



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

(11) PI 0620880-0 B1

(22) Data do Depósito: 04/01/2006

(45) Data de Concessão: 09/10/2018



* B R P I 0 6 2 0 8 8 0 B 1 *

(54) Título: MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE METIONINA, PELO CULTIVO DE UM MICROORGANISMO, E, MICROORGANISMO

(51) Int.Cl.: C12P 13/12; C12P 13/06; C12N 1/21

(73) Titular(es): EVONIK DEGUSSA GMBH

(72) Inventor(es): RAINER FIGGE; FABIEN LUX; CÉLINE RAYNAUD; MICHEL CHATEAU; PHILIPPE SOUCAILLE

(85) Data do Início da Fase Nacional: 02/07/2008

“MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE METIONINA, PELO CULTIVO DE UM MICROORGANISMO, E, MICROORGANISMO”

CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] A presente invenção refere-se a um processo para a produção de metionina ou seus derivados pelo cultivo de um microorganismo em um meio de cultura apropriado compreendendo uma fonte de carbono e uma fonte de enxofre. O microorganismo reivindicado é modificado em uma modificação em uma maneira que a produção de cisteína e/ou unidades C1 é aumentada e/ou o potencial de transferência de unidades C1 sobre homocisteína é aumentado ou otimizado. O isolamento de metionina ou seus derivados do meio de fermentação também é reivindicado.

ARTE ANTERIOR

[0002] Compostos contendo enxofre tais como cisteína, homocisteína, metionina ou S-adenosil-metionina são críticos para o metabolismo celular e são produzidos industrialmente para serem usados como aditivos de alimento ou de ração e fármacos. Em particular metionina, um aminoácido essencial, que não pode ser sintetizado por animais, desempenha um papel importante em muitas funções do corpo. Além de seu papel em biossíntese de proteína, metionina está envolvida em transmetilação e na biodisponibilidade de selênio e zinco. Metionina também é diretamente usada como um tratamento para distúrbios como alergia e febre reumática. Contudo a maior parte de metionina que é produzida é adicionada em ração animal.

[0003] Com o uso diminuído de proteínas derivadas de animal como um resultado de BSE e gripe de galinha, a demanda por metionina pura tem aumentado. Quimicamente D,L-metionina é comumente produzida a partir de acroleína, metil-mercaptano e cianeto de hidrogênio. Contudo a mistura racêmica não desempenha tão bem quanto a L-metionina pura, como por exemplo em aditivos de ração de galinha (Saunderson, C.L., (1985) British Journal of Nutrition 54, 621-633). L-Metionina pura pode ser produzida a partir de metionina racêmica e.g. através de tratamento com acilase de N-acetil-D,L-metionina que aumenta dramaticamente os

custos de produção. A demanda crescente por L-metionina pura acompanhada por preocupações ambientais torna atrativa a produção microbiana de metionina.

[0004] Microorganismos têm desenvolvido mecanismos regulatórios elevadamente complexos que finamente sintonizam a biossíntese de componentes celulares permitindo assim velocidades de crescimento máximas. Conseqüentemente apenas as quantidades requeridas de metabólitos, tais como aminoácidos, são sintetizadas e podem não ser normalmente detectadas no sobrenadante de cultura de cepas de tipo selvagem. Bactérias controlam a biossíntese de aminoácido principalmente por inibição de retro-alimentação de enzimas, e repressão ou ativação de transcrição de gene. Efeitos para estas rotas regulatórias não na maioria dos casos os produtos finais das rotas relevantes. Conseqüentemente, estratégias para sobreprodução de aminoácidos em microorganismos requer a desregulação destes mecanismos de controle.

[0005] A rota para a síntese de L-metionina é bem conhecida em muitos microorganismos. Metionina é derivada do aminoácido aspartato, mas sua síntese requer a convergência de duas rotas adicionais, biossíntese de cisteína e metabolismo C1 (N-metil-tetra-hidro-folato). Aspartato é convertido em homo-serina por uma seqüência de três reações. Homo-serina pode subseqüentemente entrar na rota biossintética de treonina/isoleucina ou metionina. Em *E. coli* entrada na rota de metionina requer a acilação de homo-serina a succinil-homo-serina. Esta etapa de ativação permite a condensação subseqüente com cisteína, levando à cistationina contendo tioéter, que é hidrolisada para dar homocisteína. A transferência final de metila levando à metionina é realizada por uma metil-transferase quer B₁₂-dependente quer B₁₂-independente.

[0006] A biossíntese de metionina em *E. coli* é regulada pela repressão e ativação dos genes biossintéticos de metionina via as proteínas MetJ e MetR, respectivamente (revisto em Neidhardt, F. C. (Edito-Chefe), R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, e H. E. Umbarger (eds), 1996, *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, American Society for Microbiology; Weissbach et al., 1991

Mol. Microbiol., 5, 1593-1597). É sabido que MetJ junta com seu co-repressor S-adenosil-metionina regula os genes metA, metB, metC, metE e metF. Outros genes codificadores de enzimas implicadas em produção de metionina, tais como glyA, metE, metH e metF são ativados por MetR enquanto que metA é reprimido por MetR. As enzimas correspondentes estão todas envolvidas na produção e na transferência de unidades C1 de serina para metionina. GlyA codificador de serina-hidróxi-metil-transferase catalisa a conversão de serina em glicina e a concomitante transferência de uma unidade C1 na coenzima tetra-hidro-folato (THF). A unidade C1 na forma de metileno-THF necessita ser reduzida a metil-THF antes de ela poder ser transferida sobre homocisteína para dar metionina. Esta reação é catalisada pela proteína metF. Transferência de grupo metila é quer catalisada por metH via vitamina B12 quer diretamente por MetE. É sabido que a enzima metH possui uma velocidade catalítica que é cem vezes mais alta do que a da enzima MetE. Na ausência de vitamina B12 e portanto de metH ativa, MetE pode compor até 5% da proteína celular total. A presença de metH ativa reduz a atividade de MetE provavelmente pela redução da quantidade de homocisteína que normalmente ativa a transcrição de metE via MetR. Portanto a produção de metionina via metH economiza recursos importantes para a célula pela não expressão de quantidades grandes de MetE. Um acúmulo de homocisteína é tóxico para E. coli (Tuite et al., 2005 J. Bacteriol, 187, 13, 4362-4371.) e ao mesmo tempo possui um efeito regulatório, negativo sobre a expressão de metA via MetR. Assim uma expressão forte das enzimas metH e/ou MetE é claramente requerida para produção eficiente de metionina.

[0007] Em E. coli enxofre reduzido é integrado em cisteína e então transferido para precursor de metionina O-succinil-homo-serina, um processo chamado de transulfuração (revisto em Neidhardt, F. C. (Editor-Chefe), R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, e H. E. Umbarger (eds). 1996. Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology, American Society for Microbiology). Cisteína é produzida a partir de O-acetil-serina e H₂S por sulfidrilção. O processo é negativamente

regulado por retro-alimentação pelo produto, cisteína, atuando sobre serina-transacetilase, codificada por *cysE*. N-acetil-serina, que é espontaneamente produzida a partir de O-acetil-serina, juntamente com o fator de transcrição *CysB* ativa genes codificadores de enzimas envolvidas no transporte de compostos de enxofre, sua redução a H_2S e sua integração no composto orgânico de enxofre cisteína, que como metionina é um aminoácido essencial.

[0008] Na ausência de cisteína, *MetB* catalisa a conversão de precursor de metionina O-succinil homo-serina em amônia, α -ceto-butirato e succinato, uma reação chamada de γ -eliminação (Aitken & Kirsch, 2005, Arch Biochem Biophys 433, 166-75). α -Ceto-butirato pode ser subsequentemente convertido em isoleucina. Esta reação secundária não é desejável para a produção industrial de metionina, porque os dois aminoácidos são difíceis de separar. Assim atividade de γ -eliminação baixa é um aspecto importante para a produção industrial de metionina. O pedido de patente provisório US 60/650.124 depositado aos 7 de fevereiro de 2005 descreve como γ -eliminação pode ser reduzida pela otimização da enzima *MetB*. Otimização do fluxo de biossíntese de cisteína também pode reduzir a γ -eliminação e assim a produção do subproduto isoleucina e constitui uma modalidade desta invenção.

DESCRIÇÃO GERAL DA INVENÇÃO

[0009] A invenção refere-se a um processo para a produção de metionina, seus precursores ou produtos derivados da mesma em um processo fermentativo usando microorganismos que possuem produção aumentada de cisteína e que crescem em uma fonte de carbono e de enxofre definida.

[0010] Precursores de metionina são definidos como metabólitos que são parte da rota metabólica específica de metionina ou podem ser derivados destes metabólitos. A rota específica de metionina começa com a transformação de homo-serina em succinil-homo-serina pela enzima homo-serina succinil transferase (*MetA*).

[0011] Produtos derivados de metionina originam-se das rotas de degradação e/ou transformação de metionina.

[0012] Para aumentar a produção de cisteína os inventores têm aumentado a expressão de genes envolvidos na produção de cisteína.

[0013] O termo aumentado neste contexto descreve o aumento na atividade intracelular de uma atividade enzimática que é codificada pelo correspondente DNA, por exemplo pelo aumento do número de cópias do gene, usando um promotor forte ou usando um alelo com atividade aumentada e possivelmente combinando estas medidas.

[0014] Os termos "expressão aumentada" ou "expressão intensificada" são ambos usados no teste e possuem significado similar.

[0015] Para aumentar a expressão de um gene ele pode ser cromossômica ou extracromossomicamente codificado. Cromossomicamente pode haver uma ou várias cópias no genoma que pode ser introduzido pelos métodos de recombinação conhecidos pelo perito no campo. Extracromossomicamente genes podem ser transportados por tipos diferentes de plasmídeos que diferem com respeito à sua origem de replicação e assim ap seu número de cópias na célula. Podem estar presentes como 1-5 cópias, cerca de 20 ou até 500 cópias, correspondendo aos plasmídeos de baixo número de cópias com a replicação apertada (pSC101, RK2), plasmídeos de baixo número de cópias (pACYC, pRSF 1010) ou plasmídeos de alto número de cópias (pSK bluescript II).

[0016] Em uma modalidade preferida da invenção o gene pode ser expressado usando promotores com força diferente que necessitam ou não de serem induzidos por moléculas indutoras. Estes promotores podem ser homólogos ou heterólogos. Exemplos são os promotores Ptrc, Ptac, Plac, o promotor lambda cl ou outros promotores conhecidos pelo perito no campo.

[0017] Expressão dos genes alvo pode ser reforçada ou reduzida por elementos estabilizadores ou desestabilizadores do correspondente RNA mensageiro (Carrier e Keasling (1998) Biotechnol. Prog. 15, 58-64) ou da proteína (e.g. etiquetas GST, Amersham Biosciences).

[0018] A presente invenção também se refere aos microorganismos que contêm um ou mais alelos do gene a ser intensificado de acordo com a invenção.

[0019] Em uma modalidade particular da invenção a expressão de genes envolvidos na produção de cisteína é aumentada.

[0020] Genes envolvidos na produção de cisteína compreendem genes codificadores de proteínas requeridas para a importação de uma fonte de enxofre, a transformação daquela fonte de enxofre em sulfeto de hidrogênio e a assimilação do sulfeto de hidrogênio ou da fonte de enxofre em cisteína ou seus derivados.

[0021] Em *E. coli* estas proteínas são codificadas pelos seguintes genes (seguidos pelos números de acesso e pela função dos polipeptídeo correspondente):

Gene	Número de acesso	Função
cysA	1788761	sulfato-permease
cysU, cysT	1788764	componente de transportador ABC de sulfato
cysW	1788762	proteína transportadora de sulfato ligada à membrana
cysZ	1788753	ORF a montante de cysK
cysN	1789108	ATP sulfurilase
cysD	1789109	sulfato adenil-transferase
cysC	1789107	adenilil-sulfato cinase
cysH	1789121	adenilil-sulfato redutase
cysI	1789122	sulfito-redutase, subunidade alfa
cysJ	1789123	sulfito-redutase, subunidade beta
cysE	1790035	serina-acetil-transferase
cysK	1788754	cisteína-sintase
cysM	2367138	O-acetil-serina-sulfidrilase
cysZ	1788753	transporte de sulfato
sbp	1790351	Proteína ligante de sulfato periplásmica

[0022] Na descrição da presente invenção, genes e proteínas são identificados usando as denominações dos genes correspondentes em *E. coli*. Contudo, e a não ser se especificado de outra maneira, uso destas denominações possui um significado mais geral de acordo com a invenção e cobre todos os correspondentes genes e proteínas em outros organismos, mais particularmente microorganismos.

[0023] PFAM (banco de dados de alinhamentos de famílias de proteínas e modelos escondidos de Markov; <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) representa uma coleção grande de alinhamentos de seqüências de proteínas. Cada PFAM

torna possível visualizar alinhamentos múltiplos, ver domínios de proteína, avaliar distribuição dentre os organismos, ganhar acesso a outros bancos de dados, e visualizar a estrutura de proteína conhecida.

[0024] COGS (agrupamentos de grupos ortólogos de proteínas; <http://www.nebi.nlm.nih.gov/COG/>) são obtidos por comparação de seqüências de proteína de 66 genomas totalmente seqüenciados representando 30 linhagens filogenéticas maiores. Cada COG é definido de pelo menos três linhagens, que permite a identificação dos primeiros domínios conservados.

[0025] Os meios de identificação de seqüências homólogas e de suas homologias percentuais são bem conhecidos por aquelas pessoas experientes na arte, e incluem em particular os programas BLAST, que podem ser usados do sítio da Internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> com os parâmetros pré-estabelecidos indicados naquele sítio da Internet. As seqüências obtidas podem ser então exploradas (e.g., alinhadas) usando, por exemplo, os programas CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) ou MULTALIN (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/cgi-bin/multalin.pl>), com os parâmetros pré-estabelecidos indicados naqueles sítios da Internet.

[0026] Usando as referências dadas no GenBank para genes conhecidos, aquelas pessoas experientes na arte são capazes de determinar genes equivalentes em outros organismos, cepas bacterianas, leveduras, fungos, mamíferos, plantas, etc. Este trabalho de rotina é vantajosamente feito usando seqüências de consenso que podem ser determinadas pela realização de alinhamentos de seqüências com genes derivados de outros microorganismos, e planejamento de sondas degeneradas para clonar o gene correspondente em outro organismo. Estes métodos de rotina de biologia molecular são bem conhecidos por aquelas pessoas experientes na arte, e são descritos, por exemplo, em Sambrook et al. (1989 Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.).

[0027] Como uma modalidade preferida, o microorganismo usado no método da presente invenção é modificado para aumentar a expressão de cysE codificador de

serina-transacetilase.

[0028] A presente invenção também se refere aos microorganismos que contêm um ou vários alelos codificadores de serina-transacetilase de acordo com a invenção.

[0029] Tais cepas são caracterizadas pelo fato de que possuem um metabolismo de cisteína que permite um fluxo aumentado na direção de metionina pela provisão de uma concentração de substrato aumentada para a síntese de γ -cistationina, uma reação catalisada por MetB. Em concentrações baixas de cisteína a enzima MetB produz amônia, succinato e α -ceto-butirato a partir de succinil-homo-serina, uma reação chamada de γ -eliminação. Uma concentração de cisteína aumentada reduz a quantidade de α -ceto-butirato produzido e assim aumenta o fluxo na direção de metionina.

[0030] Expressão intensificada de atividades de serina-transacetilase pode ser validada em testes enzimáticos com serina e acetil-CoA. A reação é iniciada pela adição do extrato de proteína contendo atividade de serina-transacetilase, e a formação de O-acetil-serina é monitorada por GC-MS após precipitação de proteína e derivação com um agente de sililação.

[0031] A presente invenção também se refere à expressão intensificada do gene *cysts* codificador de O-acetil-serina sulfidrilase que permite a integração aumentada de tiosulfato em sulfo-cisteína reforçando a produção de cisteína.

[0032] A presente invenção portanto reivindica um processo no qual γ -eliminação e portanto a produção de isoleucina é reduzida pela otimização da produção de cisteína.

[0033] Um promotor heterólogo de acordo com a invenção é entendido como o promotor de tipo selvagem modificado ou qualquer promotor de outro organismo ou um promotor inteiramente sintético. Preferivelmente o promotor heterólogo é um promotor forte, tal como P_{trc}, P_{tac}, lambda cl ou outros promotores conhecidos pelo perito no campo.

[0034] Em outra modalidade preferida da invenção é reivindicado um processo no qual um microorganismo é usado para a produção de metionina ou seus

derivados no qual a expressão de genes envolvidos na produção de unidades C1 e/ou sua transferência potencial para homocisteína é/são aumentado(s) ou otimizado(s).

[0035] De acordo com a invenção, otimização é realizada pela adaptação do nível de expressão do gene de interesse em um modo para obter a produção mais alta de metionina. Na maioria dos casos isto é feito pela criação de bibliotecas de expressão do gene de interesse usando por exemplo promotores heterólogos e triagem dos melhores produtores.

[0036] De acordo com a invenção o termo unidade C1 descreve átomos de carbono individuais que são ligados na molécula transportadora tetra-hidro-folato como grupos metila, metileno, metenila ou formila.

[0037] O termo "potencial de transferência" descreve a capacidade dos microorganismos para transferir unidades C1 para homocisteína. Este potencial é determinado pelas atividades de metF e/ou metH que têm sido intensificadas e/ou otimizadas pelos inventores.

[0038] Genes envolvidos na produção de unidades C1 são listados abaixo:

serA	1789279	Fosfoglicerato-desidrogenase
serB	1790849	Fosfoserina-fosfatase
serC	1787136	Sosfosserina-amino-transferase
glyA	1788902	Serina-hidróxi-metil-transferase
gcvT	1789272	Amino-metil-transferase dependente de tetra-hidro-folato dependente
gcvH	1789271	Clivagem de glicina, transportador de grupo amino-metila
gcvP	1789269	Glicina-desidrogenase (descarboxilação)
lpd	1786307	Lipoamida-desidrogenase

[0039] Genes envolvidos na transferência de unidades C1 em homocisteína são listados abaixo:

metF	1790377	5,10-Metileno-tetra-hidro-folato redutase
metH	1790450	Homocisteína-N5-metil-tetra-hidro-folato-

transmetilase dependente de B12

metE 2367304 Tetra-hidro-pteróil-triglutamato metil-transferase

[0040] Em uma modalidade especialmente preferida da invenção o microorganismo usado para a produção de metionina é modificado para aumentar a expressão de metF ou metH, ou ambos ou para expressar metF de um promotor heterólogo.

[0041] Atividade intensificada de metionina sintase (metH) dependente de vitamina B12 pode ser validada em testes enzimáticos com metil-THF e homocisteína na presença de vitamina B12 e SAM. A reação é iniciada pela adição do extrato de proteína contendo a atividade de metileno tetra-hidro-folato redutase, e a formação de metionina é monitorada por GC-MS após a precipitação e derivação de proteína com um agente de silição.

[0042] Produção de metionina pode ser adicionalmente aumentada pela expressão de genes adicionais envolvidos na biossíntese de metionina, que também é o objetivo da invenção.

[0043] Estes genes são listados abaixo:

metA	1790443	Homo-serina succinil-transferase
metB	1790375	Cistationina- γ -sintase
metC	1789383	Cistationina- β -lyase
metF	1790377	5,10-Metileno-tetra-hidro-folato redutase
metR	1790262	Gene regulatório positivo para metE, metH e metF

[0044] Ademais expressão de genes em rotas de degradação de metionina ou de desvio da rota de produção de metionina pode ser reduzida ou os genes podem ser deletados.

speD	1786311	S-Adenosil-metionina descarboxilase
speC	1789337	Ornitina descarboxilase
astA	1788043	Arginina succinil-transferase
dapA	1788823	Di-hidro-dipicolinato sintase

[0045] Reações anapleróticas podem ser reforçadas pela expressão de

ppc 1790393 fosfoenol-piruvato carboxilase

pps 1787994 fosfoenol-piruvato sintase

[0046] Reações de consumo de acetato podem ser reforçadas pela sobreexpressão de

acs 1790505 acetil-CoA sintetase

[0047] Um aumento adicional na produção de L-metionina, seus precursores ou compostos derivados da mesma pode ser realizado pela sobreexpressão de um ou vários dos seguintes genes: piruvato carboxilases, e.g. de *Rhizobium etli* (pyc, U51439), ou um de seus homólogos, as enzimas de síntese de homo-serina codificadas pelos genes thrA (homo-serina desidrogenase/ aspartocinase, 1786183), preferivelmente com sensibilidade de retro-alimentação reduzida, metL (homo-serina desidrogenase/aspartocinase, g1790376) ou lysC (aspartocinase, 1790455) e asd (aspartato semialdeído desidrogenase).

[0048] Um aumento adicional na produção de L-metionina, seus precursores ou compostos derivados da mesma, é realizado por meio da deleção do gene para a proteína repressora MetJ, responsável pela infra-regulação do regulon de metionina como foi sugerido em JP 2000157267-A/3 (veja também GenBank 1790373).

[0049] Produção de metionina é adicionalmente aumentada pelo uso de alelos de homo-serina succinil-transferase com sensibilidade de retro-alimentação reduzida aos inibidores SAM e metionina como descrito no pedido de patente WO 2005/111202 que é incorporado neste documento.

[0050] Um aumento na produção de L-metionina, seus precursores ou compostos derivados da mesma, pode ser realizado pela atenuação da atividade ou deleção de um dos seguintes genes.

[0051] Atenuação neste contexto descreve a redução da atividade intracelular de uma enzima pelas medidas tais como redução de sua expressão, redução da estabilidade da enzima, aumento de sua degradação e/ou outras soluções conhecidas pelo perito no campo.

Gene Entrada no Genbank atividade

ackA 1788633 acetato cinase

pta	1788635	fosfotransacetilase
aceE	1786304	piruvato desidrogenase E1
aceF	1786305	piruvato desidrogenase E2
lpd	1786307	piruvato desidrogenase E3
sucC	1786948	succinil-CoA sintetase, subunidade beta
sucD	1786949	succinil-CoA sintetase, subunidade alfa
pck	1789807	fosfoenol-piruvato carbóxi-cinase
pykA	1788160	piruvato cinase II
pykF	1787965	piruvato cinase I
poxB	1787096	piruvato oxidase
ilvB	1790104	aceto-hidróxi-ácido sintase I, subunidade grande
ilvN	1790103	aceto-hidróxi-ácido sintase I, subunidade pequena
ilvG	1790202 1790203	aceto-hidróxi-ácido sintase II, subunidade grande
ilvM	1790204	aceto-hidróxi-ácido sintase II, subunidade pequena
ilvI	1786265	aceto-hidróxi-ácido sintase III, subunidade grande
ilvH	1786266	aceto-hidróxi-ácido sintase III, subunidade pequena
aroF	1788953	DAHP sintetase
aroG	1786969	DAHP sintetase
acoH	1787996	DAHP sintetase
thrB	1786184	homo-serina cinase
thrC	1786185	treonina sintase
sdaA	1788116	serina desaminase
sdaB	1789161	serina desaminase
[0052]	Produção de metionina pode ser adicionalmente aumentada pelo uso de	

um alelo metB alterado que usa preferencialmente ou exclusivamente H₂S e assim produz homocisteína a partir de O-succinil-homo-serina como tem sido descrito no pedido de patente WO 2004/076659, cujo conteúdo é aqui incorporado como referência.

[0053] A fonte de enxofre usada para a produção fermentativa de L-metionina, seus precursores ou compostos derivados da mesma, pode ser qualquer uma das seguintes ou uma combinação das mesmas: sulfato, tiosulfato, sulfeto de hidrogênio, ditionito, sulfito.

[0054] Em uma modalidade preferida da invenção a fonte de enxofre é sulfato e/ou tiosulfato.

[0055] A invenção também se refere-se ao processo para a produção de L-metionina, seus precursores ou compostos derivados da mesma, compreendendo a fermentação do microorganismo produtor de metionina descrito acima, a concentração de metionina, seus precursores ou derivativos e o isolamento do produto desejado do caldo de fermentação.

[0056] De acordo com a invenção, os termos 'cultura' e 'fermentação', são usados indiferentemente para denotarem o crescimento de um microorganismo em um meio de cultura apropriado contendo uma única fonte de carbono.

[0057] De acordo com a invenção uma única fonte de carbono é uma fonte de carbono que podem ser usadas por aquelas pessoas experientes na arte para obter crescimento normal de um microorganismo, em particular de uma bactéria. Em particular pode ser um açúcar assimilável tal como glicose, galactose, sacarose, lactose ou melão, ou subprodutos destes açúcares. Uma fonte de carbono simples especialmente preferida é glicose. Outra fonte de carbono simples é sacarose.

[0058] Aquelas pessoas experientes na arte são capazes de definir as condições de cultura para os microorganismos de acordo com a invenção. Em particular as bactérias são fermentadas em uma temperatura entre 20°C e 55°C, preferencialmente entre 25°C e 40°C, e mais especificamente cerca de 30°C para *C. glutamicum* e cerca de 37°C para *E. coli*.

[0059] A fermentação é geralmente conduzida em fermentadores com um meio

de cultura inorgânica de composição definida conhecida adaptada às bactérias usadas, contendo pelo menos uma fonte de carbono simples, e se necessário um co-substrato necessário para a produção do metabólito.

[0060] Em particular, o meio de cultura inorgânica para *E. coli* pode ser de composição idêntica ou similar de um meio M9 (Anderson, 1946, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 32:120-128), um meio M63 (Miller, 1992; A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual e Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) ou um meio tal como definido por Schaefer et al. (1999, Anal. Biochem. 270: 8896).

[0061] Analogamente, o meio de cultura inorgânico para *C. glutamicum* pode ser de composição idêntica ou similar ao meio BMCG (Liebl et al., 1989, Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 205210) ou a um meio tal como aquele descrito por Riedel et al. (2001, J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 3: 573-583). Os meios podem ser suplementados para compensarem as auxotrofias introduzidas por mutações.

[0062] Após a fermentação L-metionina, seus precursores ou compostos derivados da mesma, é/são recuperado(s) e purificado(s) se necessário. Os métodos para a recuperação e a purificação dos compostos produzidos tal como metionina no meio de cultura são bem conhecidos por aquelas pessoas experientes na arte.

[0063] Opcionalmente de 0 a 100% da biomassa pode ser retido durante a purificação do produto de fermentação.

[0064] A invenção também se refere a um microorganismo que é otimizado para a produção fermentativa de metionina.

[0065] O termo "microorganismo otimizado" descreve o microorganismo no qual as modificações descritas acima são integradas acarretando o melhor desempenho industrial para a produção do(s) metabólito(s) desejado(s) e possivelmente a produção mais baixa de subprodutos.

[0066] Em uma aplicação preferida o microorganismo é *E. coli* ou *C. glutamicum* ou *Saccharomyces cerevisiae*.

[0067] Na aplicação mais preferida o organismo é *E. coli*.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0068] Uma cepa de *E. coli* na qual o repressor de metionina codificado pelo gene *metJ* tem sido substituído por um cassete de cloranfenicol ($\Delta metJ::Cm$) e que hospeda um alelo *metA* com sensibilidade de retro-alimentação reduzida à metionina e SAM (*metA*11*) tem sido descrita em PCT N° PCT/IB04/001901 depositado aos 12 de maio de 2004. Nesta cepa as seguintes modificações genéticas foram introduzidas.

Construção de MG1655 *metA*11* $\Delta metJ::Cm$ *P_{trc}-metF::Km*

[0069] Para clonar gene *metF* sob o controle do promotor heterólogo *P_{trc}*, a estratégia de recombinação homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000) foi usada. Esta estratégia permite a inserção de um cassete de resistência a cloranfenicol ou canamicina próximo dos genes de interesse. Para este propósito os seguintes oligonucleotídeos foram usados:

[0070] *P_{trc}metF R* (SEQ ID NO 1)

[0071] GCCAGGCTCTGATTCAGGGCATCCCGCTGGCTGGCGTGAAAAAGC
TCATAatatacctccttattccacacattatacgagccggatgattaattgtcaacagctcTGTAGGCTGGAG
CTGCTTCG

[0072] com:

- uma região (letras maiúsculas) homóloga à seqüência (4130259-4160195) do gene *metF* (seqüência de referência no sítio da Internet <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>)
- uma região (letras em itálico) homóloga à seqüência de promotor *P_{trc}* com o RBS (negrito) os boxes -35 e -10 (negrito)
- uma região (letras maiúsculas) para a amplificação do cassete de resistência à canamicina (seqüência de referência em Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645)

[0073] *P_{trc}-metF F* (SEQ ID NO 2)

[0074] ccttcatctttacatctggacgtctaaacggatagatgtgcacaacacaacatataactacaagcgattg
atgaggtaaggtcacactggctcaccttcgggtgggcctttctgcCATATGAATATCCTCCTTAG

[0075] com :

- uma região (letras minúsculas) homóloga à seqüência (4130114-

4130195) da região de gene metF (seqüência de referência no sítio da Internet <http://genolist.pasteur.fr/Colibti/>)

- uma região (itálicos, letras minúsculas) homóloga à seqüência do bacteriófago T7 terminus (Genbank V01146)
- uma região (letras maiúsculas) para a amplificação do cassete de resistência à canamicina (seqüência de referência em Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

[0076] Os oligonucleotídeos Ptrc-metF F e Ptrc-metF R foram usados para amplificar o cassete de resistência à canamicina do plasmídeo pKD4. O produto de PCR obtido foi então introduzido por eletroporação na cepa MG1655 metA*11 Δ metJ (pKD46), na qual a enzima Red recombinase expressada permite a recombinação homóloga. Os transformantes de resistência à canamicina foram selecionados e a inserção do cassete de resistência foi verificada por uma análise de PCR com os oligonucleotídeos Ptrc-metFv F e Ptrc-metFv R definidos abaixo.

[0077] Ptrc-metFv F (SEQ ID NO 3) :

[0078] GCCCGGTACTCATGTTTTCGGGTTTATGG (homóloga à seqüência de 4129866 a 4129894).

[0079] Ptrc-metFv R (SEQ ID NO 4):

[0080] CCGTTATTCCAGTAGTCGCGTGCAATGG (homóloga à seqüência de 4130524 a 4130497).

[0081] A cepa resultante foi chamada de MG1655 metA*11 Δ metJ Ptrc-metF:Km. Construção de plasmídeo pME101-thrA*1-cysE

[0082] pME101-thrA*1

[0083] Para reforçar a produção de homo-serina thrA* codificador de aspartocinase/homo-serina com resistência de retro-alimentação reduzida à treonina foi expressado do plasmídeo pCL1920 (Lerner & Inouye, 1990, NAR 18, 15 p 4631) usando o promotor Ptrc. Para a construção do plasmídeo pME101-thrA*1 thrA foi amplificado por PCR de DNA genômico usando os seguintes oligonucleotídeos:

[0084] BspH1thrA (SEQ ID NO 5):

[0085] ttaTCATGAgagtgttgaagttcggcggtacatcagtggc

[0086] Sma1thrA (SEQ ID NO 6):

[0087] ttaCCCGGGccgcccggagcacatcaaaccgacgc

[0088] O fragmento amplificado por PCR foi cortado com as enzimas de restrição BspHI e SmaI e clonado em sítios NcoI / SmaI do vetor pTRC99A (Stratagene). Para a expressão de um vetor de cópia baixa o plasmídeo pME101 foi construído como segue. O plasmídeo pCL1920 foi amplificado por PCR usando os oligonucleotídeos PME101F e PME101R e o fragmento BstZ17I XmnI do vetor pTRC99A hospedando o gene lacI e o promotor Ptrc foram inseridos no vetor amplificado. O vetor resultante e o vetor hospedando o gene thrA gene foram restritos por ApaI e SmaI e o fragmento contendo thrA foi clonado no vetor pME101. Para mitigar o thrA de inibição de retro-alimentação a mutação F318S foi introduzida por mutagênese sítio-direcionada (Stratagene) usando os oligonucleotídeos ThrAF F318S e ThrAR F318S, resultando no vetor pME101-thrA* I.

[0089] PME101F (SEQ ID NO 7): Ccgacagtaagacgggtaagcctg

[0090] PME101R (SEQ ID NO 8): Agcttagtaaagccctcgctag

[0091] ThrAF F318S (SmaI) (SEQ ID NO 9):

[0092] Ccaatctgaataacatggcaatgtccagcgtttctggcccggg

[0093] ThrAR F318S (SmaI) (SEQ ID NO 10):

[0094] Cccgggccagaaacgctggacattgccatgttattcagattgg

pME101-thrA*1-cysE

[0095] Para a construção de pME101-thrA*1-cysE o gene cysE foi amplificado por PCR usando oligonucleotídeos Ome B001 e Ome B002, o produto de PCR foi cortado com a enzima de restrição PvuII e clonado no sítio SmaI do vetor pME101-thrA*1 resultando no vetor pME101thrA*1-cysE.

[0096] Ome B001_cysER-PvuII (SEQ ID NO 11)

[0097] GGAGGGACAGCTGATACGAAAGAAGTCCGCGAACTGGCGC

[0098] Ome B002_cysEF-PvuII (SEQ ID NO 12)

[0099] Atacgcagctggacattagatcccatccccatactcaaagtatgg

[0100] sítios PvuII estão sublinhados. A seqüência em **negrito** corresponde a cysE (Colibri) (3780423-3780397)

Construção de MG1655 metA*11 Δ metJ::Cm Ptrc-metH::Km

[0101] Para reforçar a produção de metionina o gene metH foi sobreexpressado usando o promotor Ptrc. Para a construção os seguintes oligonucleotídeos foram usados:

[0102] DicIR-metHF (SEQ ID NO 13)

[0103] gcaccagaatacgttcatttaactgcgacgcagttgttccactttgctgctcatGTCTGTCCTCC
AGTACATGCAACCCCAACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAACAGCTCT
GTAGGCTGGAGCTGCTTCG com:

- uma região (letras minúsculas) homóloga à seqüência (4221461-4221408) do gene metH (seqüência de referência no sítio da Internet [http:// enolist.pasteur.fr/Colibri/](http://enolist.pasteur.fr/Colibri/))
- uma região (itálicos, letras maiúsculas) homóloga à seqüência de promotor Ptrc com o RBS (negrito) os boxes -35 e -10 (negrito)
- uma região (letras maiúsculas) para a amplificação do cassete de resistência à canamicina (seqüência de referência em Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

[0104] iclR-metHF (SEQ ID NO 14)

[0105] GCTTTTACCACAGATGCGTTTATGCCAGTATGGTTTGTGAATTTTTAT
TAAATCTGGGTTGAGCGTGTCTGGGAGCAAGTCATATGAATATCCTCCTTAG

[0106] com :

- uma região (itálicos, letras maiúsculas) homóloga à seqüência (4221327-4221406) da região de gene metH (seqüência de referência no sítio da Internet <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>),
- uma região (letras maiúsculas) para a amplificação do cassete de resistência à canamicina (seqüência de referência em Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

[0107] Os oligonucleotídeos DicIR-metHF e iclR-metHF foram usados para amplificar o cassete de resistência à canamicina do plasmídeo pKD4. O produto de PCR obtido é então introduzido por eletroporação na cepa MG1655 metA*11 Δ metJ (pKD46), na qual a enzima Red recombinase foi expressada permitindo a

recombinação homóloga. Transformantes resistentes à canamicina são selecionados e a inserção do cassete de resistência foi verificada por uma análise de PCR com os oligonucleotídeos iclF e iclR definidos abaixo.

[0108] iclF (SEQ ID NO 15):

[0109] CCTTTGAGGTGCGCATGGCCAGTCGGC (homóloga à seqüência de 4221558 to 4221533).

[0110] iclR (SEQ ID NO 16):

[0111] GCTTTTTAATAGAGGCGTCGCCAGCTCCTTGCC (homóloga à seqüência de 4219917 a 4219949).

[0112] A cepa resultante foi chamada de MG1655 metA*11 Δ metJ Ptrc-metH:Km. Construção de MG1655 metA*11 Δ metJ::Cm Ptrc-metF:Km Ptrc-metH

[0113] Para a construção da cepa MG1655 metA*11 Δ metJ::Cm Ptrc-metF:Km Ptrc-metH o cassete de resistência à canamicina e cloranfenicol foi eliminado da cepa MG1655 metA*11 Δ metJ::Cm Ptrc-metH:Km.

[0114] O plasmídeo pCP20 trazendo FLP recombinase atuando nos sítios FRT do cassete de resistência a cloranfenicol foi introduzido na cepa recombinante por eletroporação. Após uma série de culturas a 42°C, a perda dos dois cassetes foi verificada por análise de PCR. A cepa retida foi chamada de MG1655 metA*11 Δ metJ Ptrc-metH.

[0115] Para transferir o construto de promotor Ptrc::metF: Km para dentro da cepa MG1655 metA*11 Δ metJ Ptrc-metH, o método de transdução de fago P1 foi usado. O protocolo seguido foi implementado em 2 etapas com a preparação do lisato de fago da cepa MG1655 MG1655 metA*11 Δ metJ Ptrc-metF:Km e a subsequente transdução para dentro da cepa MG1655 metA*11 Δ metJ Ptrc-metH

[0116] Preparação de lisato de fago P I:

- Inoculação com 100 μ L de uma cultura noturna da cepa MG1655 metA*11 Δ metJ Ptrc-metF:Km de 10 mL de LB + Km 50 μ g/mL+ glicose 0,2% + CaCl₂ 5 mM.
- Incubação por 30 min a 37°C com agitação.
- Adição de 100 μ L de lisato de fago P1 preparado da cepa MG1655

(cerca de 1.10^9 fagos/mL).

- Agitação a 37 °C por 3 horas até que todas as células fossem lisadas.
- Adição de 200 µL de clorofórmio e agitação.
- Centrifugação por 10 min a 4.500 g para eliminar fragmentos celulares.
- Transferência do sobrenadante para um tubo estéril e adição de 200 µL de clorofórmio.
- Armazenagem de lisato a 4 °C.

[0117] Transdução

- Centrifugação por 10 min at 1500 g de 5 mL de uma cultura noturna da cepa MG1655 metA*11 ΔmetJ Ptrc-metH em meio LB.
- Suspensão da pelota celular em 2,5 mL de MgSO₄ 10 mM, CaCl₂ 5 mM
- Tubos de controle: 100 µL de células
100 µL de fagos P1 de cepa MG1655 metA*11 ΔmetJ Ptrc-metF:Km
- Tubo de teste: 100 µL de células + 100 µL de fagos P1 da cepa MG1655 metA *11 ΔmetJ Ptrc-metF:Km
- Incubação por 30 min a 30 °C sem agitação.
- Adição de 100 µL de citrato de sódio 1 M em cada tubo e agitação.
- Adição de 1 mL de LB.
- Incubação por 1 hora a 37 °C com agitação.
- Espalhamento sobre placas LB + Km 50 µg/mL após centrifugação dos tubos por 3 min a 7.000 rpm.
- Incubação a 37 °C durante a noite.

[0118] Verificação da cepa

[0119] Transformantes resistentes à canamicina foram selecionados e a presença do construto de promotor Ptrc-metF:Km foi verificada por Análise de PCR com os oligonucleotídeos Ptrc-metFv F e Ptrc-metFv R, descritos acima. A cepa retida foi chamada de MG1655 metA*11 ΔmetJ::Cm Ptrc-metH Ptrc-metF:Km.

Construção de MG1655 metA*11 ΔmetJ::Cm Ptrc-cysM::Km

[0120] Para clonar o gene *cysM* sob o controle do promotor heterólogo *Ptrc*, a estratégia de recombinação homóloga descrita por Datsenko & Wanner (2000) foi usada. Esta estratégia permite a inserção de um cassete de resistência à canamicina ou cloranfenicol próxima de genes de interesse. Para este propósito os seguintes oligonucleotídeos foram usados:

[0121] *Ptrc-cysM F*

[0122] *gcctgatgacgacgctgacgcttctatcaggctctacaggttacaaccttgccataatatacctccttacc acacattatacgagccggatgatt aattgtcaacagctcCATATGAATATCCTCCTTAG* (SEQ ID NO 17)

[0123] com :

- uma região (letras minúsculas) homóloga à seqüência (2537627-2537681) do gene *cysM* (seqüência de referência no sítio da Internet <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>)
- uma região (itálicos, letras minúsculas) homóloga à seqüência de promotor *Ptrc* com o RBS (negrito) os boxes -35 e -10 (negrito)
- uma região (letras maiúsculas) para a amplificação do cassete de resistência à canamicina (seqüência de referência em Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645),

[0124] *Ptrc-cysM R*

[0125] *ggttgagtgaatgttaaacgcccggaggcgcttcccgcgatccgggctttTATCACA*CTGGCTCACCTTCGGGTGGGCCTTTCTGCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG (SEQ ID NO 18)

[0126] com :

- uma região (letras minúsculas) homóloga à seqüência (2537734-2537684) da região de gene *cysM* (seqüência de referência no sítio da Internet <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>)
- uma região (itálicos, letras maiúsculas) homóloga à seqüência do bacteriófago T7 terminus (Genbank V01146)
- uma região (letras maiúsculas) para a amplificação do cassete de resistência à canamicina (seqüência de referência em Datsenko, K.A. & Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97: 6640-6645).

[0127] Os oligonucleotídeos Ptrc-cysM F e Ptrc-cysM R foram usados para amplificar o cassete de resistência à canamicina do plasmídeo pKD4. O produto de PCR obtido foi então introduzido por eletroporação na cepa MG1655 metA*11 Δ metJ (pKD46), na qual a enzima Red recombinase foi expressada permitindo recombinação homóloga. Transformantes resistentes à canamicina foram então selecionados e a inserção do cassete de resistência foi verificada por análise de PCR com os oligonucleotídeos Ptrc-cysMv F e Ptrc-cysMv R definidos abaixo.

[0128] Ptrc-cysMv F :

[0129] ggtgacaagaatcagttccgc (homóloga à seqüência de 2537262 a 2537282). (SEQ ID NO 19)

[0130] Ptrc-cysMv R :

[0131] GCGTTTATTCGTTGGTCTGC (homóloga à seqüência de 2537833 a 2537814). (SEQ ID NO 20)

[0132] A cepa resultante é chamada de MG1655 metA*11 Δ metJ J Ptrc-cysM::Km.

Construção de MG1655 metA*11 Δ metJ Ptrc-metF Ptrc-metH Ptrc-cysM:Km

[0133] Para a construção da cepa MG1655 metA*11 Δ metJ Ptrc-metF Ptrc-metH Ptrc-cysM:Km os cassetes de resistência à canamicina e a cloranfenicol foram eliminados da cepa MG1655 metA*11 Δ metJ:Cm Ptrc-metF:Km Ptrc-metH usando plasmídeo pCP20, como descrito acima. A cepa resultante foi chamada de MG1655 metA*11 Δ metJ Ptrc-metF Ptrc-metH.

[0134] Para transferir o construto de promotor Ptrc-cysM: Km para dentro de cepa MG1655 metA*11 Δ metJ Ptrc-metF Ptrc-metH, o método de transdução de fago P1 foi usado. O protocolo seguido foi implementado em duas etapas com a preparação do lisato de fago da cepa MG1655 MG1655 metA*11 Δ metJ Ptrc-cysM:Km e a subsequente transdução para dentro da cepa MG1655 metA*11 Δ metJ Ptrc-metF Ptrc-metH como descrito acima. A cepa resultante foi chamada de MG1655 metA*11 Δ metJ Ptrc-metF Ptrc-metH Ptrc-cysM:Km.

Combinação de expressão intensificada de cysE e metH e expressão otimizada de metF e cysM com alelos metA*11 e Δ metJ

[0135] Para a construção de as cepas MG1655 *metA*11 ΔmetJ::Cm* (pME101-*thrA*1*), MG1655 *metA*11 ΔmetJ::Cm Ptrc-metH:Km* (pME101-*thrA*1-cysE*), MG1655 *metA*11 ΔmetJ::Cm Ptrc-metH Ptrc-metF:Km* (pME101-*thrA*1-cysE*) e MG1655 *metA*11 ΔmetJ PtrcmetF Ptrc-metH Ptrc-cysM:Km* (pME101-*thrA*1-cysE*) o plasmídeos (pME101-*thrA*1*) ou (pME101-*thrA*1-cysE*) foram introduzidos nas cepas MG1655 *metA*11 ΔmetJ::Cm*, MG1655 *metA*11 ΔmetJ::Cm Ptrc-metH:Km*, MG1655 *metA*11 ΔmetJ::Cm Ptrc-metH Ptrc-metF:Km* e MG1655 *metA*11 ΔmetJ Ptrc-metF Ptrc-metH Ptrc-cysM:Km* por transformação.

Avaliação de cepas produtoras de metionina com expressão intensificada de *cysE*, *metH* e/ou *cysM* e/ou *metF* sob o controle de um promotor heterólogo

[0136] Cepas de produção foram inicialmente avaliadas em frascos Erlenmeyer pequenos. Uma pré-cultura foi crescida em meio LB com glicose 2,5 g/L e usada para inocular uma cultura noturna em meio mínimo PC1. Esta cultura serviu para inocular uma cultura de 50 mL para uma OD600 de 0,2 em meio PC1 suplementado com 0,01 g.L⁻¹ de vitamina B 12. Se indicado sulfato de amônio foi substituído por tiosulfato de amônio 5,6 g/L. Espectinomicina foi adicionada se necessário em uma concentração de 100 mg/L. Em uma OD600 de 4,5 to 5 aminoácidos extracelulares foram quantificados por HPLC após derivação com OPA/Fmoc e outros metabólitos relevantes foram analisados usando GC-MS após sililação.

Tabela I. Composição de meio mínimo PC1

Composto	Concentração
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0040 g.L ⁻¹
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0020 g.L ⁻¹
MnSO ₄ .H ₂ O	0,0200 g.L ⁻¹
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0080 g.L ⁻¹
H ₃ BO ₃	0,0010 g.L ⁻¹
Na ₂ MO ₄ .2H ₂ O	0,0004 g.L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,00 g.L ⁻¹
Ácido cítrico	6,00g.L ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,04 g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,00 g.L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	8,00 g.L ⁻¹
Na ₂ HPO ₄	2,00 g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ HPO ₄	8,00 g.L ⁻¹
NH ₄ Cl	0,13 g.L ⁻¹

NaOH 4M	Ajustado para pH 6,8
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,04 g.L ⁻¹
Tiamina	0,01 g.L ⁻¹
Glicose	5,00 g.L ⁻¹
Vitamina B12 (cianocobalamina)	0,01 g.L ⁻¹
Estreptomicina	0,2 g.L ⁻¹
MOPS	5,00 g.L ⁻¹

[0137] Como pode ser visto em tabela 2 a quantidade de metionina é aumentada sob sobreexpressão de *cysE*, *cysE* e *metH* ou *cysE*, *metH* e expressão alterada de *metF* juntas. Expressão intensificada de *cysM* pode adicionalmente aumentar a produção de metionina. Certas cepas produziram quantidades maiores de metionina na presença de tiosulfato. TA produção mais alta de metionina é obtida, quando *cysE*, *cysM* e *metH* são sobreexpressados e expressão de *metF* está sob o controle do promotor *P_{trc}* na presença de tiosulfato. Produção de isoleucina é dramaticamente reduzida sob expressão de *cysE* e *metH*, indicando atividade de γ -eliminação reduzida. Sobreexpressão de *cysM* reduz γ -eliminação em uma cepa sobreexpressando *cysE* e *metH* e expressando *metF* de um promotor heterólogo.

Tabela 2. Metionina e isoleucina em mmol/g DW produzidas em cultura em batelada com sulfato (S) ou tiosulfato (T) como fonte de enxofre por cepas descritas acima.

n.d., não determinado

Genótipo	metH (mmol/g DW) (S)	metH (mmol/g DW) (T)	iso (mmol/g DW) (S)	iso (mmol/g DW) (T)
MG1655 <i>metA</i> *11 Δ <i>metJ</i> (pME101- <i>thrA</i> *1)	0,55	0,68	0,28	0,32
MG1655 <i>metA</i> *11 Δ <i>metJ</i> (pME101- <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i>)	1,02	0,86	0,15	0,23
MG1655 <i>metA</i> *11 Δ <i>metJ</i> <i>P_{trc}</i> - <i>metH</i> : Km (pME 101- <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i>)	1,23	1,19	0,07	0,1
MG1655 <i>metA</i> *11 Δ <i>metJ</i> <i>P_{trc}</i> - <i>metH</i> <i>P_{trc}</i> - <i>metF</i> :Km (pME101- <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i>)	1,36	1,77	0,17	0,23
MG1655 <i>metA</i> *11 Δ <i>metJ</i> <i>P_{trc}</i> - <i>metH</i> <i>P_{trc}</i> - <i>metF</i> <i>P_{trc}</i> - <i>cysM</i> (pME101- <i>thrA</i> *1- <i>cysE</i>)	n,d,	2,04	n,d,	0,02

3. Determinação de mudanças em atividades enzimáticas de cysE e metH

[0138] Para validar as mudanças na expressão de cysE e expressão de metH, as atividades das enzimas correspondentes foram determinadas em extratos crus.

[0139] Para a determinação das atividades de enzima in vitro, cepas de E. coli foram cultivadas em meio mínimo como descrito acima e colhidas na fase de log média. Células foram ressuspensas em tampão fosfato de potássio frio e sonicadas sobre gelo (sonicador Branson, 70W). Após centrifugação, as proteínas contidas nos sobrenadantes foram quantificadas (Bradford, 1976).

[0140] Para a determinação de atividade de serina acetil-transferase (cysE) 10 µL de extrato foram ensaiados em fosfato de potássio 100 mM de pH 7,5, Acetil-CoA 4 mM, L-serina 30 mM por 10 minutos a 25°C. Proteína foi precipitada com acetona e O-acetil-serina foi detectada por GC-MS após derivação com um reagente de sililação.

[0141] Para a determinação de atividade de metionina sintase (metH) dependente de vitamina B12, 100 µL de extrato foram ensaiados em fosfato de potássio 100 mM pH 7,2, homocisteína 1 mM, metil-tetra-hidro-folato 0,25 mM, vitamina B12 50 µM, S-adenosil-metionina 20 µM e DTT 25 mM por 10 minutos a 37°C. Proteína foi precipitada com acetona e a metionina produzida foi detectada por GC-MS após derivação com um reagente de sililação.

[0142] Como pode ser visto na tabela 3 sobreexpressão dos genes cysE e metH aumenta a atividade de enzima correspondente. Assim a atividade aumentada destes genes leva à produção aumentada de metionina.

Tabela 3. Atividades em mUI/g DW de serina acetil-transferase (cysE) e metionina sintase (metH) em cepas produtoras de metionina cultivadas na presença de tiosulfato.

Genótipo	cysE	met H
MG1655 metA*11 ΔmetJ (pME101-thrA*1)	65	3,2
MG1655 metA*11 ΔmetJ (pMEI01-thrA*1-cysE)	453	1,2
MG1655 metA*11 ΔmetJ Ptrc-metH (pME101-thrA*1-cysE)	475	12
MG1655 metA*11 ΔmetJ Ptrc-metH Ptrc-metF:Km (pME101-thrA*1-cysE)	292	6,8

Validação de produção de metionina sob condições de fermentação

[0143] Cepas que produziram quantidades substanciais de metabólitos de interesse foram subsequentemente testadas sob condições de produção em fermentadores de 300 mL (DASGIP) usando um protocolo de batelada alimentada.

[0144] Para este propósito uma cultura de 8 horas crescida em meio LB com glicose 2,5 g/L foi usada para inocular uma pré-cultura noturna em meio mínimo PC1 (veja acima). Fermentadores foram cheios com 150 mL de meio mínimo (B1) e inoculados para uma concentração de biomassa de quase 0,09 g/L com 1,5 mL de pré-cultura concentrada (entre 9 e 12 g/L).

Tabela 4. Composição de meio mínimo B1

Composto	Concentração
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0040 g.L ⁻¹
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0020 g. L ⁻¹
MnSO ₄ .H ₂ O	0,0200 g. L ⁻¹
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0080 g. L ⁻¹
H ₃ BO ₃	0,0010 g. L ⁻¹
Na ₂ MO ₄ .2H ₂ O	0,0004 g. L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,00 g. L ⁻¹
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,08 g. L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,00 g. L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	8,00 g. L ⁻¹
Na ₂ HPO ₄	2,00 g. L ⁻¹
(NH ₄) ₂ HPO ₄	8,00 g. L ⁻¹
NH ₄ Cl	0,13 g. L ⁻¹
Ácido cítrico	6,00 g.L ⁻¹
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,04 g. L ⁻¹
Tiamina	0,01 g. L ⁻¹
Glicose	5,00 g. L ⁻¹
PPG	0,4 mL. L ⁻¹
Estreptomomicina	0,2 g.L ⁻¹
Vitamina (cianocobalamina)	B12 0,01 g. L ⁻¹
NaOH 4M	Ajustado para pH 6,8

Tabela 5. Meio mínimo de tipo FB de tipo T1

Composto	Concentração
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0040 g.L ⁻¹

CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0020 g.L ⁻¹
MnSO ₄ .H ₂ O	0,0200 g.L ⁻¹
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0080 g.L ⁻¹
H ₃ BO ₃	0,0010 g.L ⁻¹
Na ₂ MO ₄ .2H ₂ O	0.0004 g.L ⁻¹
MgSO ₄	5,00 g.L ⁻¹
Ácido cítrico	6,00 g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	8,32 g.L ⁻¹
Na ₂ SO ₄	8,95 g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₃	22,32 g.L ⁻¹
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,04 g.L ⁻¹
Tiamina	0,01 g.L ⁻¹
Glicose	500 g.L ⁻¹
Estreptomicona	0,2 g.L ⁻¹
Vitamina B12 (Cianocobalamina)	0,01 g.L ⁻¹
NH ₄ OH 28%	Ajustado para pH 6,0 antes da adição de tiossulfato

Tabela 6. Meio mínimo FB tipo S

Composto	Concentração
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0040 g.L ⁻¹
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0020 g.L ⁻¹
MnSO ₄ .H ₂ O	0,0200 g.L ⁻¹
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0080 g.L ⁻¹
H ₃ BO ₃	0,0010 g.L ⁻¹
Na ₂ MO ₄ .2H ₂ O	0,0004 g.L ⁻¹
MgSO ₄	5,00 g.L ⁻¹
Ácido cítrico	6,00 g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	20,0 g.L ⁻¹
Na ₂ SO ₄	10,0 g.L ⁻¹
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,04 g.L ⁻¹
Tiamina	0,01 g.L ⁻¹
Glicose	500 g.L ⁻¹
Estreptomicona	0,2 g.L ⁻¹
Vitamina B12 (Cianocobalamina)	0,01 g.L ⁻¹
NH ₄ OH 28%	Ajustado para pH 6,8

[0145] A temperatura da cultura foi mantida constante em 37°C e o pH foi permanentemente ajustado para valores entre 6,5 e 8, preferencialmente 6,7 usando uma solução de NH₄OH. A velocidade de agitação foi mantida em 600 rpm durante a fase de batelada e foi aumentada para até 1.000 rpm no final da fase de batelada

alimentada. A concentração de oxigênio dissolvido foi mantida em valores entre 20 e 40%, preferencialmente saturação de 30% pelo uso de um controlador de gás. Quando a massa celular alcançou uma concentração de 0,9 a 1,2 g/L a batelada alimentada foi iniciada com uma vazão de fluxo inicial 0,1 e 1,5 mL/h, preferencialmente 0,43 mL/h e um aumento sigmoidal (24 h) para até valores e vazão de fluxo entre 0,5 e 5,8 mL/h, preferencialmente 1,7 mL/h. As condições de alimentação precisa foram calculadas pela fórmula abaixo:

$$Q(t) = p1 + \frac{p2}{1 + e^{-p3(t-p4)}}$$

[0146] onde Q(t) é a vazão de fluxo de alimentação em mL/h para um volume de batelada de 150 mL

[0147] P1 está entre 0,025 e 0,35, preferencialmente 0,100.

[0148] P2 está entre 0,400 e 5,600, preferencialmente 1,600.

[0149] P3 está entre 0,068 e 0,95, preferencialmente 0,270.

[0150] P4 está entre 1,250 e 17,5, preferencialmente 5,000.

[0151] Neste caso meio FB contendo glicose em concentrações entre 300 e 800 g/L (preferencialmente 500g/L) foi usado.

[0152] Quando a concentração de biomassa alcançou valores entre 20 e 50 g/L (preferencialmente 35g/L, entre 40 e 80 h) a fermentação foi interrompida e as concentrações de metionina e isoleucina extracelulares foram determinadas usando HPLC.

Tabela 7. Títulos de metionina obtidos em fermentações de batelada alimentada de cepas sobreexpressando cysE, e metH ou metF sob um promotor heterólogo ou uma combinação dos três. Ref corresponde a MG1655 metA*11 ΔmetJ. Cepas foram crescidas na presença de tiosulfato (T) ou sulfato (S).

Genótipo	Tiosulfato / sulfato	met (mM)	Iso (mM)
Ref + (pME101-thrA* I)	S	70 mM	25 mM
Ref + (pME 101-thrA* I)	T	94 mM	35 mM
Ref + (pME 101-thrA* I-cysE)	S	74 mM	2mM
Ref + (pME 101-thrA* I-cysE)	T	101 mM	0 mM

Ref+ Ptrc-metH Ptrc-metF:Km (pME101-thrA*1- cysE)	T	121 mM	1 mM
---	---	--------	------

[0153] Como pode ser visto em tabela 7, expressão intensificada de cysE, cysE e metH, cysE, metH e metF sob o controle de um promotor heterólogo ou crescimento das cepas na presença de tiosulfato pode significativamente aumentar a produção de metionina. Produção de isoleucina é significativamente reduzida pela sobreexpressão de cysE e/ou metH.

[0154] A cepa que produziu a quantidade mais alta de metionina no fermentador de 300 mL foi subsequentemente testada sob as condições de produção em um fermentador de 2,5 L (PIERRE GUERIN) usando um protocolo de batelada alimentada.

[0155] Para este propósito cultura de 8 h crescida em meio LB com glicose 2,5 g/L foi usada para inocular uma pré-cultura noturna em meio mínimo PC1. Fermentadores foram cheios com 600 mL de meio mínimo (B2) e inoculados para uma biomassa de 0,9 g/L com 6 mL pré-cultura concentrada (entre 9 e 12 g/L).

[0156] A temperatura da cultura foi mantida constante em 37°C e o pH foi permanentemente ajustado para valores entre 6,3 e 8, preferencialmente 6,8 usando uma solução de NH₄OH 28%. A velocidade de agitação inicial foi ajustada em 200 rpm durante a fase de batelada e foi aumentada para até 1.200 rpm durante a fase de batelada alimentada. A vazão de fluxo de ar inicial foi ajustada em 40NL/h durante a fase de batelada e foi aumentada para até 250NL/h durante a fase de batelada alimentada. A concentração de oxigênio dissolvido foi mantida em valores entre 20 e 40% de saturação, preferencialmente 30% pelo aumento da velocidade de agitação e da vazão de fluxo de ar. Quando a concentração de biomassa alcançou 1,2 a 1,5 g/L, a batelada alimentada foi iniciada com uma vazão de fluxo inicial entre 0,5 e 4 mL/h, preferencialmente 1,0 mL/h e um aumento exponencial (15 h) para até valores de vazão de fluxo entre 3 e 35 mL/h, preferencialmente 20,1 mL/h. Neste ponto, a vazão de fluxo de vazão foi mantida constante por 10 a 45 horas, preferencialmente 30 h. Para a alimentação FB tipo T2 foi usada (veja tabela 8) contendo glicose em concentrações entre 300 e 800 g/L, preferencialmente 750

g/L.

[0157] Quando a concentração de biomassa alcançou valores entre 40 e 110 g/L, preferencialmente 90g/L a fermentação foi interrompida e a concentração de metionina extracelular concentração foi determinada usando HPLC. A cepa MG1655 metA*11 Δ metJ Ptrc-metH Ptrc-metF (pME101thrA*1-cysE) produziu metionina 169 mM sob estas condições.

Tabela 8. Meio mínimo FB T2

Composto	Concentração
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0040 g.L ⁻¹
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0020 g.L ⁻¹
MnSO ₄ .H ₂ O	0,0200 g.L ⁻¹
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0080 g.L ⁻¹
H ₃ BO ₃	0,0010 g.L ⁻¹
Na ₂ MO ₄ .2H ₂ O	0,0004 g.L ⁻¹
MgSO ₄	5,00 g.L ⁻¹
Ácido cítrico	6,00 g.L ⁻¹
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	3,93 g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,54 g.L ⁻¹
Na ₂ SO ₄	5,96 g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₃	33,48 g.L ⁻¹
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,04 g.L ⁻¹
Tiamina	0,01 g.L ⁻¹
Glicose	750 g.L ⁻¹
Estreptomicina	0,2 g.L ⁻¹
Vitamina B12 (Cianocobalamina)	0,01 g.L ⁻¹
NH ₄ OH 28%	Ajustado para pH 6,0 antes de adição de tiosulfato

Tabela 9. Composição de meio mínimo B2

Composto	Concentração
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0040 g.L ⁻¹
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,0020 g.L ⁻¹
MnSO ₄ .H ₂ O	0,0200 g.L ⁻¹
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0080 g.L ⁻¹
H ₃ BO ₃	0,0010 g.L ⁻¹
Na ₂ MO ₄ .2H ₂ O	0,0004 g.L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,00 g.L ⁻¹
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,16 g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,00 g.L ⁻¹

K_2HPO_4		15,00 g.L ⁻¹
Na_2HPO_4		2,00 g.L ⁻¹
$(NH_4)_2HPO_4$		8,00 g.L ⁻¹
NH_4Cl		0,13 g.L ⁻¹
Ácido cítrico		6,00g.L ⁻¹
$FeSO_4, 7H_2O$		0,04 g.L ⁻¹
Tiamina		0,01 g.L ⁻¹
Glicose		5,00 g.L ⁻¹
PPG		0,4 mL.L ⁻¹
Estreptomicina		0,2g.L ⁻¹
Vitamina (cianocobalamina)	B12	0,01 g.L ⁻¹
NaOH 4M		Ajustado para pH 6,8

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a produção de metionina pelo cultivo de um microorganismo em um meio de cultura apropriado compreendendo uma fonte de carbono e uma fonte de enxofre e recuperação de metionina do meio de cultura, caracterizado pelo fato de que o microorganismo é E. coli e em que a expressão do gene cysE envolvido na produção de cisteína é aumentada no microorganismo, e a expressão do gene methH, que está envolvido na produção de unidades C1 e o potencial de transferência para homocisteína, é aumentada e/ou conduzida por um promotor heterólogo, e alelos de homo-serina succinil-transferase (MetA) codificadores de enzimas com sensibilidade de retro-alimentação reduzida à S-adenosil-metionina e/ou metionina é/são integrados no dito microorganismo, em que o aumento da expressão dos genes neste contexto descreve o aumento na atividade intracelular de uma atividade enzimática que é codificada pelo correspondente DNA, como pelo aumento do número de cópias do gene, usando um promotor forte ou usando um alelo com atividade aumentada e possivelmente combinando estas medidas.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pelo menos um gene, que está envolvido na produção de unidades C1 e/ou no potencial de transferência para homocisteína, é selecionado do gene methH.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a expressão de methH é aumentada e/ou o gene é expressado de um promotor heterólogo, em que o aumento da expressão dos genes neste contexto descreve o aumento na atividade intracelular de uma atividade enzimática que é codificada pelo correspondente DNA, como pelo aumento do número de cópias do gene, usando um promotor forte ou usando um alelo com atividade aumentada e possivelmente combinando estas medidas.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que é aumentada a expressão de genes adicionais envolvidos na produção de metionina, em que o aumento da expressão dos genes neste contexto descreve o aumento na atividade intracelular de uma atividade

enzimática que é codificada pelo correspondente DNA, como pelo aumento do número de cópias do gene, usando um promotor forte ou usando um alelo com atividade aumentada e possivelmente combinando estas medidas.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o repressor de metionina codificado pelo gene metJ é deletado.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a fonte de enxofre no meio de cultura é sulfato, tiosulfato, sulfeto de hidrogênio, ditionato, ditionito, sulfito ou uma combinação de fontes diferentes.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a fonte de enxofre no meio de cultura é sulfato ou tiosulfato, ou uma mistura dos dois.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de compreender a etapa de isolamento dos constituintes/aminoácidos desejados do caldo de fermentação e/ou da biomassa opcionalmente permanecendo em porções ou na quantidade total (0-100%) no produto final.

9. Microorganismo usado para a produção fermentativa de metionina no qual a produção de metionina, caracterizado pelo fato de que o microorganismo é E. coli e em que a expressão do gene cysE envolvido na produção de cisteína é aumentado no microorganismo, a expressão do gene metH, que é envolvido na produção de unidades C1 e no potencial de transferência para homocisteína, é aumentado e/ou conduzida por um promotor heterólogo, e alelos de homo-serina succinil-transferase (MetA) codificadores de enzimas com sensibilidade de retro-alimentação reduzida à S-adenosil-metionina e/ou metionina é/são integrados no microorganismo, em que o aumento da expressão dos genes neste contexto descreve o aumento na atividade intracelular de uma atividade enzimática que é codificada pelo correspondente DNA, como pelo aumento do número de cópias do gene, usando um promotor forte ou usando um alelo com atividade aumentada e

possivelmente combinando estas medidas.

10. Microorganismo, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que pelo menos um gene, que está envolvido na produção de unidades C1 e/ou no potencial de transferência para homocisteína, é selecionado do gene metH.

11. Microorganismo, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a expressão de metH é aumentada e/ou o gene é expressado de um promotor heterólogo, em que o aumento da expressão dos genes neste contexto descreve o aumento na atividade intracelular de uma atividade enzimática que é codificada pelo correspondente DNA, como pelo aumento do número de cópias do gene, usando um promotor forte ou usando um alelo com atividade aumentada e possivelmente combinando estas medidas.

12. Microorganismo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 11, caracterizado pelo fato de que a expressão de genes adicionais envolvidos na produção de metionina é aumentada, em que o aumento da expressão dos genes neste contexto descreve o aumento na atividade intracelular de uma atividade enzimática que é codificada pelo correspondente DNA, como pelo aumento do número de cópias do gene, usando um promotor forte ou usando um alelo com atividade aumentada e possivelmente combinando estas medidas.

13. Microorganismo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 12, caracterizado pelo fato de que o repressor de metionina codificado pelo gene metJ é deletado.