



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

(21) BR 102016008872-0 A2



(22) Data do Depósito: 20/04/2016

(43) Data da Publicação Nacional: 04/06/2019

(54) Título: MÉTODO PARA PRODUZIR L-ISOLEUCINA

(51) Int. Cl.: C12P 13/06; C12N 15/31; C12N 15/67; C12R 1/19; C12R 1/01.

(30) Prioridade Unionista: 22/04/2015 JP 2015114955.

(71) Depositante(es): AJINOMOTO CO., INC..

(72) Inventor(es): CHRISTINA DMITRIEVNA HOOK; VALERY VASILIEVICH SAMSONOV; NATALIA SERGEEVNA EREMINA; NATALIA VIKTOROVNA STOYNOVA; TATIYANA SERGEEVNA SIDOROVA.

(57) Resumo: MÉTODO PARA PRODUZIR L-ISOLEUCINA A presente invenção fornece um método para produzir L-soleucina por fermentação usando uma bactéria pertencendo à família Enterobacteriaceae que está modificada para superexpressar o gene *cycA*. O método também permite reduzir a produção de aminoácido(s) subproduto(s) de L-soleucina durante a fermentação da bactéria Enterobacteriaceae tendo uma capacidade para produção de L-soleucina.

“MÉTODOS PARA PRODUZIR L-ISOLEUCINA”

Fundamentos da Invenção

Campo da invenção

[001] A presente invenção refere-se de modo geral à indústria microbiológica, e especificamente a um método para produzir L-isoleucina por fermentação de uma bactéria da família *Enterobacteriaceae* que está modificada para superexpressar o gene *cycA*, de modo que seja reduzida a produção de aminoácido(s) subproduto(s) de L-isoleucina.

Descrição da técnica relacionada

[002] Convencionalmente, L-aminoácidos são industrialmente produzidos por métodos de fermentação utilizando cepas de microrganismos obtidas de fontes naturais, ou seus mutantes. Tipicamente, os microrganismos são modificados para intensificar os rendimentos de produção de L-aminoácidos.

[003] Muitas técnicas para intensificar os rendimentos de produção de L-aminoácidos têm sido relatadas, incluindo a transformação de microrganismos com DNA recombinante (consulte, por exemplo, Patente U.S. nº 4.278.765 A) e alteração de regiões regulatórias de expressão como promotores, sequências líderes, e/ou atenuadores, ou outras conhecidas pela pessoa versada na técnica (consulte, por exemplo, US20060216796 A1 e WO9615246 A1). Outras técnicas para intensificar os rendimentos de produção incluem aumentar as atividades de enzimas envolvidas em biossíntese de aminoácido e/ou dessensibilizar as enzimas-alvo envolvidas em biossíntese de aminoácido à inibição de retroalimentação pelo L-aminoácido resultante (consulte, por exemplo, WO9516042 A1, EP0685555 A1 ou Patentes U.S. nºs 4.346.170 A, 5.661.012 A, e 6.040.160 A).

[004] Um outro método para intensificar os rendimentos de produção de L-aminoácidos é atenuar a expressão de um gene ou de vários genes que estão envolvidos em degradação do L-aminoácido-alvo, de genes

que desviam os precursores do L-aminoácido-alvo da rota biossintética de L-aminoácido, dos genes envolvidos na redistribuição dos fluxos de carbono, de nitrogênio, e de fosfato, e dos genes que codificam toxinas, etc.

[005] A L-isoleucina é um aminoácido essencial em humanos e outros animais, e pode ser usada como um material para vários fármacos medicinais. Por exemplo, a L-isoleucina pode ser utilizada como um suplemento nutricional para promover nutrição. A L-isoleucina tem dois centros quirais em sua cadeia principal de carbonos, um dos quais é seu átomo de carbono central (alfa) e o outro é seu átomo de carbono beta na cadeia lateral. Portanto é difícil industrialmente sintetizar isômero-L; isto é, o isômero-2*S*,3*S* de isoleucina por um método de síntese química com um grau alto de pureza em preço baixo.

[006] A L-isoleucina pode ser produzida a partir de seus vários precursores, como, por exemplo, ácido alfa-aminobutírico (α ABA, *alpha-aminobutyric acid*), ácido alfa-hidroxi-butírico (α HBA, *alpha-hydroxybutyric acid*), treonina, ácido aspártico, ou ácido fumárico, quando um microrganismo é cultivado em um meio contendo o precursor, uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio, e outros nutrientes (Patentes U.S. n°s 3.058.888, 3.262.861, e 3.231.478).

[007] Tem sido desenvolvido um método para produzir L-isoleucina por imobilização nativa de células da cepa AB-07 de *Brevibacterium flavum* que podem metabolizar os precursores nas rotas biossintéticas de L-isoleucina, como ácido alfa-aminobutírico (α ABA) e ácido alfa-cetobutírico (α KBA, *alpha-ketobutyric acid*) (Terasawa M. *et al.*, “Depression of by-product formation during L-isoleucine production by a living-cell reaction process”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1991, 35(3):348-351). Ademais, o processo de reação com células vivas (LCR, *living cell reaction*) foi aplicado às células imobilizadas da cepa *Corynebacterium glutamicum* MJ-233 (anteriormente *Brevibacterium flavum*) para produzir L-isoleucina a partir de

etanol como a fonte de energia e α KBA como o precursor (revisado de modo geral em Jojima, T., Inui, M. e Yukawa, H. "Aminoacids, branched chain, L-isoleucine // Encyclopedia of Industrial Biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology", pp. 1-6, M.C. Flickinger (ed.), John Wiley & Sons, Inc., 2010). Entretanto, estes métodos exigem o uso de precursores caros e, por conseguinte, não são considerados úteis para a produção industrial de L-isoleucina em preço baixo.

[008] Ademais, têm sido descritos métodos para produzir L-isoleucina que incluem um método que utiliza *Escherichia coli* (*E. coli*) resistente aos análogos de isoleucina (Publicação Aberta à Inspeção Pública de Patente Japonesa nº 5-130882), um método que utiliza uma cepa recombinante de *E. coli* integrada com um fragmento de DNA que codifica treonina-desaminase (Publicação Aberta à Inspeção Pública de Patente Japonesa nº 2-458), um método que utiliza os microrganismos mutantes que pertencem ao gênero *Corynebacterium* resistentes à metil-lisina (Publicação Aberta à Inspeção Pública de Patente Japonesa nº 61-15696) ou ao ácido amino-hidroxicinâmico (AHVA, *amino-hydroxyvaleric acid*) (Patente U.S. nº 3,767,529), e um método que utiliza uma cepa recombinante de *Corynebacterium glutamicum* transformada com um gene que codifica homosserina-desidrogenase (Publicação Aberta à Inspeção Pública de Patente Japonesa nº 60-12995). Também é sabido que a capacidade de produzir L-isoleucina pode ser concedida pela introdução do operon *thrABC* que contém o gene *thrA* que codifica aspartato-quinase I / homosserina-desidrogenase I derivado de *E. coli*, cuja inibição pela L-treonina está substancialmente dessensibilizada, e o operon *ilvGMEDA* que contém o gene *ilvA* que codifica treonina-desaminase, cuja inibição pela L-isoleucina está substancialmente dessensibilizada e do qual uma região necessária para atenuação está removida (EP0685555 B1).

[009] Também tem sido relatado que a capacidade para produzir

substâncias como L-aminoácidos pode ser aprimorada pelo aumento da atividade enzimática de nicotinamida-nucleotídeo-trans-hidrogenase (também chamada de “trans-hidrogenase”) em células microbianas, de modo que a capacidade de produção do microrganismo de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzido (NADPH, *reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) está aumentada (WO9511985 A1). Nesta referência, também é mencionado um exemplo de aprimoramento de capacidade de produção de L-isoleucina de *E. coli* pelo aumento da atividade de trans-hidrogenase. Um outro método para produzir L-isoleucina descreve o uso de uma bactéria pertencendo ao gênero *Escherichia* que está modificada para intensificar as atividades de fosfoenolpiruvato-carboxilase e trans-hidrogenase intracelulares (EP1179597 B1).

[0010] Entretanto, uma desvantagem bem conhecida da produção de L-isoleucina por fermentação de um microrganismo é a acumulação de aminoácidos subprodutos em uma quantidade relativamente grande em comparação com a quantidade da L-isoleucina (Terasawa M. *et al.*, 1991; Komatsubara, S. “Aminoacids: genetically engineered *Serratia marcescens* // Recombinant microbes for industrial and agricultural applications”, pp.474-477, Y. Murooka e T. Imanaka (eds.), Marcel Dekker, Inc., 1994; Terasawa, M. e Yukawa, H. “Industrial production of biochemicals by native immobilization // Industrial application of immobilized biocatalysts”, pp. 44-52, A. Tanaka, T. Tosa e T. Kobayashi (eds.), Marcel Dekker, Inc., 1993; Jojima T. *et al.*, 2010). Os aminoácidos subprodutos, como, por exemplo, valina (Val), leucina (Leu), alanina (Ala), glicina (Gly), norvalina (nVal), O-etil-homosserina (O-EH) e ácido alfa-aminobutírico (α ABA), podem se acumular consideravelmente no líquido de fermentação durante a fermentação de microrganismos produtores de L-isoleucina. Devido ao fato de as características físico-químicas dos aminoácidos subprodutos produzidos durante a fermentação de L-isoleucina serem muito similares às daquelas da L-

isoleucina, é muito difícil isolar a L-isoleucina com um grau suficiente de pureza em preço razoável usando métodos de separação comuns como, por exemplo, cromatografia. Por conseguinte, é de importância específica reduzir a produção de aminoácidos subprodutos no método para a produção de L-isoleucina por fermentação. A partir do ponto de vista de produção industrial, o aprimoramento de um método para produzir L-isoleucina por fermentação de microrganismos produtores de L-isoleucina que estão destituídos de ou produzem menos aminoácidos subprodutos é um grande desafio porque um tal método aprimorado tem o potencial para produzir L-isoleucina com o grau alto de pureza em preço baixo.

[0011] Tem sido relatado um método para reduzir a produção de subprodutos de uma substância-alvo pela deleção ou atenuação do sistema de biossíntese do subproduto (por exemplo, “Amino acid fermentation” *Gakkai Shuppan Center*, p.4, 1986). Entretanto, neste método, quando um microrganismo é cultivado, o subproduto anteriormente mencionado precisa ser adicionado ao meio na quantidade necessária para o crescimento do microrganismo. Também têm sido descritos outros métodos para reduzir a produção de aminoácidos subprodutos, como L-triptofano, L-fenilalanina, L-isoleucina e/ou L-valina (EP1484410 A1) ou ácido L-glutâmico (EP 2360263 A1), pelo aprimoramento de um sistema para absorção celular do subproduto de uma substância-alvo. Por exemplo, o sistema celular para a absorção de L-leucina (LivK) foi aprimorado em *E. coli* para reduzir a subprodução de L-leucina quando a bactéria era cultivada para produzir L-isoleucina como a substância-alvo (EP1484410 A1).

[0012] Entretanto, não têm sido previamente relatados nenhuns dados que demonstram o efeito de superexpressão do gene *cycA* em relação à produção de L-isoleucina e aminoácidos subprodutos de L-isoleucina por fermentação de uma bactéria produtora de L-isoleucina da família *Enterobacteriaceae*.

Descrição da Invenção

[0013] É descrito neste documento um método aprimorado de produzir L-isoleucina por fermentação de uma bactéria da família *Enterobacteriaceae*. De acordo com o assunto presentemente descrito, pode ser aumentada a produção de L-isoleucina por fermentação de uma bactéria da família *Enterobacteriaceae*. Especificamente, a produção de L-isoleucina por fermentação de uma bactéria da família *Enterobacteriaceae* pode ser aprimorada pela superexpressão do gene *cycA* na bactéria, de modo que seja aumentada a produção de L-isoleucina pela bactéria modificada. O aumento da produção de L-isoleucina pode ser em quantidade absoluta, ou em quantidade relativa ao(s) aminoácido(s) subproduto(s). Ademais, quando L-isoleucina é produzida por fermentação de uma bactéria da família *Enterobacteriaceae*, a produção de aminoácidos subprodutos pode ser reduzida. Especificamente, o método para produzir L-isoleucina por fermentação de uma bactéria da família *Enterobacteriaceae* pode ser aprimorado pela superexpressão do gene *cycA* na bactéria, de modo que pode ser reduzida a produção de aminoácido(s) subproduto(s) como L-leucina, L-valina, L-norleucina, L-norvalina e ácido alfa-aminobutírico pela bactéria modificada. A redução da produção de aminoácidos subprodutos pode ser em quantidade absoluta de aminoácido(s) subproduto(s), ou em quantidade relativa à L-isoleucina. Portanto, em uma modalidade, pode ser produzida quantidade maior de L-isoleucina com respeito ao(s) aminoácido(s) subproduto(s), e como um resultado de simplificação do processo de purificação da L-isoleucina produzida pelo método descrito neste documento, a L-isoleucina produzida está com um alto grau de pureza e é produzida em preço baixo.

[0014] É um aspecto da presente invenção fornecer um método para produzir L-isoleucina compreendendo:

- (i) cultivar uma bactéria da família *Enterobacteriaceae* que

tem uma capacidade para produzir L-isoleucina em um meio de cultura para produzir a L-isoleucina no meio de cultura ou nas células bacterianas, ou em ambos; e

(ii) coletar a L-isoleucina do meio de cultura ou das células bacterianas, ou de ambos,

em que a bactéria está modificada para superexpressar o gene *cycA*.

[0015] É um outro aspecto da presente invenção fornecer o método conforme descrito acima, em que o gene *cycA* codifica uma proteína selecionada do grupo consistindo em:

(A) uma proteína compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

(B) uma proteína compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, mas que inclui uma ou mais mutações compreendendo substituição, deleção, inserção e/ou adição de um ou vários resíduos de aminoácido, e em que a dita proteína tem a atividade de uma proteína transportadora tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; e

(C) uma proteína tendo uma homologia de não menor que 70% com respeito à sequência de aminoácidos inteira de SEQ ID NO: 2 e tendo a atividade da transportadora tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

[0016] É um outro aspecto da presente invenção fornecer o método conforme descrito acima, em que o gene *cycA* é um DNA selecionado do grupo consistindo em:

(A) um DNA compreendendo a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 1;

(B) um DNA que codifica uma proteína compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, mas que inclui uma ou mais mutações compreendendo substituição, deleção, inserção e/ou adição de um

ou vários resíduos de aminoácido, e em que a dita proteína tem a atividade da transportadora tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; e

(C) um DNA que é uma sequência de nucleotídeos variante de SEQ ID NO: 1 devido à degeneração do código genético.

[0017] É um outro aspecto da presente invenção fornecer o método conforme descrito acima, em que o gene *cycA* é superexpressado pelo aumento do número de cópias do gene *cycA* e/ou pela modificação de uma região regulatória de expressão do gene *cycA*, de modo que a expressão do gene seja aumentada em comparação com uma bactéria não modificada.

[0018] É um outro aspecto da presente invenção fornecer o método conforme descrito acima, em que a bactéria pertence ao gênero *Escherichia*.

[0019] É um outro aspecto da presente invenção fornecer o método conforme descrito acima, em que a bactéria é *Escherichia coli*.

[0020] É um outro aspecto da presente invenção fornecer o método conforme descrito acima, em que a bactéria pertence ao gênero *Pantoea*.

[0021] É um outro aspecto da presente invenção fornecer o método conforme descrito acima, em que a bactéria é *Pantoea ananatis*.

[0022] É um outro aspecto da presente invenção fornecer o método conforme descrito acima, em que uma quantidade de um aminoácido subproduto da L-isoleucina é reduzida em comparação com uma bactéria não modificada.

[0023] É um outro aspecto da presente invenção fornecer o método conforme descrito acima, em que o aminoácido subproduto é selecionado do grupo consistindo em L-valina, L-leucina, L-norvalina, L-norleucina, ácido alfa-aminobutírico e uma sua combinação.

Descrição Detalhada da Invenção

[0024] A presente invenção é descrita em detalhe abaixo.

1. Bactéria

[0025] Pode ser usada qualquer bactéria produtora de L-isoleucina

pertencendo à família *Enterobacteriaceae* e modificada para superexpressar o gene *cycA*. A frase “uma bactéria produtora de L-isoleucina” pode significar uma bactéria da família *Enterobacteriaceae* que tem uma capacidade para produzir, excretar ou secretar, e/ou causar acumulação de L-isoleucina em um meio de cultura e/ou nas células bacterianas quando a bactéria é cultivada no meio.

[0026] A frase “uma bactéria produtora de L-isoleucina” também pode significar uma bactéria que tem uma capacidade para produzir, excretar ou secretar, e/ou causar acumulação de L-isoleucina em um meio de cultura em uma quantidade maior que a de uma cepa parental ou de tipo selvagem, como *E. coli* K-12, e pode também significar uma bactéria que é capaz de causar acumulação no meio de uma quantidade, por exemplo, não menor que 0,1 g/L, não menor que 0,5 g/L, ou não menor que 1,0 g/L da L-isoleucina.

[0027] Além disso, também pode ser usada a bactéria pertencendo à família *Enterobacteriaceae* e modificada para superexpressar o gene *cycA*, que tem uma capacidade para produzir L-isoleucina. A bactéria pode inerentemente ter a capacidade para produzir L-isoleucina ou pode ser modificada para ter uma capacidade para produzir L-isoleucina pelo uso de um método de mutação ou de técnicas de recombinação de DNA. A bactéria pode ser obtida pela superexpressão do gene *cycA* em uma bactéria que inerentemente tem a capacidade para produzir L-isoleucina, ou em uma bactéria que já lhe havia sido concedida a capacidade para produzir L-isoleucina. Alternativamente, a bactéria pode ser obtida pela concessão da capacidade para produzir L-isoleucina a uma bactéria já modificada para superexpressar o gene *cycA*. Também, a bactéria pode ter adquirido a capacidade para produzir L-isoleucina via à sua modificação para superexpressar o gene *cycA*.

[0028] A frase “uma capacidade para produzir L-isoleucina” pode significar a capacidade de uma bactéria da família *Enterobacteriaceae* para

produzir, excretar ou secretar, e/ou causar a acumulação de L-isoleucina em um meio de cultura e/ou nas células bacterianas em um tal nível que a L-isoleucina pode ser coletada do meio de cultura ou das células bacterianas quando a bactéria é cultivada no meio.

[0029] A bactéria pode produzir L-isoleucina quer sozinha quer como uma mistura de L-isoleucina e um ou mais tipos de aminoácidos que são diferentes da L-isoleucina, como, por exemplo, aminoácidos sob a forma-L (também chamados de L-aminoácidos). Além disso, a bactéria pode produzir L-isoleucina quer sozinha quer como uma mistura de L-isoleucina e um ou mais tipos de ácidos hidroxicarboxílicos.

[0030] Além disso, pode ser usada uma bactéria pertencendo à família *Enterobacteriaceae*, que tem uma capacidade para produzir L-isoleucina e está modificada para superexpressar o gene *cycA*, de tal modo que a produção de aminoácido(s) subproduto(s) é reduzida em comparação com uma cepa não modificada, por exemplo, uma cepa parental ou de tipo selvagem conforme descrita adiante neste documento. Especificamente, pode ser usada a bactéria, que está modificada para superexpressar o gene *cycA* e que é capaz de produzir um, dois ou mais tipos de aminoácidos subprodutos de L-isoleucina em um nível mais baixo que o de uma cepa não modificada, na qual a subprodução de um, dois ou mais tipos de aminoácidos subprodutos of L-isoleucina é reduzida em comparação com uma cepa não modificada.

[0031] A frase “capaz de produzir aminoácidos subprodutos de L-isoleucina” como usada neste documento com relação a uma bactéria pode significar a capacidade de uma bactéria da família *Enterobacteriaceae* para produzir, excretar ou secretar, e/ou causar a acumulação de um, dois ou mais tipos de aminoácidos subprodutos de L-isoleucina em um meio de cultura ou nas células bacterianas, ou em ambos, em um tal nível que os um, dois ou mais aminoácidos subprodutos de L-isoleucina podem ser coletados do meio de cultura e/ou das células bacterianas quando a bactéria é cultivada no meio.

A frase “um aminoácido subproduto de L-isoleucina” é explicada adiante neste documento.

[0032] A frase “aminoácido” pode significar um composto orgânico possuindo pelo menos um grupo amino (NH_2) e pelo menos um grupo carboxila (COOH). Um L-aminoácido é um exemplo não limitador de um aminoácido.

[0033] A frase “L-aminoácido” pode significar L-alanina, L-arginina, L-asparagina, ácido L-aspártico, L-citrulina, L-cisteína, ácido L-glutâmico, L-glutamina, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-ornitina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-triptofano, L-tirosina, e L-valina. Outros exemplos não limitadores de um L-aminoácido incluem norvalina (nVal) ou L-norvalina, norleucina (nLeu) ou L-norleucina, O-etil-homosserina (O-EH) ou O-etil-L-homosserina, e ácido alfa-aminobutírico (αABA) ou ácido L-alfa-aminobutírico.

[0034] A frase “aminoácido” ou “L-aminoácido” pode referir-se não apenas a um aminoácido sob a forma livre, mas também pode incluir um sal ou um hidrato do aminoácido, ou um aduto formado pelo aminoácido e outro composto orgânico ou inorgânico. A frase “aminoácido” pode significar, por exemplo, sais de sódio, de potássio, de amônio, de monoclорidrato, etc. de um aminoácido como, por exemplo, sal de monoclорidrato de L-lisina (L-lisina·HCl) ou sal de monoclорidrato de L-arginina (L-arginina·HCl). Um exemplo de um hidrato de um aminoácido inclui L-cisteína mono-hidrato ($\text{L-Cys} \times \text{H}_2\text{O}$).

[0035] A frase “ácido hidroxicarboxílico” pode significar um composto orgânico contendo pelo menos um grupo hidroxila (OH) e pelo menos um grupo carboxílico (COOH). Um ácido alfa-hidroxicarboxílico é um exemplo de um ácido hidroxicarboxílico. Exemplos específicos e não limitadores de ácidos alfa-hidroxicarboxílicos incluem ácido L-lático, ácido cítrico, e ácido L-alfa-hidroxibutírico (αHBA).

[0036] A frase “um aminoácido subproduto de L-isoleucina” pode referir-se a um, dois ou mais aminoácidos subprodutos de L-isoleucina e pode significar uma substância, como, por exemplo, um composto orgânico, que é diferente da L-isoleucina e que é produzido como um subproduto, coproduto ou produto secundário durante a produção de L-isoleucina por fermentação de uma bactéria pertencendo à família *Enterobacteriaceae* que tem uma capacidade para produzir L-isoleucina. A frase “um aminoácido subproduto de L-isoleucina” também pode referir-se a uma substância que pode ser produzida e excretada ou secretada por uma bactéria da família *Enterobacteriaceae*, que tem uma capacidade para produzir L-isolécita, durante a fermentação da bactéria para produzir L-isolécita, de tal modo que a substância se acumula em um meio de cultura ou nas células bacterianas, ou em ambos, em um tal nível que a substância pode ser coletada do meio de cultura e/ou das células bacterianas quando a bactéria é cultivada no meio. Uma quantidade de um aminoácido subproduto de L-isoleucina no meio de cultura e/ou nas células bacterianas pode ser menor, igual a ou maior que a quantidade de L-isoleucina produzida por fermentação de uma bactéria pertencendo à família *Enterobacteriaceae* que tem uma capacidade para produzir L-isoleucina. Entretanto, a quantidade de um aminoácido subproduto de L-isoleucina no meio de cultura e/ou nas células bacterianas é preferencialmente menor que a quantidade de L-isoleucina.

[0037] Exemplos específicos de um aminoácido subproduto de L-isoleucina incluem, mas não são limitados a, um intermediário em uma rota biossintética de L-isoleucina ou um produto de outra rota biossintética que se ramifica da rota biossintética de L-isoleucina, etc., ou sua combinação. O intermediário não é limitado a um intermediário na rota biossintética de L-isoleucina, e também pode ser um precursor, um intermediário ou um substrato em uma rota metabólica das outras uma, duas ou mais substâncias, por exemplo, um precursor, um intermediário ou um substrato em uma rota

biossintética de um L-aminoácido de cadeia ramificada quando a substância-alvo é L-isoleucina.

[0038] A frase “um L-aminoácido de cadeia ramificada” pode referir-se aos L-aminoácidos como L-valina, L-leucina, e L-isoleucina, e também pode se referir à L-norvalina e à L-norleucina. Como o ácido pirúvico (também pode ser chamado de “ácido alfa-cetopropiônico”) é um precursor na rota biossintética de L-isoleucina, um subproduto de L-isoleucina pode ser o produto de outra rota biossintética que se ramifica do ácido pirúvico na rota biossintética de L-isoleucina. Um aminoácido subproduto de L-isoleucina é um exemplo específico do produto de outra rota biossintética que se ramifica do ácido pirúvico na rota biossintética de L-isoleucina, e pode incluir L-valina e L-leucina que têm o precursor comum ácido 2-oxoisovalérico (também pode ser chamado de ácido “alfa-cetoisovalérico”), L-norvalina e L-norleucina que têm o precursor comum ácido 2-oxovalérico (também pode ser chamado de ácido “alfa-cetoisovalérico”), cujos ácido 2-oxoisovalérico e ácido 2-oxovalético têm o precursor comum ácido pirúvico.

[0039] Um exemplo não limitador de um intermediário em uma rota metabólica de uma substância, que é diferente de L-isoleucina, inclui ácido alfa-aminobutírico (α ABA), que é um intermediário na rota biossintética de ácido oftálmico.

[0040] Portanto, um aminoácido subproduto de L-isoleucina pode ser, mas não é limitado a, L-valina, L-leucina, L-norvalina, L-norleucina, ácido alfa-aminobutírico (α ABA) ou uma sua combinação, em um método para produzir L-isoleucina por fermentação de uma bactéria pertencendo à família *Enterobacteriaceae* e modificada para superexpressar o gene *cycA*, conforme descrito adiante neste documento.

[0041] A bactéria pertencendo à família *Enterobacteriaceae* pode ser dos gêneros *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Pantoea*, *Photorhabdus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Yersinia*, etc., e pode ter a

capacidade para produzir L-isoleucina. Especificamente, podem ser usadas aquelas classificadas na família *Enterobacteriaceae* de acordo com a taxonomia usada na base de dados do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”) (www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=543). Exemplos de bactérias da família *Enterobacteriaceae* que podem ser modificadas incluem uma bactéria do gênero *Escherichia*, *Enterobacter* ou *Pantoea*.

[0042] A bactéria *Escherichia* que podem ser modificadas para se obterem bactérias *Escherichia* de acordo com o assunto presentemente descrito não são particularmente limitadoras, e especificamente, podem ser utilizadas aquelas descritas no trabalho de Neidhardt *et al.* (Bachmann, B.J., “Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *E. coli* K-12”, p. 2460-2488. Em F.C. Neidhardt *et al.* (ed.), “*E. coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology”, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C., 1996). A espécie *E. coli* é um exemplo específico. Exemplos específicos de *E. coli* incluem *E. coli* W3110 (ATCC 27325), *E. coli* MG1655 (ATCC 47076), etc., que são derivadas da cepa protótipo de tipo selvagem, cepa *E. coli* K-12. Estas cepas estão disponíveis junto à, por exemplo, “American Type Culture Collection” (P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, Estados Unidos da América). Isto é, números de registro são concedidos a cada uma das cepas, e as cepas podem ser encomendadas pelo uso destes números de registro (consultar www.atcc.org). Os números de registro das cepas estão listados no catálogo da “American Type Culture Collection”.

[0043] Exemplos das bactérias *Enterobacter* incluem *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes*, etc. Exemplos das bactérias *Pantoea* incluem *Pantoea ananatis* (*P. ananatis*), etc. Algumas cepas de *Enterobacter agglomerans* foram recentemente reclassificadas em *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis* ou *Pantoea stewartii* com base na análise de sequência de nucleotídeos de 16S rRNA, etc. Uma bactéria pertencendo ao gênero quer

Enterobacter quer *Pantoea* pode ser usada desde que ela seja uma bactéria classificada na família *Enterobacteriaceae*. Quando uma cepa de *Pantoea ananatis* é gerada por técnicas de engenharia genética, podem ser usadas as cepa *Pantoea ananatis* AJ13355 (FERM BP-6614), cepa AJ13356 (FERM BP-6615), cepa AJ13601 (FERM BP-7207) e seus derivados. Estas cepas foram identificadas como *Enterobacter agglomerans* quando foram isoladas, e depositadas como *Enterobacter agglomerans*. Entretanto, foram recentemente reclassificadas como *Pantoea ananatis* com base no sequenciamento de nucleotídeos de 16S rRNA etc. conforme descrito acima.

Bactérias produtoras de L-isoleucina

[0044] Exemplos de bactérias produtoras de L-isoleucina ou de cepas parentais que podem ser usadas para derivar bactérias produtoras de L-isoleucina incluem, mas não são limitados a, mutantes tendo resistência à 6-dimetilaminopurina (JP 5-304969 A), mutantes tendo resistência a um análogo de isoleucina como tiaisoleucina e hidroxamato de isoleucina, e mutantes adicionalmente tendo resistência à DL-etionina e/ou ao hidroxamato de arginina (JP 5-130882 A). Além disso, as cepas recombinantes transformadas com genes que codificam proteínas envolvidas na biossíntese de L-isoleucina, como treonina-desaminase e aceto-hidroxato-sintase, também podem ser usadas como bactérias produtoras de L-isoleucina ou suas cepas parentais (JP 2-458 A, EP0356739 A1, e Patente U.S. nº 5.998.178). Exemplo de bactérias produtoras de L-isoleucina ou suas cepas parentais também inclui *E. coli* K-12 cepa 44-3-15 Scr (VKPM B-12149).

[0045] A bactéria da presente invenção pertencendo à família *Enterobacteriaceae* está modificada para superexpressar o gene *cycA*.

[0046] O gene *cycA* (sinônimos: *dagA*, ECK4204, JW4166, *ytfD*) de *E. coli* codifica a proteína transportadora CycA de D-alanina/D-serina/glicina (KEGG, “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”, nº de entrada b4208; “Protein Knowledgebase”, UniProtKB/Swiss-Prot, nº de acesso P0AAE0). O

gene *cycA* (GenBank, nº de acesso NC_000913.3; posições de nucleotídeos: 4429864 a 4431276; Gene ID: 948725) está localizado entre o gene *flbB* na mesma fita e no gene *ytfE* na fita oposta no cromossomo de cepa *E. coli* K-12. São conhecidas a sequência de nucleotídeos do gene *cycA* da cepa de *E. coli* K-12 (SEQ ID NO: 1) e a sequência de aminoácidos da proteína CycA da cepa de *E. coli* K-12 (SEQ ID NO: 2) codificada pelo gene *cycA*. Isto é, o gene *cycA* pode ter a sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 1, e a proteína CycA pode ter a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. A frase “um gene ou uma proteína pode ter uma sequência de nucleotídeos ou uma sequência de aminoácidos” inclui casos nos quais um gene ou uma proteína compreende a sequência de nucleotídeos ou a sequência de aminoácidos, e os casos nos quais um gene ou uma proteína consiste em a sequência de nucleotídeos ou a sequência de aminoácidos.

[0047] A proteína CycA codificada pelo gene *cycA* é um membro da superfamília de aminoácido-poliamina-organocátion (APC, *amino acid-polyamine-organocation*) de proteínas transportadoras de aminoácido (AAT, *aminoacid transporters*) (número de classificação de proteína transportadora (TC, *transporter classification*) 2.A.3.1). É sugerido que CycA funciona como uma proteína cotransportadora “*symporter*” de próton/serina (ou alanina, ou glicina). A proteína transportadora CycA está envolvida na absorção de glicina, serina e alanina (Robbins J.C. e Oxender D.L. “Transport systems for alanine, serine, and glycine in *Escherichia coli* K-12”, *J. Bacteriol.*, 1973, 116(1):12-18; Lee M. *et al.*, “Transport properties of merodiploids covering the *dagA* locus in *Escherichia coli* K-12”, *J. Bacteriol.*, 1975, 122(3):1001-1005). Também foi descoberta a atividade de transporte de CycA com relação à ciclosserina (Wargel R.J. *et al.*, “Mechanism of D-cycloserine action: transport systems for D-alanine, D-cycloserine, L-alanine, and glycine”, *J. Bacteriol.*, 1970, 103(3):778-788). Não foi descoberta atividade de transporte em relação às L-leucina e L-

prolina (Lee M. *et al.*, 1975). São conhecidos os homólogos de CycA de bactérias diferentes da família *Enterobacteriaceae*, cujos exemplos são descritos adiante neste documento.

[0048] A frase “uma bactéria modificada para superexpressar o gene *cycA*” pode significar que a bactéria está modificada em uma tal maneira que na bactéria modificada a atividade total do produto do gene *cycA* tal como a proteína CycA está aumentada em comparação com, ou o nível de expressão do gene *cycA* é mais alto que aquele nível em, uma cepa não modificada, por exemplo, uma cepa parental ou de tipo selvagem conforme descrita acima e adiante neste documento. Exemplos de uma cepa não modificada servindo como uma referência para a comparação acima incluem uma cepa de tipo selvagem de um microrganismo pertencendo ao gênero *Escherichia* tal como a cepa *E. coli* MG1655 (ATCC 47076), cepa W3110 (ATCC 27325), ou um microrganismo pertencendo ao gênero *Pantoea* tal como a cepa *P. ananatis* AJ13355 (FERM BP-6614), etc.

[0049] A frase “o gene *cycA* é (está) superexpressado” pode significar que a atividade total do produto do gene *cycA* como a proteína CycA é (está) aumentada enquanto comparado com uma cepa não modificada. A atividade total do produto do gene *cycA* de modo que a proteína CycA seja aumentada, por exemplo, pelo aumento do nível de expressão do gene *cycA* em comparação com uma cepa não modificada como aqui descrita ou pelo aumento da atividade por molécula (pode ser chamada de atividade específica) da proteína codificada pelo gene *cycA* em comparação com uma proteína do tipo selvagem. A bactéria pode ser (estar) modificada de tal modo que a atividade da proteína CycA por célula é (está) aumentada em 150% ou mais, 200% ou mais, 300% ou mais, da atividade de uma cepa não modificada.

[0050] A frase “atividade de uma proteína transportadora” pode significar a atividade de transporte de um aminoácido, como, por exemplo,

um aminoácido aquiral e/ou um L-aminoácido e/ou um D-aminoácido, como glicina, D-alanina, L-alanina, e D-serina, que pode ser transportado em uma bactéria pertencendo à família *Enterobacteriaceae*. A frase “atividade de uma proteína transportadora” pode também significar a atividade de transporte de um aminoácido, que pode ser transportado em uma bactéria pertencendo à família *Enterobacteriaceae*, utilizando a proteína tendo uma atividade de uma proteína transportadora tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

[0051] A frase “atividade de uma proteína transportadora tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2” pode significar a atividade de uma proteína tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de transporte de um aminoácido, que pode ser transportado utilizando a proteína tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 em uma bactéria pertencendo à família *Enterobacteriaceae*. Também é aceitável que a frase “atividade de uma proteína transportadora tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2” pode significar a atividade da proteína transportadora CycA tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de transporte de aminoácido, que pode ser transportado utilizando a proteína CycA em uma bactéria pertencendo à família *Enterobacteriaceae*. Especificamente, as frases “atividade de uma proteína transportadora” e “atividade de uma proteína transportadora tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2” podem significar a atividade da proteína CycA tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de transporte de um aminoácido na bactéria pertencendo à família *Enterobacteriaceae*, como, por exemplo, glicina, D-alanina, L-alanina ou D-serina, etc., ou sua combinação, desde que os ditos um ou mais aminoácidos possam ser transportados utilizando a proteína CycA na bactéria.

[0052] A atividade de uma proteína transportadora pode ser determinada pela avaliação da atividade transportadora de CycA. A atividade de um transportador pode ser determinado como uma atividade específica da proteína por peso de unidade como mg ou µg. Por exemplo, um aminoácido

radioativamente marcado como, por exemplo, [2-¹⁴C]glicina pode ser usado para medir a absorção do aminoácido (Lee M. *et al.*, 1975; Ghrist A.C. e Stauffer G.V. “The *Escherichia coli* glycine transport system and its role in the regulation of the glycine cleavage enzyme system”, *Microbiol.*, 1995, 141(Pt 1):133-140). A concentração de proteína pode ser determinada pelo ensaio de proteína de Bradford usando albumina de soro bovino como um padrão (Bradford M.M., *Anal. Biochem.*, 1976, 72:248-254).

[0053] A frase “o gene *cycA* é (está) superexpressado” pode também significar que o nível de expressão do gene *cycA* é maior que aquele nível em uma cepa não modificada. Portanto, a frase “o gene *cycA* é (está) superexpressado” pode ser equivalente à frase “expressão do gene *cycA* é (está) intensificada (aumentada)”. A bactéria pode ser modificada de modo que a quantidade de expressão do gene *cycA* por célula seja aumentada para 150% ou mais, 200% ou mais, 300% ou mais, da quantidade de expressão de uma cepa não modificada.

[0054] Os métodos que podem ser usados para intensificar a expressão do gene *cycA* incluem, mas não são limitados a, aumentar o número de cópias do gene *cycA*, como o número de cópias do gene *cycA* no cromossomo da bactéria e/ou no plasmídeo autonomamente replicante hospedado pela bactéria. O número de cópias do gene *cycA* pode ser aumentado, por exemplo, pela introdução do gene *cycA* no cromossomo da bactéria e/ou pela introdução de um vetor autonomamente replicante contendo o gene *cycA* para dentro da bactéria.

[0055] Exemplos dos vetores incluem, mas não são limitados a, plasmídeos de amplo espectro de hospedeiros como pMW118/119, pBR322, pUC19, e semelhantes. O gene *cycA* podem também ser introduzidas no DNA cromossômico de uma bactéria, por exemplo, por recombinação homóloga, integração conduzida por Mu, ou semelhantes. Somente uma cópia ou duas ou mais cópias do gene *cycA* pode ser introduzido. Por exemplo a recombinação

homóloga pode ser realizada usando sequência com cópias múltiplas no DNA cromossômico para introduzir cópias múltiplas do gene *cycA* no DNA cromossômico. Sequências com cópias múltiplas no DNA cromossômico incluem, mas não são limitados a, DNA repetitivo ou repetições invertidas presentes na extremidade de um elemento transposável. Além disso, é possível incorporar o gene *cycA* em um transposon e permiti-lo ser transferido para introduzir cópias múltiplas do gene *cycA* no DNA cromossômico. Pelo uso da integração conduzida por Mu, mais que 3 cópias do gene podem ser introduzidas no DNA cromossômico durante uma única ação (Akhverdyan V.Z. *et al.*, *Biotechnol.* (em russo), 2007, 3:3-20).

[0056] Os outros métodos que podem ser usados para intensificar a expressão do gene *cycA* incluem aumentar o nível de expressão do gene *cycA* por modificação de região regulatória de expressão (regiões regulatórias de expressão) do gene *cycA*. A região regulatória de expressão (as regiões regulatórias de expressão) do gene *cycA* pode(m) ser modificada(s), por exemplo, por substituição da região regulatória de expressão (das regiões regulatórias de expressão) do *cycA* gene por região regulatória de expressão estranha modificada e/ou nativa (por regiões regulatórias de expressão estranhas modificadas e/ou nativas). A região regulatória de expressão (as regiões regulatórias de expressão) pode(m) também ser chamada(s) de sequência regulatória de expressão (sequências regulatórias de expressão). As regiões regulatórias de expressão podem ser exemplificadas por promotores, intensificadores, atenuadores e sinais de terminação, sinais de antiterminação, sítios de ligação ao ribossomo (RBS, *ribosome-binding sites*) e outros elementos de controle de expressão (por exemplo, regiões às quais repressores ou indutores se ligam e/ou sítios de ligação para proteínas regulatórias transcricionais ou traducionais, por exemplo, no mRNA transcrito). Tais regiões regulatórias são descritas, por exemplo, em Sambrook J., Fritsch E.F. e Maniatis T., “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 2^a ed., Cold

Spring Harbor Laboratory Press (1989). As modificações de regiões que controlam a expressão de gene(s) podem ser combinadas com o aumento do número de cópias do(s) gene(s) (consulte, por exemplo, Akhverdyan V.Z. *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 91:857-871; Tyo K.E.J. *et al.*, *Nature Biotechnol.*, 2009, 27:760-765).

[0057] Os promotores exemplificadores adequados para intensificar a expressão do gene *cycA* podem ser os promotores potentes que são mais fortes que o promotor nativo *cycA*. Por exemplo, o promotor *lac*, o promotor *trp*, o promotor *trc*, o promotor *tac*, o promotor P_R ou o promotor P_L de fago-lambda são todos conhecidos como promotores potentes. Podem ser usados os promotores potentes que fornecem um nível alto de expressão de gene em uma bactéria pertencendo à família *Enterobacteriaceae*. Alternativamente, o efeito de um promotor pode ser intensificado, por exemplo, pela introdução de uma mutação na região de promotor do gene *cycA* para obter uma função de promotor mais forte, resultando, dessa forma, no nível de transcrição aumentado do gene *cycA* localizado a jusante do promotor. Além disso, é sabido que a substituição de vários nucleotídeos na sequência de Shine-Dalgarno (SD), e/ou no espaçador entre a sequência SD e o códon de iniciação, e/ou uma sequência imediatamente a montante e/ou a jusante do códon de iniciação no sítio de ligação ao ribossomo afeta enormemente a eficiência de tradução de mRNA. Por exemplo, foi descoberta uma faixa de 20 vezes nos níveis de expressão, dependendo da natureza dos três nucleotídeos precedendo o códon de iniciação (Gold L. *et al.*, *Annu. Rev. Microbiol.*, 1981, 35:365-403; Hui A. *et al.*, *EMBO J.*, 1984, 3:623-629).

[0058] O número de cópias, a presença ou ausência do gene podem ser medidos, por exemplo, por restrição do DNA cromossômico seguida por transferência de Southern (*Southern blotting*) usando uma sonda com base na sequência de gene, hibridização fluorescente *in situ* (FISH, *fluorescence in situ hybridization*), e semelhantes. O nível de expressão de gene pode ser

determinado por medição da quantidade de mRNA transcrito a partir do gene usando vários métodos bem conhecidos, incluindo transferência de Northern (*Northern blotting*), RT-PCR quantitativa, e semelhantes. A quantidade da proteína codificada pelo gene pode ser medida por métodos conhecidos incluindo SDS-PAGE seguida por ensaio de imunotransferência (*immunoblotting assay*) (análise por transferência de Western (*Western blotting analysis*)), ou análise por espectrometria de massa das amostras de proteína, e semelhantes.

[0059] Métodos para manipulação com moléculas recombinantes de DNA e clonagem molecular como preparação de DNA plasmídeo, digestão, ligação e transformação de DNA, seleção de um oligonucleotídeo como um iniciador, incorporação de mutações, e semelhantes podem ser métodos comuns bem conhecidos pela pessoa versada na técnica. Estes métodos são descritos, por exemplo, em Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T., “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) ou Green M.R. e Sambrook J.R., “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012); Bernard R. Glick, Jack J. Pasternak e Cheryl L. Patten, “Molecular Biotechnology: principles and applications of recombinant DNA”, 4th ed., Washington, DC, ASM Press (2009).

[0060] Pode haver algumas diferenças em sequências de DNA entre os gêneros, as espécies ou as cepas da família *Enterobacteriaceae*. Portanto, o gene *cycA* não é limitado ao gene mostrado em SEQ ID NO: 1, mas pode incluir genes que são sequências de nucleotídeos variantes de ou homólogas à SEQ ID NO: 1, e que codificam a proteína CycA.

[0061] A frase “uma proteína variante” pode significar uma proteína que tem uma ou mais mutações na sequência em comparação com a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, sejam elas substituições, deleções, inserções, e/ou adições de um ou vários resíduos de aminoácido, mas que

ainda mantém uma atividade ou função similar àquela da proteína CycA, tal como a atividade de uma proteína transportadora conforme descrita acima, ou a estrutura tridimensional da proteína CycA não é significativamente alterada em relação à proteína de tipo selvagem ou não modificada. O número de alterações na proteína variante depende da posição na estrutura tridimensional da proteína ou do tipo de resíduos de aminoácido. Pode ser, mas não é estritamente limitado a, 1 a 50, em outro exemplo 1 a 30, em outro exemplo 1 a 15, em outro exemplo 1 a 10, e em outro exemplo 1 a 5, em SEQ ID NO: 2. Isto é porque alguns aminoácidos têm alta homologia uns em relação aos outros de modo que a atividade ou função de uma proteína não é afetada por uma alteração entre tais aminoácidos, ou a estrutura tridimensional de uma proteína não é significativamente alterada em relação à proteína de tipo selvagem por uma mudança entre tais aminoácidos. Portanto, as proteínas variantes codificadas pelo gene *cycA* podem ter uma homologia, definida como o parâmetro “identidade” quando se usa o programa de computador BLAST, de não menor que 70%, não menor que 75%, não menor que 80%, não menor que 85%, não menor que 90%, não menor que 95%, não menor que 98%, ou não menor que 99% com respeito à sequência de aminoácidos inteira mostrada em SEQ ID NO: 2, desde que a atividade ou função da proteína CycA seja mantida, ou a estrutura tridimensional de proteína CycA não seja significativamente alterada em relação à proteína CycA de tipo selvagem.

[0062] As substituição, deleção, inserção, e/ou adição exemplificadoras de um ou vários resíduos de aminoácido podem ser uma mutação conservativa (mutações conservativas). A mutação conservativa representativa é uma substituição conservativa. A substituição conservativa pode ser, mas não é limitada a, uma substituição, em que a substituição ocorre mutuamente dentre Phe, Trp e Tyr, se o sítio de substituição for um aminoácido aromático; dentre Ala, Leu, Ile e Val, se o sítio de substituição for

um aminoácido hidrofóbico; entre Glu, Asp, Gln, Asn, Ser, His e Thr, se o sítio de substituição for um aminoácido hidrofílico; entre Gln e Asn, se o sítio de substituição for um aminoácido polar; dentre Lys, Arg e His, se o sítio de substituição for um aminoácido básico; entre Asp e Glu, se o sítio de substituição for um aminoácido ácido; e entre Ser e Thr, se o sítio de substituição for um aminoácido tendo grupo hidroxila. Exemplos de substituição conservativa incluem substituição de Ala por Ser ou Thr, substituição de Arg por Gln, His ou Lys, substituição de Asn por Glu, Gln, Lys, His ou Asp, substituição de Asp por Asn, Glu ou Gln, substituição de Cys por Ser ou Ala, substituição de Gln por Asn, Glu, Lys, His, Asp ou Arg, substituição de Glu por Asn, Gln, Lys ou Asp, substituição de Gly por Pro, substituição de His por Asn, Lys, Gln, Arg ou Tyr, substituição de Ile por Leu, Met, Val ou Phe, substituição de Leu por Ile, Met, Val ou Phe, substituição de Lys por Asn, Glu, Gln, His ou Arg, substituição de Met por Ile, Leu, Val ou Phe, substituição de Phe por Trp, Tyr, Met, Ile ou Leu, substituição de Ser por Thr ou Ala, substituição de Thr por Ser ou Ala, substituição de Trp por Phe ou Tyr, substituição de Tyr por His, Phe ou Trp, e substituição de Val por Met, Ile ou Leu.

[0063] As substituição, deleção, inserção, e/ou adição exemplificadoras de um ou vários resíduos de aminoácido podem também ser uma mutação não conservativa (mutações não conservativas) desde que a mutação (as mutações) seja(m) compensada(s) por uma ou mais mutação secundária (mutações secundárias) na posição diferente (nas posições diferentes) de sequência de aminoácidos de modo que a atividade ou função similar àquela da proteína CycA, tal como a atividade de uma proteína transportadora conforme descrita acima, é mantida, ou a estrutura tridimensional de proteína CycA não seja significativamente alterada em relação à proteína de tipo selvagem.

[0064] Para avaliar o grau de homologia de proteína ou DNA, podem

ser usados vários métodos de cálculo, como pesquisa em BLAST, pesquisa em FASTA e método ClustalW. A pesquisa em BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) é o algoritmo de pesquisa heurístico utilizado pelos programas blastp, blastn, blastx, megablast, tblastn, e tblastx; estes programas atribuem significância às suas descobertas usando os métodos estatísticos de Karlin S. e Altschul S.F. (“Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87:2264-2268; “Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90:5873-5877). O programa de computador BLAST calcula três parâmetros: escore, identidade e similaridade. O método de pesquisa em FASTA é descrito por Pearson W.R. (“Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA”, *Methods Enzymol.*, 1990, 183:63-98). O método ClustalW é descrito por Thompson J.D. *et al.* (“CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice”, *Nucleic Acids Res.*, 1994, 22:4673-4680).

[0065] Proteínas homólogas de CycA (CycA homólogas) podem ser também usadas como proteínas CycA. Exemplos de CycA homólogos incluem CycA de vários organismos tais como bactéria da família *Enterobacteriaceae*. Como exemplo, são conhecidos as CycA homólogas de bactérias diferentes da família *Enterobacteriaceae*, que têm a atividade de uma proteína transportadora conforme descrita acima. Exemplos de tais CycA homólogos da família *Enterobacteriaceae* são descritos adiante neste documento (Tabela 1) com indicação de um valor de homologia (como “identidade”, que é a identidade de aminoácidos), dados de taxonomia, e números de acesso e de registro de sequência de sequências de aminoácidos na base de dados do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>). Além disso, também podem ser usadas proteínas variantes de tais homólogos de CycA como a proteína CycA. As descrições acima mencionadas referem-se a proteínas variantes da proteína CycA da SEQ ID NO: 2, por exemplo, aquelas que se referem a mutações e identidade de sequência, que podem ser aplicadas *mutatis mutandis* a proteínas variantes de CycA homólogos.

[0066] A frase “a CycA” ou “a proteína CycA” não é limitada às proteínas CycA nativas como a proteína CycA de SEQ ID NO: 2 e aos homólogos de CycA de Tabela 1, mas pode corretamente se referir às proteínas CycA nativas e às suas proteínas variantes.

Tabela 1

Identidade	Organismo	Nº de acesso*; Nº de registro de sequência (GI)*
100%	<i>Escherichia coli</i> (cepa K-12)	YP_492350.1; 388480155
93%	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_015959296.1; 506439579
100%	<i>Shigella sonnei</i> (cepa Ss046)	Q3YUD9; 123615489
95%	<i>Salmonella enterica</i>	WP_000228328.1; 446150473
94%	<i>Enterobacter aerogenes</i>	WP_015368603.1; 505181501
95%	<i>Citrobacter freundii</i> MGH 56	KDF09506.1; 635727731
74%	<i>Pantoea ananatis</i>	WP_013025298.1; 502790322
100%	<i>Klebsiella pneumoniae</i> IS22	CDK72727.1; 571213503
76%	<i>Pantoea</i> sp. At-9b	WP_013508580.1; 503273919
96%	<i>Enterobacter cloacae</i>	WP_014168338.1; 503934344
74%	<i>Erwinia amylovora</i> ATCC BAA-2158	CBX80271.1; 312172014
100%	<i>Escherichia coli</i> O145:H28 (cepa RM13516)	AHG17723.1; 573937918
77%	<i>Dickeya dadantii</i>	WP_013318563.1; 503083691
99%	<i>Shigella flexneri</i>	WP_000228331.1; 446150476
69%	<i>Morganella morganii</i>	WP_024473835.1; 639125696
86%	<i>Serratia marcescens</i>	WP_019456240.1; 518286032

* - na base de dados do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”, www.ncbi.nlm.nih.gov/)

[0067] O gene *cycA* pode ser qualquer gene que codifica a proteína CycA. Por exemplo, o gene *cycA* pode ser uma sequência de nucleotídeos variante. A frase “uma sequência de nucleotídeos variante” pode significar uma sequência de nucleotídeos que codifica uma proteína variante conforme descrita acima, ou uma sequência de nucleotídeo que codifica qualquer proteína CycA do tipo selvagem usando quaisquer códons de aminoácido sinônimos de acordo com a tabela do código genético padrão (consulte, por exemplo, Lewin B., “Genes VIII”, 2004, Pearson Education, Inc., Upper Saddle River, NJ 07458). Portanto, o gene *cycA* pode ser uma sequência de nucleotídeos variante devido à degeneração do código genético, tais como uma sequência de nucleotídeo variante de SEQ ID NO: 1 devido à degeneração de um código de genética.

[0068] A frase “uma sequência de nucleotídeos variante” pode também significar, mas não é limitada a, uma sequência de nucleotídeos que hibridiza sob condições estridentes com a sequência de nucleotídeos complementar à sequência de nucleotídeos mostrada em SEQ ID NO: 1, ou uma sonda que pode ser preparada a partir da sequência de nucleotídeos sob condições estridentes desde que ela codifique proteína ativa ou funcional. As “condições estridentes” incluem aquela sob as quais é formado um híbrido específico, por exemplo, um híbrido tendo homologia, definida como o parâmetro “identidade” quando se usa o programa de computador BLAST, de não menor que 70%, não menor que 75%, não menor que 80%, não menor que 85%, não menor que 90%, não menor que 95%, não menor que 96%, não menor que 97%, não menor que 98%, ou não menor que 99%, e não é formado um híbrido não específico, por exemplo, um híbrido tendo homologia menor que aquela acima. Por exemplo, as condições estridentes podem ser exemplificadas por lavagem uma ou mais vezes, ou em outro exemplo, duas ou três vezes, em uma concentração de sal de SSC×1 (citrato de sódio padrão e cloreto de sódio padrão), SDS (*sodium dodecyl sulphate*,

dodecilsulfato de sódio) 0,1%, ou em outro exemplo, SSC×0,1, SDS 0,1% a 60°C ou 65°C. A duração das lavagens depende do tipo de membrana usada para a transferência (*blotting*) e, por via de regra, deve ser aquela que é recomendada pelo fabricante. Por exemplo, a duração recomendada de lavagem da membrana de náilon positivamente carregada Amersham Hybond™-N+ (GE Healthcare) sob condições estridentes é 15 minutos. A etapa de lavagem pode ser realizada 2 a 3 vezes. Como a sonda, pode também ser usada uma parte da sequência complementar às sequências mostradas em SEQ ID NO: 1. Uma tal sonda pode ser produzida por PCR usando oligonucleotídeos como iniciadores preparados com base na sequência mostrada em SEQ ID NO: 1 e um fragmento de DNA contendo a sequência de nucleotídeos como um molde. O comprimento da sonda recomendado é >50 pb; ele pode ser adequadamente selecionado dependendo das condições de hibridização, e é habitualmente de 100 pb a 1 kpb. Por exemplo, quando um fragmento de DNA tendo um comprimento de cerca de 300 pb é usado como o molde, as condições de lavagem após a hibridização podem ser exemplificadas por SSC×2, SDS 0,1% a 50°C, 60°C ou 65°C.

[0069] Visto que o gene que codifica a proteína CycA da espécie *E. coli* já foi elucidado (consulte acima), o gene *cycA*, tais como genes que codificam a proteínas CycA do tipo selvagem ou proteínas variantes das mesmas, podem ser obtidos por PCR (*polymerase chain reaction*, reação em cadeia da polimerase; consulte White T.J. *et al.*, “The polymerase chain reaction”, *Trends Genet.*, 1989, 5:185-189) de um microrganismo que hospeda o gene *cycA* do tipo selvagem, por exemplo, uma bactéria pertencendo à família *Enterobacteriaceae* utilizando iniciadores preparados com base na sequência de nucleotídeos do gene *cycA*; ou pelo método de mutagênese sítio-direcionada pelo tratamento de um DNA contendo o gene *cycA* de tipo selvagem *in vitro*, por exemplo, com hidroxilamina, ou por um método para tratamento de um microrganismo que hospeda o gene *cycA* do

tipo selvagem, por exemplo, uma bactéria pertencendo à família *Enterobacteriaceae* com irradiação ultravioleta (UV) ou um agente mutante como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) e ácido nitroso habitualmente usados para o tal tratamento; ou quimicamente sintetizados como estrutura de gene de comprimento completo. Assim, os genes que codificam as proteínas CycA do tipo selvagem tais como a proteína CycA da *E. coli* e proteínas CyaC homólogos de outros microrganismos da família *Enterobacteriaceae* ou genes que codificam as proteínas variantes da mesma podem ser obtidos.

[0070] A frase “o gene *cycA*” não é limitada aos genes *cycA* tipo selvagem como o gene *cycA* de SEQ ID NO: 1 e os genes que codificam homólogos de CycA da Tabela 1, mas podem corretamente se referir aos genes *cycA* nativos e aos genes que codificam proteínas variantes CycA.

[0071] A frase “uma proteína de tipo selvagem” pode significar uma proteína nativa produzida de modo natural por uma cepa bacteriana parental ou de tipo selvagem da família *Enterobacteriaceae*, por exemplo, pela cepa de tipo selvagem *E. coli* MG1655. Uma proteína de tipo selvagem pode ser codificada pelo “gene de tipo selvagem” que pode estar presente no genoma de uma bactéria de tipo selvagem.

[0072] As descrições acima podem compreender variantes dos genes e as proteínas podem ser aplicadas *mutatis mutandis* a proteínas arbitrárias de modo que as enzimas de biossíntese de L-isoleucina e os genes se codifiquem para os mesmos.

[0073] A bactéria pode ter, além das propriedades já mencionadas, outras propriedades específicas como vários requisitos de nutrientes, resistência a fármacos, sensibilidade a fármacos, e dependência de fármacos, sem se desviar do escopo da presente invenção.

2. Método

[0074] Um método da presente invenção inclui o método para

produzir L-isoleucina. O método para produzir L-isoleucina pode incluir as etapas de cultivar a bactéria em um meio de cultura para permitir que L-isoleucina seja produzida, excretada ou secretada, e/ou acumulada no meio de cultura ou nas células bacterianas, ou em ambos, e coletar a L-isoleucina do meio de cultura e/ou das células bacterianas. L-isoleucina pode ser produzida sob uma forma livre ou como um seu sal, ou como uma sua mistura. Isto é, a frase “L-isoleucina” pode referir-se à L-isoleucina sob uma forma livre, uma seu sal, ou uma sua mistura. Por exemplo, sais de sódio, de potássio, de amônio, e semelhantes ou um sal interno como zwitterion de L-isoleucina podem ser produzidos pelo método. Isto é possível porque os aminoácidos podem reagir uns com os outros sob condições de fermentação ou um agente neutralizante como uma substância alcalina ou acídica orgânica ou inorgânica em uma típica reação de neutralização de ácido-base para formar um sal que é a característica química de aminoácidos o que é evidente para uma pessoa versada na técnica.

[0075] Além disso, o método da presente invenção para produzir L-isoleucina adicionalmente inclui um método para reduzir a produção de aminoácido(s) subproduto(s) de L-isoleucina. O método para reduzir a produção de aminoácido(s) subproduto(s) de L-isoleucina pode incluir as etapas de cultivar a bactéria em um meio de cultura para permitir que L-isoleucina seja produzida, excretada ou secretada, e/ou acumulada no meio de cultura ou nas células bacterianas, ou em ambos, coletar e, se necessário, purificar a L-isoleucina do meio de cultura e/ou das células bacterianas.

[0076] O cultivo da bactéria, e a coleta e a purificação de L-isoleucina do meio e semelhantes podem ser realizados em uma maneira similar aos métodos de fermentação convencionais em que L-isoleucina é produzida usando um microrganismo. O meio de cultura para a produção da L-isoleucina pode ser um meio quer sintético quer natural como um meio típico que contém uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio, uma fonte de

enxofre, uma fonte de fósforo, íons inorgânicos, e outros componentes orgânicos e inorgânicos se necessários. Como a fonte de carbono, podem ser usados sacarídeos como glicose, sacarose, lactose, galactose, frutose, arabinose, maltose, xilose, trealose, ribose, e hidrolisados de amidos; álcoois como etanol, glicerol, manitol e sorbitol; ácidos orgânicos como ácido glicônico, ácido fumárico, ácido cítrico, ácido málico, e ácido succínico; ácidos graxos, e semelhantes. Como a fonte de nitrogênio, podem ser usados, sais inorgânicos de amônio como sulfato de amônio, cloreto de amônio, e fosfato de amônio; nitrogênio orgânico como hidrolisado de feijão-soja; gás amônia; amônia aquosa; e semelhantes. Além disso, podem ser utilizados peptona, extrato de levedo, extrato de carne, extrato de malte, líquido de macerado de milho. O meio pode conter um ou mais tipos destas fontes de nitrogênio. A fonte de enxofre pode incluir sulfato de amônio, sulfato de magnésio, sulfato ferroso, sulfato de manganês, e semelhantes. O meio pode conter uma fonte de fósforo além da fonte de carbono, da fonte de nitrogênio e da fonte de enxofre. Como a fonte de fósforo, podem ser utilizados di-hidrogenofosfato de potássio, hidrogenofosfato de dipotássio, polímeros de fosfato como ácido pirofosfórico etc. Vitaminas como vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, ácido nicotínico, nicotinamida, vitamina B12, substâncias exigidas, por exemplo, nutrientes orgânicos como ácidos nucleicos como adenina e RNA, aminoácidos, peptona, casaminoácido, extrato de levedo, e semelhantes podem estar presentes em quantidades apropriadas, mesmo se quantidades-traço. Além destas, quantidades pequenas de fosfato de cálcio, íons de ferro, íons de manganês, etc. podem ser adicionadas, se necessárias.

[0077] O cultivo pode ser realizado sob condições aeróbicas durante 16 h a 72 h, ou durante 32 h a 68 h; a temperatura de cultura durante o cultivo pode ser controlada dentro de 30°C a 45°C, ou dentro de 30°C a 37°C; e o pH pode ser ajustado entre 5 e 8, ou entre 6 e 7,5. O pH pode ser ajustado usando uma substância alcalina ou acídica inorgânica ou orgânica, e também gás

amônia.

[0078] Após o cultivo, a L-isoleucina pode ser coletada do meio de cultura. Também, após o cultivo, as células podem ser rompidas com, por exemplo, ondas supersônicas ou semelhantes, o sobrenadante pode ser obtido pela remoção de sólidos como as células e a suspensão de células rompidas (também chamada de restos de células) por, por exemplo, centrifugação ou filtração por membrana, e então a L-isoleucina pode ser coletada do sobrenadante. A coleta de L-isoleucina do meio de cultura ou do sobrenadante *etc.* pode ser realizada por qualquer combinação de técnicas convencionais como concentração, cromatografia de troca de íons, e cristalização.

[0079] A L-isoleucina coletada pode conter, por exemplo, células microbiais, componentes médios, mistura, metabólitos de coprodutos de microrganismos, e assim por diante, em adição à L-isoleucina. A pureza da L-isoleucina coletada pode ser 50% ou mais, preferivelmente 85% ou mais, particularmente 95% ou mais (Patente U.S. No. 5.431.933, Patente Japonesa No. 1214636, Patente U.S. Nos. 4.956.471, 4.777.051, 4.946.654, 5.840.358, 6.238.714, Pedido de Patente U.S. publicado No. 2005/0025878).

Exemplos

[0080] A presente invenção será mais especificamente explicada abaixo com referência aos seguintes exemplos não limitadores.

Exemplo 1. Construção da cepa de *E. coli* produtora de L-isoleucina modificada para superexpressar o gene *cycA*

1.1. Construção da cepa *E. coli* MG1655 tendo modificada uma região regulatória de *cycA*

[0081] O gene *cycA* em *E. coli* foi superexpressado usando o método desenvolvido por Datsenko K.A. e Wanner B.L. chamado “integração mediada por λ Red/ET” (“ λ Red/ET-mediated integration”) (Datsenko K.A. e Wanner B.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97(12):6640-6645). De

acordo com este procedimento, foram construídos os iniciadores de PCR P1 (SEQ ID NO: 3) e P2 (SEQ ID NO: 4), que são homólogos a ambas as regiões adjacentes ao gene *cycA* e regiões adjacentes ao gene *cat* que conferem resistência ao cloranfenicol (Cm^R) e o promotor no cromossomo molde. O cromossomo da cepa *E. coli* BW25113 *cat*-P_L-*yddG* resistente ao cloranfenicol, que contém a região de promotor precoce P_L de fago-lambda (Giladi H. *et al.*, “Identification of an UP element within the IHF binding site at the PL1-PL2 tandem promoter of bacteriophage lambda”, *J. Mol. Biol.*, 1996, 260(4):484-491), foi usado como o molde em reação PCR. A cepa *E. coli* BW25113 *cat*-P_L-*yddG* pode ser construída conforme descrito em detalhe em EP1449918 A1. A cepa *E. coli* BW25113 pode ser obtida junto ao “Coli Genetic Stock Center” (Yale University, New Haven, EUA) como CGSC7636.

[0082] As condições da PCR foram as seguintes: desnaturação durante 3 min a 95°C; perfil para 35 ciclos: 1 min a 95°C, 1 min a 58°C, 1 min a 72°C; alongamento final durante 5 min a 72°C. O fragmento de DNA 1 obtido (1.964 pb) (SEQ ID NO: 5) foi purificado em um gel de agarose e usado para eletroporação da cepa *E. coli* MG1655 (ATCC 47076) contendo o plasmídeo pKD46 com uma origem de replicação sensível à temperatura. *E. coli* MG1655 está disponível junto à “American Type Culture Collection” (P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, Estados Unidos da América). O plasmídeo pKD46 (Datsenko K.A. e Wanner B.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97(12):6640-6645) inclui um fragmento de DNA de 2.154 nt (nucleotídeos) (31088-33241) de fago-λ (GenBank, nº de acesso J02459) e contém os genes do sistema de recombinação homóloga λRed (genes γ, β, e exo) sob o controle do promotor P_{araB} induzível por arabinose. O plasmídeo pKD46 é necessário para integrar o fragmento de DNA no cromossomo da cepa *E. coli* MG1655.

[0083] Células eletrocompetentes foram preparadas como segue:

células de *E. coli* MG1655 foram crescidas de um dia para outro 30°C em meio-LB (Sambrook, J. e Russell, D.W. “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)) contendo ampicilina (100 mg/L), e a cultura foi diluída 100 vezes com 5 mL de meio-SOB (Sambrook J., Fritsch E.F. e Maniatis T., “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) contendo ampicilina (100 mg/L) e L-arabinose (1 mM). A cultura diluída foi crescida com aeração (250 rpm) a 30°C para uma OD₆₀₀ de cerca de 0,6 e então tornada eletrocompetente por concentração de 100 vezes e lavagem três vezes com H₂O desionizada fria. A eletroporação foi realizada usando 70 µL de células e 100 ng do fragmento de DNA 1. Então, as células foram incubadas com 1 mL de meio-SOC (Sambrook J., Fritsch E.F. e Maniatis T., “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) a 37°C durante 2,5 h, postas sobre as placas contendo meio-LB (Sambrook, J. e Russell, D.W. “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)), ágar (1,5%) e cloranfenicol (20 mg/L), e crescidas a 37°C para selecionar células Cm^R-recombinantes. Para eliminar o plasmídeo pKD46, foi realizada 1 passagem sobre L-ágar com cloranfenicol (20 mg/L) a 42°C, e as colônias obtidas foram testadas para sensibilidade à ampicilina. Desta forma foi obtida a cepa *E. coli* MG1655 *cat*-P_L-*cycA*.

1.2. Verificação de uma modificação da região regulatória do gene *cycA*

[0084] As células contendo uma região de promotor heteróloga do gene *cycA* marcada com gene-Cm^R (*cat*) foram verificadas por PCR usando iniciadores locus-específicos P3 (SEQ ID NO: 6) e P4 (SEQ ID NO: 7). As condições da PCR foram as seguintes: desnaturação durante 3 min a 95°C; perfil para 20 ciclos: 30 s a 95°C, 30 s a 60°C, 2 min a 72°C; alongamento final durante 5 min a 72°C. O fragmento de DNA 2, obtido na reação com o

DNA cromossômico da cepa parental *E. coli* MG1655 como o molde, foi de comprimento de 457 pb (SEQ ID NO: 8). O fragmento de DNA 3, obtido na reação com o DNA cromossômico da cepa *E. coli* MG1655 *cat*-P_L-*cycA* como um molde, foi de comprimento de 2.174 pb (SEQ ID NO: 9).

1.3. Construção da cepa de *E. coli* produtora de L-isoleucina

[0085] O gene *cycA* sob o controle do promotor P_L foi introduzido dentro da *E. coli* K-12 cepa 44-3-15 Scr produtora de L-isoleucina (Patentes U.S. n°s 6.960.455 B2 e 7.179.623 B2; Patente Russa n° 2212447 C2). A *E. coli* K-12 cepa 44-3-15 Scr (também chamada de *E. coli* 44-3-15 Scr) foi depositada na “Russian National Collection of Industrial Microorganisms”(VKPM, Federação Russa, 117545 Moscou, 1° Dorozhny Proezd, 1) em 17 de dezembro de 2014 de acordo com as cláusulas do Tratado de Budapeste sob o número de acesso de VKPM B-12149. A *E. coli* 44-3-15 Scr tem uma mutação no gene *ilvG* (*ilvG5*) que resulta em restauração de atividade de aceto-hidroxi-ácido-sintase II, uma mutação no gene *ilvA* (*ilvA7434*) que resulta na insensibilidade da treonina-desaminase à inibição de retroalimentação pela isoleucina (Gavrilova *et al.*, *Biotechnologiya* (em russo), 1988, 4:600-608), e é resistente ao cloranfenicol (Cm^R). Antes da introdução na *E. coli* 44-3-15 Scr. o marcador-Cm^R a montante do promotor P_L no cassete de expressão *cat*-P_L-*cycA* foi substituído pelo marcador de resistência à canamicina (Km^R) usando a integração mediada por λRed (Datsenko K.A. e Wanner B.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97(12):6640-6645). De acordo com este procedimento, foram construídos os iniciadores de PCR P5 (SEQ ID NO: 10) e P6 (SEQ ID NO: 11), que são homólogos a ambas as regiões adjacentes ao gene *cat* e ao gene *kan* que conferem resistência à canamicina (Km^R) no plasmídeo molde. O plasmídeo pMW118-(λattL-Km^R-λattR) foi usado como o molde na reação PCR (EP2100957 A1).

[0086] As condições da PCR foram as seguintes: desnaturação

durante 3 min a 95°C; perfil para 35 ciclos: 30 s a 94°C, 30 s a 57°C, 1 min 30 s a 72°C; alongamento final durante 5 min a 72°C. O fragmento de DNA 4 obtido (1.541 pb) (SEQ ID NO: 12) foi purificado em um gel de agarose e usado para eletroporação da cepa *E. coli* MG1655 *cat-P_L-cycA* (Exemplo 1.1) contendo o plasmídeo pKD46 (Datsenko K.A. e Wanner B.L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97(12):6640-6645). As células de cepa *E. coli* MG1655, que hospeda o cassete *kan-P_L-cycA*, foram selecionadas sobre as placas contendo o meio-LB, ágar (1,5%) e canamicina (40 mg/L). Dessa forma, foi obtida a cepa *E. coli* MG1655 *kan-P_L-cycA* resistente à canamicina e sensível ao cloranfenicol.

[0087] A substituição do marcador-Cm^R a montante do constructo *P_L-cycA* foi verificada por PCR. Para esta finalidade, foram usados os iniciadores P3 (SEQ ID NO: 6) e P4 (SEQ ID NO: 7). As condições da PCR foram as seguintes: desnaturação durante 3 min a 95°C; perfil para 20 ciclos: 30 s a 95°C, 30 s a 60 °C, 2 min a 72°C; alongamento final durante 5 min a 72°C.

[0088] O fragmento de DNA 3, obtido na reação com o DNA cromossômico da cepa parental *E. coli* MG1655 *cat-P_L-cycA* como o molde, foi de comprimento de 2.174 pb (SEQ ID NO: 9). O fragmento de DNA 5, obtido na reação com o DNA cromossômico da cepa *E. coli* MG1655 *kan-P_L-cycA* como um molde, foi de comprimento de 2.087 pb (SEQ ID NO: 13).

[0089] Então, o cassete de expressão *kan-P_L-cycA* foi introduzido dentro da cepa *E. coli* 44-3-15 Scr produtora de L-isoleucina por transdução-P1 (Miller J.H. “Experiments in molecular genetics”, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1972)). As células da cepa *E. coli* 44-3-15 Scr que hospeda o cassete *kan-P_L-cycA* foram selecionadas sobre as placas contendo meio-LB, ágar (1,5%) e canamicina (40 mg/L). Dessa forma, foi obtida a cepa *E. coli* 44-3-15 Scr *kan-P_L-cycA* produtora de L-isoleucina. A substituição de uma região de promotor do gene *cycA* foi verificada por PCR conforme descrito acima.

Exemplo 2. Subprodução de L-valina usando a cepa *E. coli* 44-3-15 Scr *kan-P_L-cycA*

[0090] A cepa *E. coli* 44-3-15 Scr *kan-P_L-cycA* modificada e a cepa de controle *E. coli* 44-3-15 Scr foram, cada uma, cultivadas a 32°C durante 18 horas em meio-LB (também chamado de caldo lisogênico ou meio de Luria-Bertani conforme descrito em Sambrook, J. e Russell, D.W. “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)). Então, 0,2 mL da cultura obtida foi inoculado para dentro de 2 mL de um meio de fermentação em tubos de ensaio de 20 mm × 200 mm e cultivados a 32°C durante 66 horas em um agitador rotativo a 250 rpm para uma OD₅₅₀ de cerca de 29 até que a glicose fosse consumida.

[0091] A composição do meio de fermentação (g/L) foi a seguinte:

Glicose	60,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	15,0
KH ₂ PO ₄	1,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,0
Tiamina-HCl	0,1
L-Treonina	4,0
CaCO ₃	25,0
Meio-LB	10% (v/v)

[0092] O meio de fermentação foi esterilizado a 116°C durante 30 min, exceto que glicose e CaCO₃ foram esterilizados separadamente como segue: glicose a 110°C durante 30 min e CaCO₃ a 116°C durante 30 min. O pH foi ajustado para 7,0 com solução de KOH.

[0093] Após o cultivo, as L-isoleucina e L-valina acumuladas foram medidas usando placas de cromatografia em camada fina (TLC, *thin-layer chromatography*). As placas de TLC (10 cm × 20 cm) foram revestidas com camadas de 0,11 mm de gel de sílica Sorbfil contendo indicador não fluorescente (Sorbpolymer, Krasnodar, Federação Russa). As amostras foram aplicadas sobre as placas com o aplicador de amostras Camag Linomat 5. As placas de Sorbfil foram eluídas com um fase móvel consistindo em propan-2-ol : acetato de etila : amônia aquosa 25% : água (16 : 16 : 5 : 10, v/v). Uma solução de ninhidrina (2%, p/v) em acetona foi usada como o reagente de

visualização. Após a eluição, as placas foram secadas e escaneadas com o escâner Camag TLC Scanner 3 no modo de absorvância com detecção a 520 nm usando o programa de computador winCATS (versão 1.4.2).

[0094] Os resultados de quatro fermentações em tubos de ensaio independentes são mostrados na Tabela 2. A quantidade de L-valina foi determinada como um valor relativo com base no valor para L-isoleucina como um controle, que foi considerado como 100%. Como pode ser visto a partir da Tabela 2, a cepa modificada *E. coli* 44-3-15 Scr *kan-P_L-cycA* foi capaz de acumular uma quantidade mais alta de L-isoleucina em comparação com a cepa parental *E. coli* 44-3-15 Scr. Tabela 2 também mostra que a cepa modificada *E. coli* 44-3-15 Scr *kan-P_L-cycA* foi capaz de acumular menos L-valina em comparação com a cepa parental *E. coli* 44-3-15 Scr.

Tabela 2

Cepa	L-Ile, g/L	L-Val, % de L-Ile
<i>E. coli</i> 44-3-15 Scr	13,7	23,5
<i>E. coli</i> 44-3-15 Scr <i>kan-P_L-cycA</i>	14,0	16,0

Exemplo 3. Subprodução de ácido alfa-aminobutírico e norvalina usando a cepa *E. coli* 44-3-15 Scr *kan-P_L-cycA*

[0095] A cepa modificada *E. coli* 44-3-15 Scr *kan-P_L-cycA* e a cepa de controle *E. coli* 44-3-15 Scr foram, cada uma, cultivadas a 32°C durante 18 horas em meio-LB. Então, 0,2 mL da cultura obtida foi inoculado para dentro de 2 mL de um meio de fermentação em tubos de ensaio de 20 mm × 200 mm e cultivados a 32°C durante 66 horas em um agitador rotativo a 250 rpm para uma OD₅₅₀ de cerca de 29 até o consumo de glicose. O meio de fermentação foi suplementado com clorossulfurona (número no CAS de 64902-72-3) para decrescer a biossíntese de L-aminoácidos de cadeia ramificada pela inibição de acetolactato-sintase (AHAS) para demonstrar o efeito da superexpressão de *cycA* sobre a subprodução de ácido alfa-aminobutírico e de norvalina (Gedi V. e Yoon M.-Y., “Bacterial acetohydroxyacid synthase and its inhibitors – a

summary of their structure, biological activity and current status”, *FEBS J.*, 2012, 279(6):946-963).

[0096] A composição do meio de fermentação (g/L) foi a seguinte:

Glicose	60,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	15,0
KH ₂ PO ₄	1,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,0
Tiamina-HCl	0,1
Clorossulfurona	20 µM
CaCO ₃	25,0
Meio-LB	10% (v/v)

[0097] O meio de fermentação foi esterilizado a 116°C durante 30 min, exceto que glicose e CaCO₃ foram esterilizados separadamente como segue: glicose a 110°C durante 30 min e CaCO₃ a 116°C durante 30 min. O pH foi ajustado para 7,0 com solução de KOH.

[0098] Após o cultivo, a L-isoleucina acumulada, o ácido alfa-aminobutírico acumulado e a norvalina acumulada foram medidos usando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *high-performance liquid chromatography*) (exemplo auxiliar).

[0099] Os resultados das três fermentações em tubos de ensaio independentes são mostrados na Tabela 3. A quantidade de ácido alfa-aminobutírico (α ABA) e de norvalina (nVal) foi determinada como um valor relativo com base no valor para L-isoleucina como um controle, que foi considerado 100%. Como pode ser visto a partir da Tabela 3, a cepa modificada *E. coli* 44-3-15 Scr *kan-P_L-cycA* foi capaz de acumular uma quantidade mais baixa de α ABA e de nVal em comparação com a cepa parental *E. coli* 44-3-15 Scr.

Tabela 3

Cepa	L-Ile, mg/L	α ABA, % de L-Ile	nVal, % e L-Ile
<i>E. coli</i> 44-3-15 Scr	270	274	337
<i>E. coli</i> 44-3-15 Scr <i>kan-P_L-cycA</i>	113	< 9	105

Exemplo auxiliar. Análise cromatográfica de L-isoleucina, ácido alfa-aminobutírico e norvalina

[00100] O método “*Waters AccQ-Tag*” foi usado para a análise. O

método “AccQ-Tag Method” é uma técnica com derivação pré-coluna para a determinação de aminoácidos. Foi usado o sistema “HPLC System Agilent 1100 Gradient System” (Agilent Technologies) equipado com detector de fluorescência e conectado ao computador carregado com o programa de computador para cromatografia “ChemStation B.02.01 SR2” (Agilent Technologies). Os ajustes do detector foram os seguintes: comprimento de onda de excitação a 250 nm, comprimento de onda de emissão a 395 nm. Uma alça de injeção de amostra de 5 µL foi usada para todas as eluições. A coluna “Waters AccQ-Tag Aminoacid Analysis Column” (3,9 mm × 150 mm) equipada com uma coluna de guarda foi usada para resolver os derivados de aminoácido obtidos na reação de derivação AccQ-Fluor usando o kit “AccQ-Fluor Reagent Kit” (Waters, WAT052880). A coluna foi equilibrada a 37°C, e foi aplicada uma fase móvel em uma taxa de fluxo de 0,8 mL/min. A fase móvel continha os seguintes eluentes: Eluente A – Solução tamponante aquosa “Waters AccQ-Tag Eluent A” (Waters, WAT052890), Eluente B – acetonitrila de grau HPLC, e água C–Milli-Q. O gradiente foi conforme mostrado na Tabela 4. A curva de nº 6 corresponde a um segmento linear e de nº 11 a uma função degrau.

Tabela 4

Etapa	Tempo inicial de uma etapa, min	Eluente A, %	Eluente B, %	Eluente C, %	Tipo de Curva
1	0	100	0	0	0
2	0,4	100	0	0	6
3	0,5	99	1	0	6
4	18,0	95	5	0	6
5	19,0	91	9	0	6
6	28,0	78	17	5	6
7	35,0	78	17	5	11
8	36,0	0	60	40	11
9	38,0	0	60	40	11
10	39,0	100	0	0	11
11	47,0	99	1	0	11

Aplicabilidade Industrial

[00101] O método da presente invenção é útil para a produção de L-isoileucina em uma quantidade mais alta com o grau elevado de pureza.

[00102] Embora a invenção tenha sido descrita em detalhe com

referência às suas modalidades preferidas, será evidente para uma pessoa versada na técnica que várias alterações podem ser feitas, e equivalentes utilizados, sem se desviarem do escopo da invenção. Todas as referências citadas neste documento são incorporadas como uma parte deste pedido a título de referências.

REIVINDICAÇÕES

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

(i) cultivar uma bactéria da família *Enterobacteriaceae* que tem uma capacidade para produzir L-isoleucina em um meio de cultura para produzir a L-isoleucina no meio de cultura ou nas células bacterianas, ou em ambos; e

(ii) coletar a L-isoleucina do meio de cultura ou das células bacterianas, ou de ambos,

em que a bactéria está modificada para superexpressar um gene *cycA*.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito gene *cycA* codifica uma proteína selecionada do grupo consistindo em:

(A) uma proteína compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

(B) uma proteína compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, mas que inclui uma ou mais mutações compreendendo substituição, deleção, inserção e/ou adição de um ou vários resíduos de aminoácido, e em que a dita proteína tem a atividade de uma proteína transportadora tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; e

(C) uma proteína tendo uma homologia de não menor que 70% com respeito à sequência de aminoácidos inteira de SEQ ID NO: 2 e tendo a atividade da proteína transportadora tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o dito gene *cycA* é um DNA selecionado do grupo consistindo em:

(A) um DNA compreendendo a sequência de nucleotídeos de

SEQ ID NO: 1;

(B) um DNA que codifica uma proteína compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, mas que inclui uma ou mais mutações compreendendo substituição, deleção, inserção e/ou adição de um ou vários resíduos de aminoácido, e em que a dita proteína tem a atividade da proteína transportadora tendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; e

(C) um DNA que é uma sequência de nucleotídeos variante de SEQ ID NO: 1 devido à degeneração do código genético.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o dito gene *cycA* é superexpressado pelo aumento do número de cópias do gene *cycA* e/ou pela modificação de uma região regulatória de expressão do gene *cycA*, de modo que o nível de expressão do dito gene seja intensificado em comparação com uma bactéria não modificada.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a dita bactéria pertence ao gênero *Escherichia*.

6. Método de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a dita bactéria é *Escherichia coli*.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a dita bactéria pertence ao gênero *Pantoea*.

8. Método de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a dita bactéria é *Pantoea ananatis*.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que a quantidade de um aminoácido subproduto da L-isoleucina é reduzida em comparação com uma bactéria não modificada.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o aminoácido subproduto é selecionado do grupo consistindo

em L-valina, L-leucina, L-norvalina, L-norleucina, ácido alfa-aminobutírico e combinações das mesmas.

RESUMO

“MÉTODO PARA PRODUZIR L-ISOLEUCINA”

A presente invenção fornece um método para produzir L- isoleucina por fermentação usando uma bactéria pertencendo à família *Enterobacteriaceae* que está modificada para superexpressar o gene *cycA*. O método também permite reduzir a produção de aminoácido(s) subproduto(s) de L-isoleucina durante a fermentação da bactéria *Enterobacteriaceae* tendo uma capacidade para produção de L-isoleucina.