edition, 2001 Cold Spring Harbor Laboratory Press) contendo concentração tóxica de L-cisteína para cepas tipo selvagem ou controle. Cada uma das culturas cultivadas por toda a noite a 34 °C em

um tubo de teste contendo 3 mL de meio mínimo M9 suplementado com 0,4 % de glicose (meios M9Glc) foi diluída 1:100 em meio M9Glc fresco contendo 50 μ M de cisteína, em um total de 3 mL, e crescida em 34 °C em tubo de testes com agitação por toda a noite. A seguir, as células foram

5 inoculadas em 4 mL de meio M9Glc fresco em tubos de teste contendo 0 e 200 μ M de L-cisteína para dar uma OD₆₆₀ inicial de 0.007. A OD₆₆₀ nm foi monitorada automaticamente usando incubador TN-1506 (Advantec Toyo, Tóquio, Japão). Para manutenção dos plasmídeos, 25 mg/L de cloranfenicol foram suplementados no meio. As curvas de crescimento

10 obtidas são mostradas na figura 1. Como pode-se observar na figura 1, as cepas que carregam os plasmídeos pSTV-cOO I I PF e pSTV-PA36ccd cresceram mais rápido do que a cepa controle que carrega o vetor pSTV29 em condições de cisteína 200 μ M, indicando que este gene/locus gênico confere resistência a cisteína. Os efeitos podem possivelmente ser

15 atribuídos ao efluxo de cisteína por c0011 e d0663, em que os efeitos tóxicos da cisteína intracelular são aliviados, uma vez que suas predições de estrutura secundária sugerem que elas apresentam hélices de transmembrana múltiplas, que são típicas de transportadores que são capazes de transportar pequenas moléculas através da membrana.

20 Exemplo 2. Efeito de c0011 na produção fermentativa de cisteína.

2-1. Construção de um plasmídeo para superexpressão de c0011.

Dois tipos de plasmídeos de expressão pMIV-Pnlp0 e pNIV-Pnlp23 com diferentes intensidades de promotor foram usados para a superexpressão de c0011. Estes plasmídeos contêm o promotor forte nlp0

25 (ou promotor nlp23) e o terminador rrnB, de maneira tal que os genes alvo possam ser clonados entre estas estruturas para formar uma unidade de expressão. O promotor "PnlpO" (SEQ ID NO: 11) foi derivado do promotor do gene nlpD de *E. coli* K-12, "Pnlp23" (SEQ ID NO: 12) e "Pnlp8" (SEQ ID NO: 13) (ver a seguir para mais detalhes) são as variações

com intensidades diferentes da atividade do promotor (US2010209977). O esquema completo do construto destes plasmídeos de expressão é descrito a seguir (ver referência do exemplo 1) como um construto de plasmídeo pMIV-Pnlp0-YeaS3, onde o gene *yeaS* de *E. coli* K- 12 é clonado entre o promotor *nlp0* e o terminador *rrnB*, usando os sítios de restrição exclusivos de *Sall* e *XbaI* designados no início e final do ORF, respectivamente. A fim de obter plasmídeo de expressão a base de pMIV-Pnlp0 para c0011, o mesmo construto com *Sall* e *XbaI* pode ser aplicado para substituir o gene *yeaS* no pMIV-Pnlp0-YeaS3 pelo gene c0011 para render pMIV-Pnlp0-c0011. Também, pMIV-Pnlp23-c0011 pode ser obtido com a mesma abordagem esquemática usando *Sall* e *XbaI*, uma vez que as estruturas básicas destes dois plasmídeos são principalmente as mesmas, exceto aquelas que apresentam uma mudança pequena de nucleotídeos na região promotora.

Um fragmento de DNA contendo ORF de c0011 foi obtido por PCR de DNA genômico de *P. ananatis* SC17 usando oligoiniciadores P5 (SEQ ID NO: 14) e P6 (SEQ ID NO: 15) com PrimeSTAR DNA polimerase (Takara Bio Inc.) (5 segundos a 98 °C, 5 segundos a 55 °C, 90 segundos a 72 °C, por 30 ciclos após 5 minutos a 94 °C). O fragmento de DNA resultante foi clonado em pMIV-Pnlp0 e pMIV-Pnlp23 usando sítios *Sall* e *XbaI* designados na extremidade 5' de cada oligoiniciador para obter plasmídeos pMIV-Pnlp0-c0011 e pMIV-Pnlp23-c0011 respectivamente. O plasmídeo pMIV-5J S (JP2008-99668, EP 1942183)) foi usado rotineiramente por um vetor completo correspondente como um controle.

2-2. Construção das cepas produtoras de cisteína.

Para preparar cepas de *E. coli* e *P. ananatis* que são capazes de produção fermentativa de cisteína, um plasmídeo que carrega o gene *cysEX* que codifica um mutante resistente à retroalimentação de O-acetil-L-serina sulfidrilase (US20050112731 A 1), um fator essencial para a

produção de cisteína foi construído. Com este propósito, pACYC-DE1, que carrega os genes *cysEX* e *ydeD* (US5972663A), foi usado como um material de partida. A construção de pACYC-DE1 é descrita em US2010209977 como a construção de pACYC-DES (US2005124049, este plasmídeo carrega três genes *cysEX*, *ydeD* e *serA5* (US6180373)), em que a etapa de clonagem de *serA5* no plasmídeo é omitida de maneira tal que apenas *cysEX* e *ydeD* sejam colocados no plasmídeo. A seguir, pACYC-DE1 foi digerido com enzima de restrição *Miul* e foi submetido a autoligação para deletar a região 330bp dentro do ORF de *ydeD* para dar pACYC-EI. Assim, o plasmídeo pACYC-EI contém apenas *cysEX*, cuja introdução fornece as cepas produtoras de cisteína mais simples. As cepas *E. coli* MG 1655 e *P. ananatis* SC17 foram transformadas com pACYC-E I para obter as cepas MG 1655/pACYC-E I e SC17/pACYC-E 1, respectivamente, que foram usadas como as cepas produtoras básicas para a produção fermentativa de cisteína.

2-3. Efeito de c0011 na produção de cisteína em *E.coli*.

Para testar os efeitos da superexpressão de c0011 na produção de cisteína, pMIV-Pnlp0-cOOI 1, pMIV-Pnlp23-c0011 e pMIV-5JS (controle) foram introduzidos na cepa produtora de cisteína MG1655/pACYC-E I. As cepas resultantes foram submetidas aos testes de produção comparando a capacidade da produção fermentativa de cisteína. Os componentes do meio para os experimentos de fermentação são descritos a seguir.

A composição do meio de fermentação foi da maneira a seguir (concentração final):

Componente 1:

	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	15g/L
	KH_2PO_4	1,5g/L
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 g/L
5	thiamine HCl	0,1 mg/L

Componente 2:

	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.7mg/L
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,15mg/L
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,7mg/L
10	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,6mg/L
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3mg/L
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,25mg/L

Componente 3:

	Bacto Triptona	0,6g/L
15	Bacto Extrato de levedura	0,3g/L
	NaCl	0,6g/L

Componente 4:

	CaCO_3	20g/L
--	-----------------	-------

Componente 5:

20	L-histidina HCl H_2O	135mg/L
----	--------------------------------------	---------

Componente 6:

	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	4g/L
--	-----------------------------------	------

Componente 7:

	piridoxina HCl	2mg/L
--	----------------	-------

25 Componente 8:

	Glicose	40g/L
--	---------	-------

Cada componente foi preparado como um estoque concentrado de 10x (componente 1), 1.000x (componente 2), 100/6x (componente 3), 100x (componente 5), 350/4x (componente 6), 1.000x

(componente 7) e 10x (componente 8), respectivamente. As condições de esterilização foram: autoclavar a 110 °C por 30 minutos (componente 1, 2, 3, 5 e 8), esterilização por calor seco a 180 °C por mais de 5 horas (componente 4) e esterilização por filtro (componente 6 e 7).

5 A fermentação foi realizada da maneira descrita a seguir. Cada cepa produtora (MG1655/pACYC-E1) que carrega pMIV-Pnlp0-c0011, pMIV-Pnlp23-c0011 e pMIV-5JS foi estriada na placa LB e crescida a 34 °C por toda a noite. Uma alça cheia de células (células raspadas por 7 cm usando alça azul de 10 microlitros (NUNC) da placa
10 com cultura totalmente crescida) foi obtida e inoculada em 2 mL do meio para fermentação nos tubos de teste (23 mm de diâmetro interno; todos os tubos de teste tinham 200 mm de comprimento) para iniciar o cultivo. O cultivo foi realizado a 32 °C com agitação e, a seguir, terminou quando todo o açúcar foi consumido (isso levou 21 a 24 horas, dependendo das
15 amostras). A quantidade de compostos relacionados à cisteína que foram produzidos no caldo da cultura foi determinada rotineiramente pelo método descrito por Gaitonde, M.K. (Biochem J.;104(2):627-33(1967)). Para manter os plasmídeos, 25 mg/L de cloranfenicol e 20 mg/L de tetracilcina foram suplementados no meio durante o período de cultivo.

20 A quantidade dos compostos relacionados à cisteína e o rendimento contra o açúcar consumido com valores correspondentes de desvio padrão (fermentação em quatro tubos de teste independentes) são mostrados na tabela 1. Da maneira observada na tabela 1, a superexpressão de c0011 apresenta efeitos positivos no aumento da produção de cisteína
25 (incluindo compostos relacionados à cisteína) em *E. coli*, que é provavelmente em virtude de sua capacidade de efluxo de cisteína.

Tabela 1

Cepa	(mg/L) Cisteína	Rendimento (%)
MG1655/pACYC-E1/pMIV-5JS	160 ± 57	0,40 ± 0,14
MG1655/pACYC-E1/pMIV-Pnlp23-c0011	737 ± 101	1,84 ± 0,25
MG1655/pACYC-E1/pMIV-Pnlp0-c0011	565 ± 83	1,41 ± 0,21

2-4. Efeito de c0011 na produção de cisteína em *P. ananatis*.

Para testar o efeito da superexpressão de c0011 na produção de cisteína em *P. ananatis*, os plasmídeos pMIV-Pnlp0-c0011, pMIV-Pnlp23-c0011 e pMIV-5JS (controle) foram introduzidos na cepa produtora de cisteína SC17/pACYC-E1. O cultivo produtivo foi executado da maneira descrita no experimento com *E. coli*, com a exceção de que o tempo de cultivo foi de 18 horas. As quantidades de compostos relacionados à cisteína e rendimento contra o açúcar consumido com valores correspondentes de desvio padrão de dados para cada cepa (fermentações independentes em quatro tubos de teste) são mostrados na tabela 2. Da maneira observada na tabela 2, a superexpressão de c0011 apresenta efeitos positivos no aumento da produção de cisteína em *P. ananatis*.

Tabela 2

Cepa	(mg/L) Cisteína	Rendimento (%)
SC17/pACYC-E1/ pMIV-5JS	95 ± 6	0,24 ± 0,018
SC 17/pACYC-E 1 /pMI V-Pnlp23-c0011	248 ± 71	0,41 ± 0,012
SC 17/pACYC-E 1 /pMI V-Pnlp0-c0011	209 ± 16	0,35 ± 0,027

Exemplo 3. Efeito de c0011 na produção fermentativa de aminoácidos.

3-1. Efeito de c0011 na produção de aminoácidos em *E. coli*.

Para testar o efeito da superexpressão de c0011 na produção de aminoácidos sem ser cisteína, pMIV-Pnlp0-c0011 e pMIV-5JS (controle) foram introduzidos em MG1655. As cepa resultantes foram submetidas à testes de produção comparando a capacidade da produção fermentativa de aminoácidos. O cultivo produtivo foi executado da maneira descrita no experimento para a produção de cisteína com *E. coli*, com a exceção de que o tempo de cultivo foi 19-24,5 horas. Para manutenção dos plasmídeos, 25 mg/L de cloranfenicol foram suplementados no meio durante o período de

cultivo. A análise quantitativa de L-aminoácidos produzidos no meio de cultura foi realizada usando Amino Acid Analyzer L-8900 (HITACHI). As quantidades de aminoácidos com valores correspondentes de desvio padrão de dados para cada cepa (fermentações independentes em quatro tubos de teste) são mostradas na tabela 3. Da maneira observada na tabela 3, a superexpressão de c0011 apresenta efeitos positivos no aumento da produção de valina, leucina, isoleucina, treonina, alanina, glutamato, histidina e glicina em *E. coli*.

Tabela 3

Cepa	Val (mg/L)	Leu (mg/L)	Ile (mg/L)	Tin (mg/L)	Glu (mg/L)	Gly (mg/L)	Ala (mg/L)	His (mg/L)
MG1655/ pMIV-5JS	13±2,5	5,2±1,8	0,4±0,7	2,7±0,9	891±289	0,4±0,3	54± 28	14±2,5
MG1655/pMIV-Pnlp0-c001 I	320±14	205±41	65± 11	101±41	1470±15	6,1±0,8	307±13	37±3,4

3-2. Efeito de c0011 na produção de aminoácidos em *P. ananatis*.

Para testar o efeito da superexpressão de c0011 na produção de aminoácidos sem ser cisteína, pMIV-Pnlp0-c0011 e pMIV-5JS (controle) foram introduzidos em SC17. As cepas resultantes foram submetidas à testes de produção comparando a capacidade da produção fermentativa de aminoácidos. O cultivo produtivo foi executado da maneira descrita no experimento para a produção de cisteína com *E. coli*, com a exceção de que a concentração inicial de glicose foi ajustada para 60g/L, e o tempo de cultivo foi 16 horas. Para manutenção dos plasmídeos, 25 mg/L de cloranfenicol foram suplementados no meio durante o período de cultivo. A análise quantitativa de aminoácidos produzidos nos meios de cultura foi realizada usando Amino Acid Analyzer L-8900 (HITACHI). As quantidades de aminoácidos com valores correspondentes de desvio padrão de dados para cada cepa (fermentações independentes em quatro tubos de teste) são mostrados na tabela 4. Da maneira observada na tabela 4, a superexpressão de c0011 apresenta efeitos positivos no aumento da produção de valina, leucina e isoleucina em *P. ananatis*; que são similares aos resultados em *E. coli* para a produção de todos estes

aminoácidos.

Tabela 4

Cepa	Val (mg/L)	Leu (mg/L)	Ile (mg/L)
SC17/ pMIV-5JS	16 ± 7,2	2,7 ± 0,9	2,3 ± 0,3
SC 17/ pMIV-Pnlp0-c0011	112±7,6	6,8 ± 0,3	6,0± 0,2

Exemplo 4. Efeito dos loci d0663 e d0663-c09478 na produção fermentativa de cisteína.

5 4-1. Construção de um plasmídeo para superexpressão dos loci d0663 e d0663-c09478.

Um fragmento de DNA, contendo aproximadamente 200 nt à jusante do ORF de d0663 por meio de aproximadamente 200 nt à jusante do ORF de c09478, foi obtido por PCR de DNA genômico de *P. ananatis* SC17 usando oligoiniciadores P3 e P4 com PrimeSTAR DNA polimerase (Takara Bio Inc.) (5 segundos a 98 °C, 10 segundos a 55 °C, 3 minutos a 72 °C por 30 ciclos após 5 minutos a 94 °C). Um fragmento de DNA, contendo aproximadamente 300 nt à montante e 200 nt à jusante do ORF de d0663, foi obtido por PCR de DNA genômico de *P. ananatis* SC17 usando oligoiniciadores P3 e P7 (SEQ ID NO: 16) com PrimeSTAR DNA polimerase (Takara Bio Inc.) (5 segundos a 98 °C, 10 segundos a 55 °C, 3 minutos a 72 °C por 30 ciclos após 5 minutos a 94 °C). O fragmento de DNA de 2,6 kb obtido que contém os ORFs d0663 e c09478, e um fragmento de 1,1 kb contendo o ORF de d0663 foram clonados em pACYC 177 (NIPPON GENE CO., LTD., Tóquio, Japão) usando sítio BamHI designados na extremidade 5' de cada oligoiniciador para obter plasmídeos pACYC-PA36ccd e pACYC-d0663F, respectivamente, em que c09478 em pACYC-PA36ccd e d0663 em pACYC-d0663F, respectivamente, foram orientados na mesma direção como o gene Kmr localizado em pACYC 177.

Além do que, plasmídeos de expressão a base de pMIV-PnlpS (ver exemplo 2-1 e exemplo 4-2) para d0663 foram construídos. Um

fragmento de DNA continha P8 (SEQ ID NO: 17) e P9 (SEQ ID NO: 18) com PrimeSTAR DNA polimerase (Takara Bio Inc.) (5 segundos a 98 °C, 5 segundos a 55 °C, 90 segundos a 72 °C por 30 ciclos após 5 minutos a 94 °C). O fragmento de DNA resultante foi clonado em pMIV-PnlpS usando sítios

5 SalI e XbaI designados na extremidade 5' de cada oligoiniciador para render um plasmídeo pMIV-Pnlp8-d0663. Dois clones variantes de pMIV-Pnlp8-d0663, que conferem um nível maior de resistência a cisteína a *E. coli* (ver exemplo 1 para a resistência contra cisteína) do que aquele com o pMIV-Pnlp8-d0663 originalmente construído, foram

10 obtidos durante um período dos experimentos. De acordo com a análise de sequenciamento dos plasmídeos, as mutações não estavam localizadas no próprio ORF de d0663, mas a poucos nucleotídeos à montante do códon de iniciação de d0663, o que origina a possibilidade de uma mudança translacional fornecendo elevado nível de expressão. O local exato e a

15 substituição base daquele mutante foi C(-3)G (3º nucleotídeo à montante do códon inicial "G" foi usado em substituição a "C") e o outro foi C(-4)A; estes plasmídeos variantes foram denominados pMIV-Pnlp8-d0663(-3) e pMIV-Pnlp8-d0663(-4) respectivamente e usados como plasmídeos de expressão de d0663 altamente ativos. Estes mutantes podem ser

20 construídos com mutagênese sítio direcionada bem conhecida usando pMIV-Pnlp8-d0663 como um material de partida igualmente. O plasmídeo pMIV-5JS (JP2008-99668) foi usado rotineiramente por um vetor incompleto correspondente como um controle.

4-2. Construção das cepas produtoras de cisteína.

25 MG1655/pACYC-E1 descrito no exemplo 2-2 foi usado como uma cepa de *E. coli* capaz de produção fermentativa de cisteína.

Para cepa produtora de cisteína de *P. ananatis*, SC I7/pMIV-CysE5 e EYPSGintIM2 foram preparados. Todos os procedimentos esquemáticos para a construção são descritos a seguir.

O plasmídeo pMIV-CysE5 fornece um alelo mutante resistente à retroalimentação de O-acetil-L-serina sulfidrilase (US20050112731A1) codificado por CysE5, um fator essencial para a produção de cisteína. Um fragmento de DNA contendo o alelo *cysE5* foi
 5 obtido por PCR de pMW-PompC-*cysE5* (EP 1650296A 1) como um molde usando oligoiniciadores P10 (SEQ ID NO: 19) e P11 (SEQ ID NO: 20) (30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 57 °C, 1 minuto a 72 °C por 27 ciclos, e a seguir mantido a 72 °C por 7 minutos). O fragmento de DNA de 0,7 kb obtido e que contém *cysE5* foi clonado em pMIV-PompC usando sítios
 10 *Sall* e *XbaI* designados na extremidade 5' de cada oligoiniciador para render pMIV-CysE5. O plasmídeo pMIV-PompC foi construído clonando o fragmento de 0,3 kb contendo a região promotora do gene *ompC* de *E. coli* K-12 em pMIV-5JS (JP2008-99668) usando *Sall* e *PaeI*, onde o fragmento foi obtido por PCR de DNA genômico de *E. coli* MG1655
 15 usando oligoiniciadores P12 (SEQ ID NO: 21) e P13 (SEQ ID NO: 22), e digerido por *Sall* e *PaeI* antes da ligação. O pMIV-CysE5 foi introduzido em *P. ananatis* SC17 para fornecer a cepa produtora de cisteína SC17/pMIV-CysE5.

A construção da cepa EYPSGint1M2 é descrita no exemplo
 20 de referência 1.

4-3. Efeito de d0663 na produção de cisteína em *E. coli*.

Para testar o efeito da superexpressão de d0663 na produção de cisteína, pMIV-Pnlp8-d0663(-3), pMIV-Pnlp8-d0663(-4) e pMIV-5JS (controle) foram introduzidos na cepa produtora de cisteína
 25 MG1655/pACYC-EI. As cepas resultantes foram submetidas à testes de produção comparando a capacidade da produção fermentativa de cisteína. O cultivo produtivo foi executado da maneira descrita no experimento com c0011 em *E. coli* (ver Exemplo 2-3), com a exceção de que o tempo de cultivo foi de 19 horas. Para a manutenção dos plasmídeos, 25 mg/L de

cloranfenicol e 20 mg/L de tetraciclina foram suplementados durante o período de cultivo. A quantidade de compostos relacionados à cisteína e o rendimento contra o açúcar consumido com valores correspondentes de desvio padrão de dados para cada cepa (fermentações independentes em quatro tubos de teste) são mostrados na tabela 5. Da maneira observada na tabela 5, a superexpressão de d0663 apresenta efeitos positivos no aumento da produção de cisteína em *E. coli*.

Tabela 5

Cepa	(mg/L) Cisteína	Rendimento (%)
MG1655/pACYC-E1/ pMIV-5JS	246 ± 21	0,7 ± 0,07
MG1655/pACYC-E1/pMIV-Pn1p8-d0663(-3)	949 ± 78	2,5 ± 0,20
MG1655/pACYC-E1/pMIV-Pnlp8-d0663(-4)	980 ± 110	2,6 ± 0,23

4-4. Efeito dos loci d0663 e d0663-c09478 na produção de cisteína em *P. ananatis*.

Para determinar os efeitos da superexpressão dos loci d0663 e d0663-c09478 na produção de cisteína, pACYC-d0663F, pACYC-PA36ccd (contendo dois ORFs, d0663 e c09478) e pACYC 177 (controle) foram introduzidos na cepa produtora de cisteína SC17/pMIV-CysE5. As cepas resultantes foram submetidas à testes de produção comparando a capacidade da produção fermentativa de cisteína. O cultivo produtivo foi executado da maneira descrita no experimento para a produção de cisteína com c0011 em *E. coli* (ver exemplo 2-3), com a exceção de que a concentração inicial de glicose foi ajustada para 60g/L e o tempo de cultivo foi 16-20 horas. Para manutenção dos plasmídeos, 25 mg/L de cloranfenicol e 20 mg/L de canamicina foram suplementados no meio durante o período de cultivo. A quantidade de compostos relacionados à cisteína e rendimento contra o açúcar consumido com valores correspondentes de desvio padrão de dados para cada cepa (fermentações independentes em quatro tubos de teste) são mostrados na tabela 6. Da maneira observada na tabela 6, a superexpressão de d0663 apresenta efeitos positivos no

aumento da produção de cisteína em *P. ananatis*. Observa-se que a adição de c09478 acelerou os efeitos de d0663, assim como pACYC-PA36ccd dobrou a produção de cisteína comparado à produção com pACYC-d0663F.

Tabela 6

Cepa	(mg/L) Cisteína	Rendimento (%)
SC 17/pMIV-CysE5/pACYC 177	200 ± 62	0,3 ± 0,10
SC 17/pMIV-CysE5/pACYC-d0663F	496 ± 75	0,8 ± 0,13
SC 17/pMI V-CysE5/pACYC-PA36ccd	906 ± 96	1,5 ± 0,16

Os mesmos experimentos foram realizados usando EYPSGint1M2 como uma cepa produtora de cisteína. Novamente, os plasmídeos pACYC-d0663F, pACYC-PA36ccd (contendo dois ORFs, d0663 e c09478) e pACYC 177 (controle) foram introduzidos, e as cepas resultantes foram submetidas à testes de produção descritos no experimento para a produção de cisteína com c0011 em *E. coli* (ver Exemplo 2-3). Para manutenção dos plasmídeos, 20 mg/L de canamicina foram suplementados durante o período de cultivo. A quantidade de compostos relacionados à cisteína e rendimento contra o açúcar consumido com valores correspondentes de desvio padrão de dados para cada cepa (fermentações independentes em quatro tubos de teste) são mostrados na tabela 7. Da maneira observada na tabela 7, a superexpressão de d0663 apresenta efeitos positivos no aumento da produção de cisteína em *P. ananatis*, que foram adicionalmente promovidos pela adição de c09478.

Tabela 7

Cepa	Cisteína (g/L)	Rendimento (%)
EYPSGint1 M2/pACYC 177	0,55 ± 0,10	1,4 ± 0,24
EYPSGint1 M2/pACYC-d0663F	0,96 ± 0,15	2,4 ± 0,37
EYPSGint 1 M2/pACYC-PA36ccd	1,34 ± 0,20	3,4 ± 0,49

Exemplo 5. Efeitos de d0663 na produção fermentativa de aminoácidos.

5-1. Efeito de d0663 na produção de aminoácidos em *P. ananatis*.

Para determinar os efeitos da superexpressão de d0663 na produção de aminoácidos, pMIV-Pnlp8-d0663(-3), pMIV-Pnlp8-d0663(-4) e pMIV-5JS (controle) foram introduzidos em *P. ananatis* SC17. As

cepas resultantes foram submetidas à testes de produção comparando a capacidade da produção fermentativa de aminoácidos. O cultivo produtivo foi executado da maneira descrita no experimento para a produção de cisteína com c0011 em *E. coli* (ver exemplo 2-3), com a exceção de que a concentração inicial de glicose foi ajustada para 60g/L e o tempo de cultivo foi 18 horas. Para manutenção dos plasmídeos, 25 mg/L de cloranfenicol foram suplementados durante o período de cultivo. A análise quantitativa de aminoácidos produzidos nos meios de cultura foi realizada usando Amino Acid Analyzer L-8900 (HITACHI). A quantidade de aminoácidos com valores correspondentes de desvio padrão de dados para cada cepa (fermentação em quatro tubos de teste independentes) é mostrada na tabela 8. Da maneira observada na tabela 8, a superexpressão de d0663 apresenta efeitos positivos no aumento da produção de valina, leucina, isoleucina e treonina.

Tabela 8

Cepa	Val (mg/L)	Leu(mg/L)	Ile (mg/L)	Thr (mg/L)
SC17/ pMIV-5JS	105,6 ± 9,3	5,8 ± ,5	3,7 ± 0,3	2,1 ± 0,1
SC17/pMIV-Pnlp8-d0663(-3)	1286,2 ± 21,0	111,7 ± 6,9	61,8 ± 3,5	58,4 ± 0,1
SC17/pMIV-Pnlp8-d0663(-4)	1367,1 ± 27,1	134,0 ± 5,8	67,1 ± 2,7	62,2 ± 3,4

Exemplo 6. Efeito de exportadores putativos Cys na produção fermentativa de L-valina por *E. coli*.

6-1. Efeito de d0663(-4) na produção de L-valina em *E. coli*

Para testar o efeito da superexpressão de d0663(-4) na produção de valina, os plasmídeos pMIV-PnlpS-d0663 (-4) e pMIV-5JS (controle) foram introduzidos na cepa produtora de L-valina H-81. A cepa H-81 foi depositada no Russian National Collection of Industrial Microorganisms (VKPM) (Rússia 113545, Moscou, 1 Dorozhny proezd, 1) em 30 de janeiro de 2001, com número de acesso VKPM B-8066, e convertida em um depósito internacional baseado no Budapest Treaty em 1 de fevereiro de 2002. As cepas resultantes foram submetidas à testes de

produção comparando a capacidade da produção fermentativa de L-valina. As células do tubo estoque (armazenadas em 25 % de glicerol, 0,9 % de NaCl a -70 °C) foram plaqueadas em L-ágar (extrato de levedura - 5 g/L, peptona- 10 g/L, NaCl- 5 g/L, ágar- 15 g/L). Para cepas e plasmídeo, o L-ágar foi suplementado com antibiótico apropriado (Ap - 100 mg/L, Km - 40 mg/L). As células de cerca de 0,5 cm² da superfície da placa foram inoculadas em meio de fermentação (2 mL) e cultivadas por 72 horas a 32 °C. A composição do meio de fermentação foi da maneira a seguir: sacarose - 60 g/L, (NH₄)₂SO₄- 15 g/L, KH₂PO₄-1,5 g/L, MgSO₄-1 g/L, tiamina- 0,1 g/L, Mameno (TN)-0,4 g/L, CaCO₃ - 25 g/L, pH 7,0 (KOH), antibióticos apropriados (Km, 50 mg/L; Ap, 100 mg/L) foram adicionados no meio.

A análise quantitativa de valina produzida no meio de cultura foi realizada usando Amino Acid Analyzer L-8900 (HITACHI). A quantidade de valina com valores correspondentes de desvio padrão de dados para cada cepa (fermentações independentes em quatro tubos de teste) é mostrada na tabela 9. Da maneira observada na tabela 9, a superexpressão de d0663(4) apresenta efeitos positivos no aumento da produção de L-valina por *E. coli*.

Tabela 9

Cepa	Val (g/L)	ODS _{ao}
H-81/pMIV-5J5	11,2 ± 0,3	33,2 ± 1,2
H-81/pMIV-Pnlp8-d0663(-4)	13,2 ± 1,2	28,7 ± 1,2

6-2. Efeito de c0011 na produção de L-valina em *E. coli*

Para testar o efeito da superexpressão de c0011 na produção de L-valina, o plasmídeo pMIV-Pnlp23-c0011 foi introduzido na cepa produtora de valina H-81. A cepa resultante junto com a cepa H-81 mãe foi submetida aos testes de produção comparando a capacidade da produção fermentativa de L-valina usando cultivo de retoalimentação em fermentadores fabricados por Marubishi.

As células foram plaqueadas em L-ágar (extrato de levedura - 5 g/L, peptona- 10 g/L, NaCl- 5 g/L, ágar- 15 g/L). Para a cepa de plasmídeo, L-ágar foi suplementado com antibiótico apropriado (Ap -100 mg/L, Km - 40 mg/L). Células de cerca de 0,5 cm² da superfície da placa foram inoculadas em meio L-caldo (triptona - 10 g/L, extrato de levedura - 5 g/L, NaCl - 5 g/L) (60 mL) e cultivadas por 20 horas a 37 °C em 240 rpm. A seguir, 40 mL de cultura semeada foram transferidos para 360 mL de meio de fermentação em jarra fermentadora e cultivados por 20 horas a 37 °C, inicialmente com agitação em 1.200 rpm e após 18 horas de cultivo a 900 rpm.

A composição do meio de fermentação foi da maneira a seguir: glicose - 30 g/L, MgSO₄ 7H₂O – 0,4 g/L, Mameno (TN) – 0,4 g/L, (NH₄)₂SO₄ – 5,0 g/L, KH₂PO₄ – 3,0 g/L, FeSO₄.7H₂O – 0,02 g/L, MnSO₄ 5H₂O – 0,02 g/L, tiamina- 0,4 mg/L, antiespuma - 0,1 mg/L, pH 6,6 (KOH). Os nutrientes da mistura (glicose - 140g, H₂O – 100 mL, amônia aquosa concentrada -53 mL) foram adicionados automaticamente para manter um pH constante de 6,6.

Os dados na produção de valina são apresentados na tabela 10. Da maneira observada na tabela 10, a superexpressão de c0011 apresenta efeito positivo no aumento da produção de valina em *E. coli*.

Tabela 10

Cepa	Y, %	OD	Val	
			g/l	g/l h
H-81	24,3	133	41,1	2,0
H-81/pMIV-Pnlp23-c0011	26,3	98	50,6	2,5

Cepa

Exemplo 7. Efeitos de d0663 na produção de O-acetil-L-serina em *E. coli*.

Para determinar efeitos da superexpressão de d0663 na produção de O-acetil-L-serina, os plasmídeos pMIV-Pnlp8-d0663(-3) e pMIV-5JS (controle) foram introduzidos na cepa produtora de cisteína

MG1655/pACYC-E1. Uma vez que a cepa MG1655/pACYC-E1 carrega CysE mutante resistente à retroalimentação no plasmídeo, esta cepa é adequada para produzir O-acetil-L-serina. As cepas resultantes foram submetidas à testes de produção comparando a capacidade da produção fermentativa de O-acetil-L-serina. O cultivo produtivo foi executado da maneira descrita no experimento com c0011 em *E. coli* (ver Exemplo 2), com a exceção de que o tempo de cultivo foi 26 horas. Para manutenção dos plasmídeos, 25 mg/L de cloranfenicol e 12,5 mg/L de tetraciclina foram suplementados durante o período de cultivo. A fim de converter a O-acetil-L-serina produzida em N-acetilserina (NAS) em pH alcalino, as amostras foram diluídas usando Tris/HCl 200mM (pH9,0). A NAS resultante foi analisada usando HPLC. As condições analíticas para HPLC foram as seguintes: coluna: Inertsil ODS-3 (GL science), vazão: 1,0 mL/min, temperatura da coluna: 40 °C, detector: UV210nm, volume da amostra: 10:1, tampão: K₂PO₄-H₃PO₄ 0,1M (pH2.2), 1-octanossulfonato de sódio 5mM. A quantidade de O-acetil-L-serina e rendimento contra o açúcar consumido com valores correspondentes de desvio padrão de dados em triplicata para cada cepa são mostrados na tabela 11. Os dados obtidos sugerem que a superexpressão de d0663 apresenta efeitos positivos no aumento da produção de O-acetil-L-serina em *E. coli*.

Tabela 11

Cepa	O-acetil-L-serina (g/L)	Rendimento (%)
MG1655/pACYC-E1/pMIV-5JS	0,20 ± 0,20	0,60 ± 0,51
MG 1655/pACYC-E1/pMIV-Pnlp8-d0663(-3)	4,1 ± 0,34	10,3 ± 0,86

Exemplo 8. Efeitos de c0011 na produção de O-acetil-L-serina em *E. coli*.

Para determinar OS efeitos da superexpressão de c0011 na produção de O-acetil-L-serina, os plasmídeos pMIV-Pnlp23-c0011 e pMIV-5JS (controle) foram introduzidos na cepa produtora de cisteína/ O-acetil-L-serina MG1655/pACYC-E1. Todo o cultivo produtivo e

procedimentos analíticos foram os mesmos da maneira descrita na produção de O-acetil-L-serina com cepa d0663 melhorada (ver exemplo 7). A quantidade de O-acetil-L-serina produzida e o rendimento contra o açúcar consumido com valores correspondentes de desvio padrão de dados em triplicata para cada cepa são mostrados na tabela 12. Os dados obtidos sugerem que a superexpressão de c0011 apresenta efeitos positivos no aumento da produção de O-acetil-L-serina em *E. coli*.

Tabela 12

Cepa	O-acetil-L-serina (g/L)	Rendimento (%)
MG1655/pACYC-EI/pMIV-5JS	$0,60 \pm 0,04$	$1,49 \pm 0,11$
MG 1655/pACYC-E I/pMIV-Pnlp23-c0011	$2,46 \pm 0,86$	$6,16 \pm 2,15$

Exemplo de referência 1. Construção de uma cepa com melhor expressão do gene cysM

1. Construção da(s) cepa(s) *P. ananatis* EYPS1976

O fragmento de DNA contendo promotor do gene nlpD de *E. coli* foi obtido usando PCR. O DNA cromossômico da cepa de *E. coli* MG1655(ATCC 700926) e oligoiniciadores P14 (SEQ ID No:23) e P15 (SEQ ID No:24) foram usados como um molde para PCR. O oligoiniciador P14 (SEQ ID No:23) contém um sítio para Sall restritase na extremidade 5' deste. O oligoiniciador P 15 (SEQ ID No:24) contém um sítio para PaeI restritase na extremidade 5' deste. As condições para PCR foram da maneira a seguir: etapa de desnaturação por 3 minutos a 95 °C, perfil para os dois primeiros ciclos: 1 minuto a 95 °C, 30 segundos a 50 °C, 40 segundos a 72 °C; perfil para os últimos 25 ciclos: 20 segundos a 94 °C, 20 segundos a 55 °C, 15 segundos a 72 °C; etapa final: 5 minutos a 72 °C. O fragmento de DNA amplificado foi cerca de 0,2 kb em tamanho, ele foi purificado por eletroforese em gel de agarose. A seguir, o fragmento purificado foi tratado com endonucleases PaeI e Sall. O fragmento de DNA obtido foi então ligado com plasmídeo pMIV-5JS (a construção do plasmídeo pMIV-5JS é descrita em EP1942183B1) previamente tratado

com endonucleases PaeI e Sall. A mistura para a ligação foi incubada a 4 °C por toda a noite e foi então usada para transformar a cepa de *E. coli* MG1655 por eletroporação. Os transformantes foram plaqueados em placas com ágar LB contendo ampicilina (50mg/L), as placas foram incubadas a 37°C por toda a noite até que colônias individuais se tornassem visíveis. Os plasmídeos foram isolados dos transformantes obtidos e avaliados por análise de restrição. O plasmídeo obtido contendo o promotor do gene *nlpD* de *E. coli* foi denominado pMIV-Pnlp0.

O fragmento de DNA contendo o terminador do gene *rrnB* de *E. coli* foi obtido usando PCR. O DNA cromossômico da cepa de *E. coli* MG1655 e oligoiniciadores P 16 (SEQ ID No:25) e P 17 (SEQ ID No:26) foram usados como um molde para PCR. O oligoiniciador P 16 (SEQ ID No:25) contém um sítio para XbaI restritase na extremidade 5' deste. O oligoiniciador P 17 (SEQ ID No:26) contém um sítio para BamHI restritase na extremidade 5' deste. As condições para PCR foram da maneira a seguir: etapa de desnaturação por 3 minutos a 95 °C; perfil para os dois primeiros ciclos: 1 minuto a 95 °C, 30 segundos a 50 °C, 40 segundos a 72 °C; perfil para os últimos 25 ciclos: 20 segundos a 94 °C, 20 segundos a 59 °C, 15 segundos a 72 °C; etapa final: 5 minutos a 72 °C.

O fragmento de DNA amplificado foi cerca de 0,3 kb em tamanho e foi purificado por eletroforese em gel de agarose. A seguir, o fragmento purificado foi tratado com endonucleases BamHI e XbaI. O fragmento de DNA obtido foi então ligado com plasmídeo pMIV-Pnlp0 previamente tratado com endonucleases BamHI e XbaI. A mistura para a ligação foi incubada a 4 °C por toda a noite e foi então usada para transformar a cepa de *E. coli* MG 1655 por eletroporação. Os transformantes foram plaqueados em placas com ágar LB contendo ampicilina (50mg/I), as placas foram incubadas a 37 °C por toda a noite até que colônias individuais se tornassem visíveis. Os plasmídeos foram isolados dos

transformantes obtidos e avaliados por análise de restrição. O plasmídeo obtido contendo o terminador do gene *rrnB* de *E. coli* foi denominado pMIV-Pnlp0-ter.

O fragmento de DNA contendo o gene *yeaS* de *E. coli* foi obtido usando PCR. O DNA cromossômico de *E. coli* MG 1655 cepa e oligoiniciadores P 18 (SEQ ID No:27) e P19 (SEQ ID No:28) foram usados como um molde para PCR. O oligoiniciador P18 (SEQ ID No:27) contém um sítio para *Sall* restritase na extremidade 5' deste. O oligoiniciador P19 (SEQ ID No:28) contém um sítio para *XbaI* restritase na extremidade 5' deste. As condições para PCR foram da maneira a seguir: etapa de desnaturação por 3 minutos a 95 °C; perfil para os dois primeiros ciclos: 1 minuto a 95 °C, 30 segundos a 50 °C, 40 segundos a 72 °C; perfil para os últimos 25 ciclos: 20 segundos a 94 °C, 20 segundos a 55 °C, 15 segundos a 72 °C; etapa final: 5 minutos a 72 °C. O fragmento de DNA amplificado foi cerca de 0,7 kb em tamanho e foi purificado por eletroforese em gel de agarose. A seguir, o fragmento purificado foi tratado com endonucleases *Sall* e *XbaI*. O fragmento de DNA obtido foi então ligado com plasmídeo pMIV-Pnlp0-ter previamente tratado com endonucleases *Sall* e *XbaI*. A mistura para a ligação foi incubada a 4 °C por toda a noite e foi então usada para transformar a cepa de *E. coli* MG1655 por eletroporação. Os transformantes foram plaqueados em placas com ágar LB contendo ampicilina (50mg/L), as placas foram incubadas a 37 °C por toda a noite até que colônias individuais se tornassem visíveis. Os plasmídeos foram isolados dos transformantes obtidos e avaliados por análise de restrição. O plasmídeo obtido contendo o gene *yeaS* de *E. coli* foi denominado pMIV-Pnlp0-yeaS3.

A seguir, a randomização da região 10 do promotor Pnlp e a seleção do promotor Pnlp8 foram realizadas. A extremidade 3' do promotor Pnlp foi obtida usando amplificação por PCR. O plasmídeo

pMIV-Pnlp0 e oligoiniciadores P14 (SEQ ID No:23) e P20 (SEQ ID No:29) foram usados como um molde para PCR. O oligoiniciador P20 apresenta nucleotídeos aleatórios, representados em SEQ ID NO: 29 pela letra "n" (para A ou G ou C ou T) e sítio para BglIII restritase na extremidade 5' deste. As condições para PCR foram da maneira a seguir: etapa de desnaturação por 3 minutos a 95 °C; perfil para os dois primeiros ciclos: 1 minuto a 95 °C, 30 segundos a 50 °C, 40 segundos a 72 °C; perfil para os últimos 25 ciclos: 20 segundos a 94 °C, 20 segundos a 60 °C, 15 segundos a 72 °C; etapa final: 5 minutos a 72 °C. A extremidade 5' do promotor Pnlp foi obtida usando amplificação por PCR. O plasmídeo pMIV-Pnlp0 e oligoiniciadores P15 (SEQ ID No:24) e P21 (SEQ ID No:30) foram usados como um molde para PCR. O oligoiniciador P21 apresenta nucleotídeos aleatórios, representados em SEQ ID NO: 30 pela letra "n" (para A ou G ou C ou T) e sítio para BglIII restritase na extremidade 5' deste. As condições para PCR foram da maneira a seguir: etapa de desnaturação por 3 minutos a 95°C; perfil para os dois primeiro ciclos: 1 minuto a 95 °C, 30 segundos a 50 °C, 40 segundos a 72 °C; perfil para os últimos 25 ciclos: 20 segundos a 94 °C, 20 segundos a 60 °C, 15 segundos a 72 °C; etapa final: 5 minutos a 72 °C. Ambos os fragmentos de DNA amplificados foram purificados por eletroforese em gel de agarose. A seguir, os fragmentos de DNA obtidos foram tratados com endonuclease BglIII seguido por ligação dos fragmentos em proporção equimolar. A mistura para a ligação foi incubada a 4 °C por toda a noite e foi então usada como um molde para o próximo procedimento de PCR, oligoiniciadores P14 (SEQ ID No:23) e P15 (SEQ ID No:24) foram usados para o PCR. As condições para PCR foram da maneira a seguir: etapa de desnaturação por 3 minutos a 95 °C; perfil para os dois primeiros ciclos: 1 minuto a 95 °C, 30 segundos a 50 °C, 40 segundos a 72 °C; perfil para os últimos 12 ciclos: 20 segundos a 94 °C, 20 segundos a 60 °C, 15 segundos a 72 °C; etapa final: 5

minutos a 72 °C.

O fragmento de DNA amplificado foi cerca de 0,2 kb em tamanho e foi purificado por eletroforese em gel de agarose. A seguir, o fragmento purificado foi tratado com endonucleases PaeI e Sall. O
5 fragmento de DNA obtido foi então ligado com plasmídeo pMIV-Pnlp0-yeaS3 previamente tratado com endonucleases PaeI e Sall. A mistura para a ligação foi incubada a 4 °C por toda a noite e foi então usada para transformar a cepa de *E. coli* MG 1655 por eletroporação. Os transformantes foram plaqueados em placas com ágar LB contendo
10 ampicilina (50mg/l), as placas foram incubadas a 37 °C por toda a noite até que colônias individuais se tornassem visíveis. Os plasmídeos foram isolados dos transformantes obtidos e avaliados por análise de sequenciamento. O plasmídeo obtido contendo promotor Pnlp8 foi denominado pMIVPnlp8-yeaS7.

15 A seguir, o plasmídeo pMIV-Pnlp8-yeaS7 foi tratado com endonuclease HindIII seguido por purificação e tratamento com fragmento grande de DNA polimerase I (fragmento Klenow). O fragmento de DNA obtido foi purificado e tratado com endonuclease NcoI.

O fragmento de DNA obtido após purificação foi então
20 ligado em proporção equimolar com plasmídeo pMT-Pomp-cysE5 (pMT-Pomp-cysE5 foi derivado de pMIV-Pomp-cysE5 por clonagem de XbaI-Eco881/fragmento Klenow de pACYC-184 (tet-R) no sítio PvuI de pMIV-Pomp-cysE5. O pMIV-Pomp-cysE5 foi obtido subclonando o fragmento PaeI+SacI de pMW-Pomp-cysE5 (W02005007841) nos mesmos sítios de
25 pMIV-5JS) previamente tratado com endonucleases SmaI e NcoI. A mistura para a ligação foi incubada a 4 °C por toda a noite e foi então usada para transformar a cepa de *E. coli* MG 1655 por eletroporação. Os transformantes foram plaqueados em placas com ágar LB contendo ampicilina (50mg/L), as placas foram incubadas a 37 °C por toda a noite

até que colônias individuais se tornassem visíveis. Os plasmídeos foram isolados dos transformantes obtidos e avaliados por análise de restrição. O plasmídeo obtido contendo *cysE5* foi denominado pMT-EY2. A atividade enzimática de serina acetiltransferase foi medida no transformante obtido a fim de confirmar a intactabilidade do alelo *cysE5*.

A próxima etapa foi integrar os genes *cysE5* e *yeaS* no cromossomo da cepa *P. ananatis* SC17 (patente US 6.596.517). O plasmídeo pMH10 (Zimenkov D. et al., *Biotechnology (em Russo)*, 6, 1-22 (2004)) foi usado para transformar a cepa *P. ananatis* SC17 por eletroporação. Os transformantes foram plaqueados em placas com ágar LB contendo canamicina (20 mg/L), as placas foram incubadas a 30 °C por toda a noite até que colônias individuais se tornassem visíveis. A cepa obtida SC17/pMH10 foi ressemeada duas vezes. Após isto, o plasmídeo pMT-EY2 foi usado para transformar a cepa *P. ananatis* SC17/pMH10 (esta cepa foi crescida a 30 °C) por eletroporação. Os transformantes sofreram choque por incubação em alta temperatura (42 °C, 20 min) e foram plaqueados em placas com ágar LB contendo cloranfenicol (20mg/L); as placas foram incubadas a 39 °C por toda a noite até que colônias individuais se tornassem visíveis. Cerca de 50 clones foram ressemeados a 39 °C e cada um deles foi inoculado em 1 mL de meio LA e incubado a 39 °C por 48 horas. Após incubação, todas as 50 variações foram testadas pela cura dos plasmídeos pMH10 e pMT-EY2, as variações que foram selecionadas foram resistentes ao cloranfenicol (20mg/L), mas sensíveis à canamicina (20mg/L) e ampicilina (50mg/L). Os integrantes desejados foram identificados por análise de PCR usando oligoiniciadores P1 e P6.

As linhagens obtidas de cepas foram denominadas EY01-EY50 e todas elas foram testadas por sua capacidade de produzir cisteína em fermentação em tubo teste. A melhor cepa EY19 produtora foi

selecionada e usada nos experimentos a seguir.

Para curar a cepa *P. ananatis* EY 19 da resistência ao cloranfenicol, a cepa EY19 foi transformada com o plasmídeo pMT-Int-Xis2 (W02005/010175) usando eletroporação. Os transformantes foram
5 plaqueados em placas com ágar LB contendo tetraciclina (10 mg/L); as placas foram incubadas a 30 °C por toda a noite até que colônias individuais se tornassem visíveis. Os transformantes objetivos foram identificados selecionando variações que foram sensíveis ao cloranfenicol (20 mg/L). A cepa "curada" foi denominada EY 19(s).

10 A próxima etapa foi substituir a região promotora dos genes cysPTWA pela região promotora Pnlp8 na cepa EY 19(s). A PCR foi realizada usando o plasmídeo pMIV-Pnlp8-yeaS7 como um molde e oligoiniciadores P14 e P15. As condições para PCR foram da maneira a seguir: etapa de desnaturação por 3 minutos a 95 °C; perfil para os dois
15 primeiros ciclos: 1 minuto a 95 °C, 30 segundos a 50 °C, 40 segundos a 72 °C; perfil para os últimos 20 ciclos: 20 segundos a 94 °C, 20 segundos a 59 °C, 15 segundos a 72 °C; etapa final: 5 minutos a 72 °C. O fragmento de DNA amplificado foi cerca de 0,2 kb em tamanho e foi purificado por eletroforese em gel de agarose. A seguir, o fragmento purificado foi tratado
20 com fragmento Klenow. O fragmento de DNA foi então ligado em proporção equimolar com plasmídeo pMW 118-(λ attL-Km^r- λ attR) (EP2100957A 1) previamente tratado com endonuclease XbaI, seguido por tratamento com fragmento Klenow. A mistura para a ligação foi incubada a 4 °C por toda a noite e foi então usada para transformar a cepa de *E. coli*
25 MG 1655 por eletroporação. Os transformantes foram plaqueados em placas com ágar LB contendo canamicina (20mg/L), as placas foram incubadas a 37 °C por toda a noite até que colônias individuais se tornassem visíveis. Os plasmídeos foram isolados dos transformantes e avaliados por análise de restrição. O plasmídeo obtido contendo o promotor Pnlp foi denominado

pMW-Km-Pnlp8. A seguir, a PCR foi realizada usando o plasmídeo pMW-Km-Pnlp8 como um molde e oligoiniciadores P22 (SEQ ID No:31) e P23 (SEQ ID No:32). As condições para PCR foram da maneira a seguir: etapa de desnaturação por 3 minutos a 95 °C; perfil para os dois primeiros ciclos: 1 minuto a 95 °C, 30 segundos a 50 °C, 40 segundos a 72 °C; perfil para os últimos 30 ciclos: 20 segundos a 94 °C, 20 segundos a 54 °C, 90 segundos a 72 °C; etapa final: 5 minutos a 72 °C. O fragmento de DNA obtido foi cerca de 1,6 kb em tamanho e foi purificado por eletroforese em gel de agarose usado para transformar a cepa *P. ananatis* SC17(0) por eletroporação. Os transformantes foram plaqueados em placas com ágar LB contendo canamicina (20mg/L); as placas foram incubadas a 34 °C por toda a noite até que colônias individuais se tornassem visíveis. Os transformantes objetivos foram identificados por análise de PCR usando oligoiniciadores P24 (SEQ ID No:33) e P25 (SEQ ID No:34). A cepa obtida foi denominada SC17-Pnlp8-PTWA. O DNA cromossômico foi isolado da cepa SC17-Pnlp8-PT WA. 10 µg deste DNA cromossômico foram usados para transformar a cepa *P. ananatis* EY 19(s) por eletroporação. Os transformantes foram plaqueados em placas com ágar LB contendo canamicina (20mg/L), as placas foram incubadas a 34 °C por toda a noite até que colônias individuais se tornassem visíveis. Os transformantes foram identificados por análise de PCR usando oligoiniciadores P24 e P25. A cepa obtida foi denominada EYP 197. Para curar a cepa *P. ananatis* EYP 197 da resistência a canamicina, a cepa EYP 197 foi transformada com o plasmídeo pMT-Int-Xis2 por eletroporação. Os transformantes foram plaqueados em placas com ágar LB contendo tetracilcina (10mg/L); as placas foram incubadas a 30 °C por toda a noite até que colônias individuais se tornassem visíveis. Os transformantes objetivos foram identificados selecionando variações que foram sensíveis à canamicina (20mg/L). A cepa "curada" foi denominada EY 197(s).

A mutação N348A foi introduzida por mutagênese sítio específica. Com este propósito, a extremidade 3' do gene *serA* (com mutação) foi obtida por amplificação por PCR usando DNA cromossômico da cepa SC17 como um molde e oligoiniciadores P26 (SEQ ID No:35) e P27 (SEQ ID No:36), e a extremidade 5' do gene *serA* foi obtido por amplificação por PCR usando o DNA cromossômico da cepa SC17 como um molde e oligoiniciadores P28 (SEQ ID No:37) e P29 (SEQ ID No:38). Tanto o oligoiniciador P27 (SEQ ID No:36) quanto o P29 (SEQ ID No:38) contêm um sítio para *SmaI* restritase na extremidade 5' deste. As condições para a primeira PCR foram como a seguir: etapa de desnaturação por 3 minutos a 95 °C; perfil para os dois primeiros ciclos: 1 minuto a 95 °C, 30 segundos a 50 °C, 40 segundos a 72 °C; perfil para os últimos 25 ciclos: 20 segundos a 94 °C, 20 segundos a 60 °C, 60 segundos a 72 °C; etapa final: 5 minutos a 72 °C. As condições para a segunda PCR foram da maneira a seguir: etapa de desnaturação por 3 minutos a 95 °C; perfil para os dois primeiros ciclos: 1 minuto a 95 °C, 30 segundos a 50 °C, 40 segundos a 72 °C; perfil para os últimos 20 ciclos: 20 segundos a 94 °C, 20 segundos a 60 °C, 20 segundos a 72 °C; etapa final: 5 minutos a 72 °C. Ambos os fragmentos de DNA amplificados foram purificados por eletroforese em gel de agarose seguido por tratamento com endonuclease *SmaI*. Os fragmentos de DNA obtidos foram então ligados em proporção equimolar. A mistura para a ligação foi incubada a 4 °C por toda a noite e foi usada como um molde para o próximo procedimento de PCR (com oligoiniciadores P26 e P28). O oligoiniciador P26 (SEQ ID No:35) contém um sítio para *SalI* restritase na extremidade 5' deste. O oligoiniciador P28 (SEQ ID No:37) contém um sítio para *XbaI* restritase na extremidade 5' deste. As condições para PCR foram da maneira a seguir: etapa de desnaturação por 3 minutos a 95 °C; perfil para os dois primeiros ciclos: 1 minuto a 95 °C, 30 segundos a 50 °C, 40 segundos a 72

°C; perfil para os últimos 15 ciclos: 20 segundos a 94 °C, 20 segundos a 60 °C, 75 segundos a 72 °C; etapa final: 5 minutos a 72 °C. O fragmento de DNA amplificado foi cerca de 1,3 kb em tamanho e foi purificado por eletroforese em gel de agarose. O fragmento obtido foi tratado com endonucleases SalI e XbaI. Após restrição, fragmento de DNA foi ligado em proporção equimolar com o plasmídeo pMIV-Pnlp8-ter previamente tratado com endonucleases SalI e XbaI. A mistura para a ligação foi incubada a 4 °C por toda a noite e foi então usada para transformar a cepa de *E. coli* MG1655 por eletroporação. Os transformantes foram plaqueados em placas com ágar LB contendo ampicilina (50mg/L), as placas foram incubadas a 37 °C por toda a noite até que colônias individuais se tornassem visíveis. Os plasmídeos foram isolados dos transformantes e avaliados por análise de sequenciamento. O plasmídeo obtido contendo gene serA com mutação N348A foi denominado pMIV-Pnlp8-serA348.

A próxima etapa foi integrar o alelo serA348 no cromossomo da cepa *P. ananatis* SC17. O DNA de plasmídeo DNA pMIV-Pnlp8-serA348 foi usado para transformar a cepa *P. ananatis* SC17/pMH10 (esta cepa foi crescida a 30 °C) por eletroporação. Os transformantes sofreram choque por incubação em alta temperatura (42 °C, 20 minutos) e plaqueados em placas com ágar LB contendo cloranfenicol (20mg/L), as placas foram incubadas a 39 °C por toda a noite até que colônias individuais se tornassem visíveis. Cerca de 50 clones foram ressemeados a 39 °C e a seguir cada um deles foi inoculado em 1 mL de meio LA e incubado a 39 °C por 48 horas. Após incubação, todas as 50 variações foram testadas para a cura dos plasmídeos pMH10 e pMIV-Pnlp8 serA348 selecionando variações que foram resistentes ao cloranfenicol (20mg/L), mas sensíveis à canamicina (20mg/L) e ampicilina (50mg/L). Os integrantes objetivos foram identificados por análise de PCR usando oligoiniciadores P14 e P28. Em todas as variações obtidas, a atividade específica de PGD foi medida e aquele mais ativo foi selecionado com o propósito a seguir. Ele foi

denominado SC17 int-serA348.

A próxima etapa foi transferir uma cópia integrada de serA348 na cepa EYP197(s). O DNA cromossômico foi isolado da cepa SC17int-serA348. 10µg deste DNA cromossômico foram usados para transformar *P. ananatis* EYP 197(s) por eletroporação. Os transformantes foram plaqueados em placas com ágar LB contendo cloranfenicol (20mg/L), as placas foram incubadas a 34 °C por toda a noite até que colônias individuais se tornassem visíveis. Os transformantes objetivos foram identificados por análise de PCR usando oligoiniciadores P14 e P28. Esta cepa foi denominada EYPS 1976.

Para curar a cepa *P. ananatis* EYPS1976 da resistência ao cloranfenicol, a cepa EYPS 1976 foi transformada com o plasmídeo pMT-Int-Xis2 por eletroporação. Os transformantes foram plaqueados em placas com ágar LB contendo tetraciclina (10mg/L), e as placas foram incubadas a 30 °C por toda a noite até que colônias individuais se tornassem visíveis. Os transformantes objetivos foram identificados selecionando variações que foram sensíveis ao cloranfenicol (20mg/L). Esta cepa "curada" foi denominada EYPS 1976(s).

2.Construção da cepa EYPSGint1M2

A cepa EYPSGint1M2 foi obtida por integração do gene *cysM* que codifica O-acetilserina (tiol)-liase B de *E. coli* no cromossomo de EYPS1976(s). Na primeira etapa, a integração de *cysM* foi obtida como um resultado da integração mini-µ do plasmídeo pMIV-Pnlp1-*cysM* (Exemplo de referência 2) no cromossomo da cepa SC17 usando µ-transposase que carrega o plasmídeo pMH10 (da maneira descrita anteriormente). A construção obtida (int(Pnlp I-*cysM*)) foi transferida da cepa SC17 na cepa EYPS1976(s) por um procedimento de transformação de cromossomo usando marcador Cm^R para seleção. Esta cepa foi denominada EYPSGint1M2 e após a cura do marcador de resistência a antibióticos, foi usada para experimentos adicionais.

Exemplo de referência 2. Construção do plasmídeo pMIV-

Pnlpl-cysM

A região promotora do gene *nlpD* de *P. ananatis* foi amplificada por PCR usando oligoiniciadores P30 (SEQ ID NO: 39) e P31 (SEQ ID NO: 40) e DNA cromossômico da cepa SC17 como um molde. O fragmento de DNA
5 obtido foi cerca de 0,2 kb em tamanho e foi purificado por eletroforese em gel de agarose e digerido com PaeI e SalI endonucleases seguido por ligação com plasmídeo pMIV-5JS, previamente tratado com as mesmas endonucleases.

A região do terminador do gene *rrnB* de *E. coli* foi amplificada por PCR usando oligoiniciadores P32 (SEQ ID NO: 41) e P33 (SEQ ID NO:
10 42) e DNA cromossômico da cepa MG 1655 como um molde. O fragmento de DNA obtido tinha cerca de 0,25 kb em tamanho e foi purificado por eletroforese em gel de agarose e digerido com XbaI e BamHI endonucleases, seguido por ligação com o plasmídeo obtido na etapa prévia, previamente tratado com as mesmas endonucleases.

O gene *cysM* de *E. coli* foi amplificado por PCR usando oligoiniciadores P34 (SEQ ID NO: 43) e P35 (SEQ ID NO: 44) e DNA cromossômico da cepa MG 1655 como um molde. O fragmento de DNA
15 obtido tinha cerca de 1,1 kb em tamanho e foi purificado por eletroforese em gel de agarose e digerido com SalI e XbaI endonucleases, seguido por ligação com o plasmídeo obtido na etapa prévia, previamente tratado com as mesmas endonucleases. Assim, o plasmídeo pMIV-Pnlpl-cysM foi obtido.
20

Embora a invenção tenha sido descrita em detalhes com referência às modalidades preferidas desta, será aparente aos versados na técnica que várias mudanças podem ser feitas, e equivalentes empregados,
25 sem fugir do escopo da invenção. Cada um dos documentos anteriormente mencionados é aqui incorporado pela referência na sua íntegra.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir um L-aminoácido não aromático, caracterizado pelo fato de que compreende cultivar uma bactéria pertencente ao gênero *Escherichia* ou *Pantoea* em um meio de cultura, e coletar o L-aminoácido do meio de cultura, em que a bactéria é capaz de produzir L-aminoácido e foi modificada para aumentar a expressão de um gene codificando uma proteína que é capaz de conferir a uma bactéria resistência à inibição do crescimento por L-cisteína em comparação com a bactéria não modificada, em que a dita proteína é selecionada do grupo que consiste em:

(A) a proteína de SEQ ID NO: 2; e

(B) a proteína de SEQ ID NO: 4,

em que a expressão do gene é aumentada pelo aumento no número de cópias do gene ou pela modificação de uma sequência de regulação de expressão do gene.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o gene é o gene c0011, que consiste em um DNA que compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 1.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o gene é o gene d0663, que consiste em um DNA que compreende a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 3

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a bactéria foi modificada para aumentar pelo menos uma atividade da proteína (B) e foi modificada adicionalmente para aumentar a expressão de um gene que codifica a proteína de SEQ ID NO: 6 em comparação com a bactéria não modificada, em que a expressão do gene é aumentada pelo aumento do número de cópias do gene ou modificação de uma sequência de regulação de expressão do gene.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o gene é o gene c09478, em que o gene c09478 consiste em um DNA que compreende uma sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 5.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a bactéria é *Escherichia coli*, em que o dito L-aminoácido é selecionado do grupo que consiste em L-treonina, L-cisteína, L-leucina, L-isoileucina, L-valina, L-histidina, glicina, L-alanina, ácido L-glutâmico e O-acetil-L-serina.

7. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a bactéria é *Pantoea ananatis*, em que o dito L-aminoácido é selecionado do grupo que consiste em L-cisteína, L-valina, L-leucina, L-Isoleucina e L-treonina.

FIGURA 1

