



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

(21) BR 112019015309-8 A2



(22) Data do Depósito: 26/01/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 19/05/2020

(54) Título: MÉTODOS E MICRORGANISMOS PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO E/OU ÁCIDO GLIOXÍLICO

(51) Int. Cl.: C12P 7/24; C12P 7/42; C12N 9/88.

(30) Prioridade Unionista: 26/01/2017 EP 17305084.0.

(71) Depositante(es): METABOLIC EXPLORER.

(72) Inventor(es): WANDA DISCHERT; GWENAËLLE CORRE; PHILIPPE SOUCAILLE.

(86) Pedido PCT: PCT EP2018051919 de 26/01/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/138240 de 02/08/2018

(85) Data da Fase Nacional: 25/07/2019

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a métodos e microrganismos recombinantes úteis para a produção de ácido glicólico e/ou ácido glioxílico. Os métodos da invenção envolvem ou apenas uma etapa de fermentação dos microrganismos modificados da invenção ou uma etapa de fermentação dos microrganismos modificados da invenção e uma etapa de conversão ou biológica ou química do ácido glicólico ou do ácido glioxílico, o microrganismo da invenção que superexpressa um gene de fosfocetolase.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para: **"MÉTODOS E MICRORGANISMOS PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO E/OU ÁCIDO GLIOXÍLICO"**

CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] A presente invenção refere-se a métodos e microrganismos recombinantes úteis para a produção de ácido glicólico e/ou ácido glioxílico. Os microrganismos da invenção são modificados de uma maneira que o rendimento de ácido glicólico e/ou ácido glioxílico com fonte de carbono é aumentado pela superexpressão da atividade da fosfocetolase. Os métodos da invenção envolvem ou apenas uma etapa de fermentação dos microrganismos modificados da invenção ou uma etapa de fermentação dos microrganismos modificados da invenção e uma etapa de conversão ou biológica ou química do ácido glicólico ou do ácido glioxílico.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] Ácidos carboxílicos são compostos orgânicos que contêm pelo menos um grupo carboxila. Os ácidos carboxílicos ocorrem amplamente e incluem os aminoácidos (que compõem as proteínas) e o ácido acético (que é parte do vinagre e ocorre no metabolismo), por exemplo. Ácidos carboxílicos são usados na produção de polímeros, produtos farmacêuticos, solventes e aditivos alimentícios. Ácidos carboxílicos industrialmente importantes incluem ácido acético (componente de vinagre, precursor de solventes e

revestimentos), ácidos acrílico e metacrílico (precursores de polímeros, adesivos), ácido adípico (polímeros), ácido cítrico (bebidas), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (agente quelante), ácidos graxos (revestimentos), ácido maleico (polímeros), ácido propiônico (conservante alimentício), ácido tereftálico (polímeros), ácido butírico (aditivo alimentício), ácido succínico (aditivo alimentício, polímeros).

[0003] Ácido glicólico (HOCH_2COOH , Número CAS: 79-14-1), ou glicolato como sua base conjugada, é o membro mais simples da família dos ácidos alfa-hidroxicarboxílicos dos ácidos carboxílicos. O ácido glicólico tem uma funcionalidade dual tanto com grupos funcionais álcool como ácidos moderadamente fortes em uma molécula muito pequena. Suas propriedades fazem com que ele seja ideal em um amplo espectro de aplicações industriais e de consumo, incluindo uso na reabilitação de poços de água, indústria de couro, indústria de petróleo e gás, lavanderia e indústria têxtil, produtos de limpeza e como componente em produtos de cuidados pessoais. Pode também ser usado para produzir uma variedade de materiais poliméricos, incluindo resinas termoplásticas compreendendo ácido poliglicólico, os quais têm excelentes propriedades como barreira para gases e, assim, podem ser usados para fazer materiais de embalagem com as mesmas propriedades (por exemplo, recipientes de bebidas etc.). Os

polímeros de poliéster gradualmente hidrolisam-se em ambientes aquosos em velocidades controláveis. Esta propriedade faz com que elas sejam úteis em aplicações biomédicas, como suturas dissolúveis e em aplicações nas quais é necessária uma liberação controlada de ácido para se reduzir o pH. Atualmente, são consumidas anualmente em todo o mundo mais de 50.000 toneladas de ácido glicólico.

[0004] Embora o ácido glicólico ocorra naturalmente como componente traço na cana-de-açúcar, beterraba, uva e em frutas, ele é produzido principalmente por via sintética. São descritas na literatura ou em pedidos de patente outras tecnologias para produzir ácido glicólico. Por exemplo, os pedidos de patente EP 2025759 e EP 2025760 descrevem um método para produzir o referido ácido hidroxicarboxílico a partir de álcool poli-hídrico alifático com um grupo hidroxila na porção final usando-se um microrganismo. Este método é uma bioconversão, assim como o descrito por Michihiko Kataoka no artigo sobre a produção de ácido glicólico usando-se microrganismos que oxidam etilenoglicol (Kataoka *et al.*, 2001). O ácido glicólico também é produzido por bioconversão de glicolonitrila usando-se nitrilases mutantes com atividade nitrilase melhorada e essa técnica foi divulgada nos pedidos de patente WO 2006/069110, WO 2009/059104 e WO 2009/059096, ou por bioconversão a partir de etilenoglicol, glicolaldeído ou glioxal conforme

divulgado nos pedidos de patentes JP 2007/228927 ou WO 2005/106005. Os métodos e microrganismos para produzir ácido glicólico por fermentação a partir de recursos renováveis em que carboidratos são convertidos em ácido glicólico por uma etapa direta de fermentação foram divulgados nos pedidos de patente WO 2007/141316, WO 2010/108909, WO 2011/036213, WO 2011/157728, WO 2012/025780, CN105647844A, CN106011185A, e WO 2016/079440 para métodos que usam cepas de *Escherichia coli*, e nos documentos WO 2013/050659, WO 2014/162063 e WO 2016/193540 que usam cepas de *Saccharomyces cerevisiae* ou *Kluyveromyces lactis*.

[0005] Ácido glioxílico ou ácido oxoacético (HCOCOOH, Número CAS: 298-12-4) ou glioxilato, como sua base conjugada, é um ácido carboxílico C2. O ácido glioxílico é um intermediário do ciclo glioxilato, o qual permite que organismos, como bactérias, fungos e plantas, convertam ácidos graxos em carboidratos. O glioxilato é o subproduto do processo de amidação na biossíntese de vários peptídeos amidados. É um sólido incolor que de ocorrência natural e é útil industrialmente. É usado como um agente de limpeza em uma variedade de aplicações industriais, como matéria-prima de produtos químicos especiais e de copolímeros biodegradáveis e como ingrediente de cosméticos. É um composto útil para produtos químicos agrícolas e farmacêuticos. De fato, o ácido glioxílico pode ser usado na

indústria farmacêutica, pois sua condensação com fenois resulta em ácido 4-hidroximandélico, o qual reage com amônia resultando em hidroxifenilglicina, um precursor da droga amoxicilina, ou o qual pode ser reduzido resultando em ácido 4-hidroxifenilacético, um precursor da droga atenolol. Além disso, a reação catalisada por ácido do ácido glioxílico com ureia leva à produção de alantoína, usada em cosméticos, pomadas e no tratamento de alguns cânceres (Cativiela *et al.*, 2003). Por fim, a condensação com guaiacol no lugar do fenol proporciona uma rota para a vanilina, usada como agente aromatizante em alimentos, bebidas e produtos farmacêuticos.

[0006] Embora o ácido glioxílico ocorra naturalmente como componente traço em frutas não maduras e em folhas verdes jovens, ele é produzido principalmente por via sintética. São descritas na literatura ou em pedidos de patente outras tecnologias para produzir ácido glioxílico. Por exemplo, o ácido glioxílico pode ser quimicamente produzido por aquecimento do ácido dibromoacético com um pouco de água ou por redução eletrolítica do ácido oxálico ou por oxidação nítrica do glioxal. Alguns pedidos de patente descrevem processos de produção de ácido glioxílico por bioconversão, tais como os pedidos de patentes WO 1993/14214, US 5.439.813 e WO 1994/28155 que divulgam a bioconversão a partir do ácido glicólico usando-se glicolato oxidase produzida por um microrganismo, assim como Isobe & Nishise.

(1999). O pedido de patente US 2007/0026510 divulga a bioconversão a partir do glioxal usando-se uma aldeído oxidase.

[0007] O interesse industrial no ácido glicólico e no ácido glioxílico, juntamente com as preocupações ambientais devido aos subprodutos químicos formados durante as produções químicas, fazem com que a produção microbiana de tais ácidos carboxílicos seja uma perspectiva atraente.

[0008] Os inventores identificaram novos métodos para a produção de ácido glicólico e/ou ácido glioxílico a partir de carboidratos como única fonte de carbono envolvendo pelo menos uma etapa fermentativa e um microrganismo modificado em que a atividade da fosfocetolase esteja melhorada.

[0009] A atividade da fosfocetolase e os genes que codificam enzimas com tais atividades são conhecidas na técnica (Papini *et al.*, 2012). Duas atividades diferentes de fosfocetolase foram relatadas em bactérias. A xilulose 5-fosfato fosfocetolase catalisa a conversão de xilulose 5-fosfato em gliceraldeído 3-fosfato e acetilfosfato, que consome fosfato, com liberação de água. A xilulose 5-fosfato fosfocetolase é, por exemplo, codificada pelo gene *xpkA* de *Lactobacillus pentosus* (Posthuma *et al.*, 2002). A frutose 6-fosfato fosfocetolase catalisa a conversão de frutose 6-fosfato em eritrose 4-fosfato e acetilfosfato, que consome

fosfato, com liberação de água. Poucos genes codificam fosfocetolases que têm tanto atividade xilulose 5-fosfato-fosfocetolase como frutose 6-fosfato fosfocetolase, como, por exemplo, é o caso da proteína codificada pelo gene *xfp* de *Bifidobacterium lactis* (Meile et al., 2001) ou *Bifidobacterium animalis* (WO 2006/016705 e WO 2016/044713).

[0010] O uso de fosfocetolase para a produção de metabólitos de interesse já é conhecido e foi divulgado nos pedidos de patente WO 2006/016705 e no documento WO 2016/044713. Os metabólitos de interesse são o ácido glutâmico, glutamina, prolina, arginina, leucina, cisteína, succinato, poli-hidrobutirato e 1,4-butanodiol. O uso de fosfocetolase para a produção de ácido glicólico ou ácido glioxílico nunca foi divulgado.

[0011] Os métodos e os microrganismos da invenção são novos em relação à técnica anterior, uma vez que o uso de fosfocetolase para a produção de ácido glicólico e/ou ácido glioxílico nunca foi divulgado anteriormente. Surpreendentemente, os inventores descobriram que a superprodução de fosfocetolase nos microrganismos da invenção melhora a produção de ácido glicólico e/ou de ácido glioxílico.

[0012] Os métodos identificados pelos inventores envolvem ou apenas uma etapa de fermentação dos microrganismos modificados da invenção ou uma etapa de

fermentação dos microrganismos modificados da invenção e uma etapa de conversão ou biológica ou química do ácido glicólico ou do ácido glioxílico.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0013] A invenção refere-se a microrganismos recombinantes e métodos para melhorar a produção de ácido glicólico e/ou ácido glioxílico a partir de carboidratos como única fonte de carbono e usando-se pelo menos uma etapa de fermentação e um microrganismo modificado em que a expressão de pelo menos um gene escolhido entre *aceB*, *glcB*, *gcl* e *eda* esteja atenuada e que a expressão de um gene que codifica a xilulose 5-fosfato fosfocetolase e/ou a frutose 6-fosfato fosfocetolase esteja aumentada. Preferencialmente, o gene que codifica a foscoetolase é escolhido dentre o gene *xpkA* de *Lactobacillus pentosus*, o gene *xfp* de *Bifidobacterium animalis*, ou o gene *xfp* de *Bifidobacterium lactis*, ou seus genes homólogos.

[0014] Os métodos identificados pelos inventores envolvem ou apenas uma etapa de fermentação dos microrganismos modificados da invenção para a produção de ácido glicólico ou ácido glioxílico ou uma etapa de fermentação dos microrganismos modificados da invenção para a produção dos intermediários correspondentes de ácido glicólico ou ácido glioxílico e uma etapa de conversão ou biológica ou química dos intermediários de ácido glicólico

ou ácido glioxílico em ácido glioxílico e ácido glicólico, respectivamente.

[0015] Outro método da invenção refere-se à produção de ácido glioxílico a partir de glicina usando-se uma glicina oxidase e, opcionalmente, uma catalase.

[0016] Os microrganismos da invenção são escolhidos dentre bactérias tais como *Enterobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Lactobacillaceae* ou levedura. Mais preferencialmente, os microrganismos da invenção são da espécie *Escherichia coli*.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0017] Antes de descrever a presente invenção em detalhe, deve-se entender que esta invenção não está limitada a métodos particularmente exemplificados e pode, evidentemente, variar. Também se deve entender que a terminologia aqui usada se destina a descrever modalidades particulares da invenção apenas, não se pretendendo que seja limitativa, a qual será limitada apenas pelas reivindicações anexas.

[0018] Todas as publicações, patentes e pedidos de patente aqui supra- ou infracitados são aqui incorporados por referência na sua totalidade.

[0019] Além disso, a prática da presente invenção emprega, salvo indicação em contrário, técnicas

convencionais de microbiologia e biologia molecular dentro da especialidade da técnica. Tais técnicas são bem conhecidas dos especialistas e são explicadas por completo na literatura.

[0020] Deve-se notar que, como aqui usadas e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um", "uma", "o" e "a" também incluem referência plural, a menos que o contexto dite claramente o contrário. Assim, por exemplo, uma referência a "um microrganismo" inclui uma pluralidade de tais microrganismos e uma referência a "um gene endógeno" é uma referência a um ou mais genes endógenos, e assim por diante. Salvo definição em contrário, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm os mesmos significados que normalmente são entendidos por um especialista na técnica à qual esta invenção pertence. Embora quaisquer materiais e métodos similares ou equivalentes aos aqui descritos possam ser usados para praticar ou testar a presente invenção, os materiais e métodos preferidos são agora descritos.

[0021] Nas reivindicações que se seguem e na descrição consecutiva da invenção, exceto quando o contexto exija de outro modo devido à linguagem expressa ou implicação necessária, as palavras "compreender", "conter", "envolver" ou "incluir" ou variações tais como "compreende", "que compreende", "compreendendo", "que contém", "contendo", "envolvido", "inclui", "que inclui", "incluindo" são usadas

em sentido inclusivo, isto é, para especificar a presença das características declaradas, mas não para impedir a presença ou adição de características adicionais em várias modalidades da invenção.

[0022] A invenção refere-se a microrganismos recombinantes e métodos úteis para melhorar a produção de ácido glicólico e/ou ácido glioxílico. Os métodos identificados pelos inventores envolvem ou apenas uma etapa de fermentação dos microrganismos modificados da invenção para a produção de ácido glicólico ou ácido glioxílico ou uma etapa de fermentação dos microrganismos modificados da invenção para a produção dos intermediários correspondentes de ácido glicólico ou ácido glioxílico e uma etapa de bioconversão dos intermediários em ácido glioxílico e ácido glicólico, respectivamente.

[0023] O termo "ácido glicólico" designa o ácido carboxílico com fórmula química HOCH_2COOH , e Número CAS 79-14-1.

[0024] O termo "ácido glioxílico" designa o ácido carboxílico com a fórmula química HCOCOOH e o Número CAS: 298-12-4.

[0025] O termo "microrganismo", tal como aqui usado, refere-se a uma bactéria, levedura ou fungo que não é artificialmente modificado. Preferencialmente, o microrganismo é selecionado entre *Enterobacteriaceae*,

Clostridiaceae, *Corynebacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Lactobacillaceae* ou levedura. Mais preferencialmente, o microrganismo é uma espécie de *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Kluyveromyces* or *Saccharomyces* Mais preferencialmente, os microrganismos da invenção são da espécie *Escherichia coli*.

[0026] Os termos "microrganismo recombinante" ou "microrganismo geneticamente modificado", tais como aqui usados, referem-se a uma bactéria, levedura ou fungo que não é encontrado na natureza e é geneticamente diferente do seu equivalente encontrado na natureza. Significa que ele é modificado quer por introdução, quer por deleção, quer por modificação de elementos genéticos. Ele pode também ser transformado ao se forcarem o desenvolvimento e a evolução de novas vias metabólicas combinando-se mutagênese dirigida e evolução sob pressão de seleção específica (vide, por exemplo, WO 2004/076659 ou WO 2007/011939).

[0027] Pode-se modificar um microrganismo para que expresse genes exógenos se estes genes forem introduzidos no microrganismo com todos os elementos que permitam a sua expressão no microrganismo hospedeiro. A modificação ou "transformação" de microrganismos com DNA exógeno é uma tarefa de rotina para os especialistas na técnica.

[0028] Um microrganismo pode ser modificado para

modular o nível de expressão de um gene endógeno.

[0029] O termo "gene endógeno" significa que o gene estava presente no microrganismo antes de qualquer modificação genética. Os genes endógenos podem ser superexpressos introduzindo-se sequências heterólogas em adição a ou para substituir elementos reguladores endógenos ou introduzindo-se uma ou mais cópias suplementares do gene no cromossomo ou em um plasmídeo. Os genes endógenos também podem ser modificados para modular a sua expressão e a atividade da proteína codificada correspondente. Por exemplo, podem ser introduzidas mutações na sequência codificante para modificar o produto gênico ou podem ser introduzidas sequências heterólogas em adição a ou para substituir elementos regulatórios endógenos. A modulação de um gene endógeno pode resultar na regulação positiva ("up-regulation") e/ou na intensificação da atividade do produto gênico ou, alternativamente, regular negativamente ("down regulate") e/ou diminuir a atividade do produto gênico endógeno.

[0030] Uma outra forma de modular a sua expressão é trocar o promotor endógeno de um gene (por exemplo, o promotor tipo selvagem) por um promotor mais forte ou mais fraco para regular positiva ou negativamente ("up or down regulate") a expressão do gene endógeno. Estes promotores podem ser homólogos ou heterólogos. Selecionar promotores

apropriados está bem dentro da capacidade do especialista na técnica.

[0031] De modo contrário, "gene exógeno" significa que o gene foi introduzido em um microrganismo por meios bem conhecidos pelos especialistas na técnica, ao passo que este gene não ocorre naturalmente no microrganismo. Genes exógenos podem ser integrados no cromossomo do hospedeiro ou podem ser expressos extracromossomicamente por plasmídeos ou vetores. Uma variedade de plasmídeos, os quais diferem em relação à sua origem de replicação e ao seu número de cópias na célula, são bem conhecidos na técnica. Estes genes podem ser homólogos.

[0032] No contexto da invenção, o termo "gene homólogo" não se limita a designar genes que têm um antepassado genético comum teórico, mas inclui genes os quais podem ser geneticamente não relacionados que, contudo, evoluíram para codificar proteínas que desempenham funções similares e/ou têm estrutura similar. Portanto, o termo "homólogo funcional", para o propósito da presente invenção, refere-se ao fato de uma determinada atividade enzimática poder ser proporcionada não apenas por uma proteína específica de sequência de aminoácidos definida, mas também por proteínas de sequência similar provenientes de outros microrganismos (não) relacionados.

[0033] Usando-se as referências dadas no Genbank

para genes conhecidos, os especialistas na técnica são capazes de determinar os genes equivalentes em outros organismos, cepas bacterianas, leveduras, fungos, mamíferos, plantas etc. Este trabalho de rotina é vantajosamente feito usando-se sequências consenso que podem ser determinadas realizando-se alinhamentos de sequências com genes derivados de outros microrganismos e do desenho de sondas degeneradas para clonar o gene correspondente em um outro organismo. Estes métodos de rotina de biologia molecular são bem conhecidos dos especialistas na técnica.

[0034] Os termos "produção de ácido glicólico e/ou de ácido glioxílico melhorada", "melhorar a produção de ácido glicólico e/ou de ácido glioxílico" e seus equivalentes gramaticais, como aqui usados, referem-se a uma relação aumentada de ácido glicólico e/ou ácido glioxílico/fonte de carbono (razão entre grama/mol de ácido glicólico e/ou ácido glioxílico produzido por grama/mol fonte de carbono consumida que pode ser expressa em porcentagem). Os métodos para determinar a quantidade de fonte de carbono consumida e de ácido glicólico e/ou ácido glioxílico produzida são bem conhecidos dos especialistas na técnica. O rendimento é mais alto no microrganismo recombinante em comparação com o microrganismo não modificado correspondente.

[0035] Os termos "microrganismo otimizado quanto à produção fermentativa de ácido glicólico e/ou ácido

glioilico" referem-se a microrganismos evoluídos e/ou geneticamente modificados de modo a apresentar uma produão melhorada de ácido glicólico e/ou ácido glioilico em comparação com a produão endógena dos microrganismos tipo selvagem correspondentes. Tais microrganismos "otimizados" quanto à produão de ácido glicólico e/ou de ácido glioilico são bem conhecidos na arte e foram divulgados em particular nos pedidos de patente WO 2007/141316, WO 2010/108909, WO 2011/036213, WO 2011/157728, e WO 2012/025780.

[0036] De acordo com a invenão, os termos "produão fermentativa", "cultura", "etapa de fermentação" ou "fermentação" são usados para designar o crescimento de bactérias. Este crescimento geralmente é conduzido em fermentadores com um meio de cultura apropriado adaptado ao microrganismo que está sendo usado e que contém pelo menos uma fonte de carbono simples e, se necessário, co-substratos.

[0037] Um "meio de cultura apropriado" designa um meio (por exemplo, um meio líquido estéril) que compreende nutrientes essenciais ou benéficos para a manutenção e/ou crescimento da célula, tais como fontes de carbono ou substratos de carbono, fontes de nitrogênio, por exemplo, peptona, extratos de levedura, extratos de carne, extratos de malte, ureia, sulfato de amônio, cloreto de amônio, nitrato de amônio e fosfato de amônio; fontes de fósforo, por exemplo, fosfato monopotássico ou fosfato dipotássico;

elementos traço (por exemplo, sais de metálicos), por exemplo, sais de magnésio, sais de cobalto e/ou sais de manganês; bem como fatores de crescimento, tais como aminoácidos e vitaminas.

[0038] O termo "fonte de carbono" ou "substrato de carbono" de acordo com a presente invenção denota qualquer fonte de carbono que possa ser usada pelos especialistas na técnica para apoiar o crescimento normal de um microrganismo. A fonte de carbono é escolhida entre os carboidratos que designam monossacarídeos (tais como glicose, galactose, xilose, frutose ou lactose), oligossacarídeos, dissacarídeos (tais como sacarose, celobiose ou maltose), melaços, amido ou seus derivados, hemiceluloses e combinações dos mesmos. Uma fonte de carbono simples especialmente preferida é glicose. Uma outra fonte de carbono simples preferida é sacarose. A fonte de carbono pode ser derivada a partir de matérias-primas renováveis. Uma matéria-prima renovável é definida como a matéria-prima necessária para certos processos industriais que podem ser regenerados dentro de um breve intervalo e em quantidade suficiente para permitir a sua transformação no produto desejado. A biomassa vegetal tratada ou não é uma interessante fonte de carbono renovável.

[0039] De acordo com a invenção, os termos "etapa de bioconversão" ou "bioconversão" ou "biotransformação" ou "biocatálise" ou "conversão biológica" referem-se à

conversão de materiais orgânicos em produtos desejados por uma enzima específica produzida por um microrganismo produtor de enzima (diferente dos microrganismos modificados da invenção). A reação de bioconversão pode ser realizada de maneira diferente de acordo com a enzima, seu mecanismo e a restrição do processo, sendo elas conhecidas pelo especialista na técnica:

1. O material orgânico pode ser colocado em contato com a enzima adicionando-se ao material orgânico a enzima purificada ou,

2. O material orgânico pode ser colocado em contato com a enzima adicionando-se ao material orgânico o caldo de fermentação do microrganismo produtor da enzima contendo a enzima removida da bactéria ou,

3. O material orgânico pode ser colocado em contato com a enzima adicionando-se ao material orgânico o extrato de células lisadas do microrganismo produtor da enzima ou,

4. O material orgânico pode ser colocado em contato com a enzima adicionando-se ao material orgânico as células vivas do microrganismo produtor de enzima previamente tratadas para permitir tanto a reação enzimática como a viabilidade do referido microrganismo produtor de enzima necessária para a reação de regeneração (disponibilidade de cofator específico). Este sistema é denominado sistema biocatalisador de células inteiras.

[0040] Em uma modalidade preferida da invenção, o material orgânico é originário da primeira etapa de fermentação do método da invenção, isto é, ácido glicólico ou ácido glioxílico produzido pelos microrganismos modificados da invenção. O material orgânico originário da primeira etapa de fermentação pode ser mais ou menos purificado a partir do caldo de cultura. Em uma modalidade da invenção, o material orgânico é a glicina que é proporcionada química ou biologicamente.

[0041] Em um primeiro aspecto da invenção, a invenção refere-se a um método para a produção de ácido glicólico e/ou ácido glioxílico a partir de carboidratos como única fonte de carbono usando-se pelo menos uma etapa de fermentação e um microrganismo modificado em que o microrganismo da invenção compreende a atenuação da expressão de pelo menos um gene escolhido entre *aceB*, *glcB*, *gcl* e *eda* e a superexpressão de pelo menos um gene que codifica xilulose 5-fosfato fosfocetolase e/ou frutose 6-fosfato fosfocetolase.

[0042] Conforme divulgado no pedido de patente WO 2007/141316, a deleção de pelo menos um gene escolhido entre *aceB* que codifica a malato sintase, *glcB* que codifica a malato sintase, *gcl* que codifica a glioxilato carboligase e *eda* que codifica a 2-ceto-3-desoxigliconato 6-fosfato aldolase leva a uma diminuição da conversão de glioxilato

permitindo tal acúmulo de glioxilato, o qual poderia ser recuperado do meio de cultura ou poderia ser posteriormente convertido em ácido glicólico. Preferencialmente, no microrganismo da invenção, a expressão dos genes *aceB* e *glcB* e *gcl* está atenuada.

[0043] Mais preferencialmente, os microrganismos modificados da invenção podem ser adicionalmente modificados como divulgado nos pedidos de patente WO 2010/108909, WO 2011/036213, WO 2011/157728, WO 2012/025780 com:

- atenuação dos genes *glcDEFG* que codificam glicolato oxidase e/ou *aldA* que codificam a glicolaldeído desidrogenase, levando à incapacidade de metabolizar o glicolato substancialmente

- aumento do fluxo da via do glioxilato, obtido, em especial, pela atenuação dos genes: *icd* que codifica a isocitrato desidrogenase, *aceK* que codifica a Icd quinase-fosfatase, *pta* que codifica a fosfotransacetilase, *ackA* que codifica a acetato quinase, *poxB* que codifica a piruvato oxidase, *iclR* ou *fadR* que codifica repressores da via do glioxilato e/ou pela superexpressão do gene *aceA* que codifica a isocitrato liase,

[0044] A diminuição do nível da isocitrato desidrogenase pode ser alcançada através da introdução de promotores artificiais que conduzem a expressão do gene *icd*, que codifica a isocitrato desidrogenase, ou através da

introdução de mutações no gene *icd* que reduz a atividade enzimática da proteína.

[0045] Como a atividade da proteína Icd é reduzida pela fosforilação, ela também pode ser controlada pela introdução de genes *aceK* que têm atividade quinase aumentada ou atividade fosfatase reduzida em comparação com a enzima AceK tipo selvagem.

- aumento da disponibilidade de NADPH, obtida, em particular, pela atenuação dos genes *pgi*, *udhA*, *edd*.

[0046] Os termos "atenuação" ou "expressão atenuada" significam, neste contexto, que a expressão de um gene e/ou a produção de uma enzima está diminuída ou suprimida em comparação com o microrganismo não modificado, levando a uma diminuição na concentração intracelular de um ácido ribonucleico, de uma proteína ou de uma enzima em comparação com o microrganismo não modificado. O especialista na técnica conhece diferentes meios e métodos para medir a concentração de ácido ribonucleico ou a concentração de proteína na célula, incluindo, por exemplo, o uso de Reação em Cadeia de Polimerase por Transcriptase Reversa (RT-PCR) para determinar a concentração de ácido ribonucleico e o uso de anticorpo específico para determinar a concentração de proteína específica.

[0047] A diminuição ou a supressão da produção de uma enzima é obtida pela atenuação da expressão do gene que

codifica a referida enzima.

[0048] A atenuação dos genes pode ser conseguida por meios e métodos conhecidos do especialista na técnica. Geralmente, a atenuação da expressão gênica pode ser conseguida por:

- Mutação da região codificante ou a região promotora ou,
- Deleção de toda ou de uma parte da região promotora necessária para a expressão gênica ou,
- Deleção de toda ou de uma parte da região codificante do gene por recombinação homóloga ou,
- Inserção de um elemento externo na região codificante ou na região promotora ou,
- Expressão do gene sob o controle de um promotor fraco ou de um promotor induzível.

[0049] O especialista na técnica conhece uma variedade de promotores que exibem forças diferentes e qual promotor usar para uma expressão gênica fraca ou induzível.

[0050] O termo "atividade" de uma enzima é usado intercambiavelmente com o termo "função" e designa, no contexto da invenção, a reação que é catalisada pela enzima. O especialista na técnica sabe como medir a atividade enzimática da referida enzima.

[0051] Os termos "atividade atenuada" ou "atividade reduzida" de uma enzima significam ou uma atividade

catalítica específica reduzida da proteína obtida por mutação na sequência de aminoácidos e/ou concentrações diminuídas da proteína na célula obtida por mutação da sequência nucleotídica ou por deleção da região codificante do gene.

[0052] Os termos "atividade intensificada" ou "atividade aumentada" de uma enzima designam ou uma atividade catalítica específica aumentada da enzima e/ou uma quantidade/disponibilidade aumentada da enzima na célula, obtida, por exemplo, pela superexpressão do gene que codifica a enzima.

[0053] Os termos "expressão aumentada", "expressão intensificada" ou "superexpressão" e equivalentes gramaticais dos mesmos são usados intercambiavelmente no texto e têm um significado similar. Estes termos significam que a expressão de um gene ou que a produção de uma enzima está aumentada em comparação com o microrganismo não modificado, levando a um aumento na concentração intracelular de um ácido ribonucleico, de uma proteína ou de uma enzima em comparação com o microrganismo não modificado. O especialista na técnica conhece diferentes meios e métodos para medir a concentração de ácido ribonucleico ou a concentração de proteína na célula, incluindo, por exemplo, o uso de Reação em Cadeia de Polimerase por Transcriptase Reversa (RT-PCR) para determinar a concentração de ácido

ribonucleico e o uso de anticorpo específico para determinar a concentração de proteína específica.

[0054] O aumento da produção de uma enzima é obtido aumentando-se a expressão do gene que codifica a referida enzima.

[0055] Para aumentar a expressão de um gene, o especialista na técnica conhece diferentes técnicas, tais como:

- Aumento do número de cópias do gene no microrganismo. O gene é codificado cromossômica ou extracromossomicamente. Quando o gene está localizado no cromossomo, várias cópias do gene podem ser introduzidas no cromossomo por métodos de recombinação, conhecidos pelo especialista na área (incluindo a substituição de genes). Quando o gene está localizado extracromossomicamente, ele pode ser transportado por diferentes tipos de plasmídeos que diferem em relação à sua origem de replicação e, portanto, em relação ao seu número de cópias na célula. Estes plasmídeos estão presentes no microrganismo em 1-5 cópias, ou cerca de 20 cópias, ou até 500 cópias, dependendo da natureza do plasmídeo: plasmídeos com baixo número de cópias e replicação restrita (pSC101, RK2), plasmídeos com baixo número de cópias (pACYC, pRSF1010) ou plasmídeos com alto número de cópias (pSK bluescript II).

- Uso de um promotor que leva a um alto nível de

expressão do gene. O especialista na técnica conhece quais são os promotores mais convenientes. Por exemplo, os promotores P_{trc}, P_{tac}, P_{lac} ou os promotores lambda P_R e P_L são amplamente utilizados. Estes promotores podem ser "induzíveis" por um composto particular ou por condições externas específicas, como temperatura ou luz. Estes promotores podem ser homólogos ou heterólogos.

- Atenuar a atividade ou a expressão de um repressor de transcrição, específicas ou não específicas do gene.

- Uso de elementos que estabilizam o RNA mensageiro correspondente (Carrier e Keasling, 1999) ou elementos que estabilizam a proteína (por exemplo, GST tags, GE Healthcare).

[0056] Os termos "codificação", "codifica" ou "que codifica" referem-se ao processo pelo qual um polinucleotídeo, através dos mecanismos de transcrição e tradução, produz uma sequência de aminoácidos. O(s) gene(s) que codifica(m) a(s) enzima(s) pode(m) ser exógeno(s) ou endógeno(s).

[0057] O termo "fosfocetolase" refere-se tipicamente a enzimas com atividade xilulose 5-fosfato foscoetolase (EC 4.1.2.9) e/ou atividade frutose 6-fosfato foscoetolase (EC 4.1.2.22). Atividade xilulose 5-fosfato fosfocetolase significa a atividade de conversão de xilulose 5-fosfato em gliceraldeído 3-fosfato e acetilfosfato, que consome fosfato

e libera água. Atividade frutose 6-fosfato fosfocetolase significa a atividade de conversão de frutose 6-fosfato em eritrose 4-fosfato e acetilfosfato, que consome fosfato e libera água. Essas duas atividades podem ser medidas com o método descrito por Meile et al (2001). A enzima D-xilulose 5-fosfato-fosfocetolase ou o seu gene codificante pode originar-se de bactérias com atividade D-xilulose 5-fosfato-fosfocetolase, incluindo bactéria do ácido láctico, bactéria que assimila metanol, bactéria que assimila metano, bactéria *Streptococcus* e, mais especificamente, bactérias pertencentes aos gêneros *Acetobacter*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Thiobacillus*, *Streptococcus*, *Methylococcus*, *Butyrivibrio*, *Fibrobacter*, e/ou levedura pertencente aos gêneros *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Pichia*, *Yarrowia*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Trichosporon*, *Wingea* ou semelhantes. A enzima frutose-6-fosfato fosfocetolase ou o seu gene codificante pode originar-se de bactérias com uma atividade frutose-6-fosfato fosfocetolase pertencentes aos gêneros *Acetobacter*, *Bifidobacterium*, *Chlorobium*, *Brucella*, *Methylococcus*, *Gardnerella*, e/ou levedura pertencente a *Rhodotorula*, *Candida*, *Saccharomyces* ou semelhantes. Além disso, foi relatado que algumas enzimas catalisam ambas as atividades xilulose 5-fosfato fosfocetolase e frutose-6-fosfato fosfocetolase, como Xfp de *Bifidobacterium animalis* (WO

2006/016705 e WO 2016/044713) ou de *Bifidobacterium lactis* (Meile et al., 2001).

[0058] No contexto da invenção, os microrganismos modificados superexpressam o gene que codifica a fosfocetolase de modo a aumentar a produção de ácido glicólico e/ou ácido glioxílico. Se os microrganismos da invenção expressarem naturalmente a fosfocetolase, o(s) gene(s) que codifica(m) a(s) fosfocetolase(s) é(são) superexpressos usando-se os métodos de superexpressão detalhados acima. Por outro lado, se o microrganismo da invenção não expressar naturalmente a fosfocetolase, introduz-se no microrganismo o gene que codifica fosfocetolase exógena. Neste caso, a introdução do gene leva a uma superexpressão do gene que codifica a fosfocetolase.

[0059] Os genes que codificam fosfocetolase são escolhidos entre: gene *xfp* de *Bifidobacterium animalis* (WO 2006/016705 e WO 2016/044713), gene *xfp* de *Bifidobacterium lactis* (Meile et al., 2001), *xpkA* de *Lactobacillus pentosus* (Posthuma et al., 2002) ou seus genes homólogos: gene *xpk1* de *Lactobacillus plantarum*, gene *xpk2* de *Lactobacillus plantarum*, gene *xpk* de *Streptococcus agalactiae* NEM316, gene *ptk* de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, gene *xpk* de *Lactobacillus johnsonii*, gene *xpk* de *Lactobacillus acidophilus*, gene *xfp* de *Bifidobacterium longum*, gene *xfp* de *Chlorobium tepidum*, gene *xfp* de *Brucella suis*, gene *xfp* de

Brucella abortus. Preferencialmente, o microrganismo superexpressa o gene *xfp* de *Bifidobacterium lactis* (Meile et al., 2001), o gene *xfp* de *Bifidobacterium animalis* (WO 2006/016705 e WO 2016/044713), ou *xpkA* de *Lactobacillus pentosus* (Posthuma et al., 2002). Ainda mais preferencialmente, o microrganismo superexpressa o gene *xfp* de *Bifidobacterium animalis* (WO 2006/016705 e WO 2016/044713) ou o gene *xpkA* de *Lactobacillus pentosus* (Posthuma et al., 2002).

[0060] Em uma modalidade preferida da invenção, o microrganismo modificado adicionalmente superexpressa *ycdW* ou seus genes homólogos para aumentar a conversão do ácido glioxílico em ácido glicólico, tal como divulgado no pedido de patente WO 2007/141316. É um objetivo da invenção proporcionar um método para a produção de ácido glicólico usando-se um microrganismo modificado em que a expressão de pelo menos um gene escolhido entre *aceB*, *glcB*, *gcl* e *eda* esteja atenuada, a expressão do gene *xfp* de *Bifidobacterium lactis*, do gene *xfp* de *Bifidobacterium animalis*, ou *xpkA* de *Lactobacillus pentosus* e a expressão do gene *ycdW* e/ou do gene *yiaE* estejam superexpressos. Preferencialmente, no método para a produção de ácido glicólico em que se usa um microrganismo modificado, a expressão de pelo menos um gene escolhido entre *aceB*, *glcB*, *gcl* e *eda* está atenuada, a expressão do gene *xfp* de *Bifidobacterium animalis* ou do gene

xpkA de *Lactobacillus pentosus* está superexpressa, e a expressão do gene *ycdW* e/ou do gene *yiaE* está superexpressa.

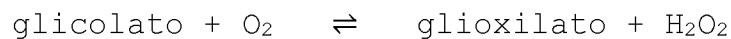
[0061] Este método para a produção de ácido glicólico permite a produção de ácido glioxílico por conversão ou biológica ou química a partir do ácido glicólico. Este segundo método da invenção compreende a etapa opcional de isolamento do ácido glicólico a partir do caldo de fermentação, conversão do ácido glicólico em ácido glioxílico por bioconversão usando-se uma glicolato-oxidase codificada pelo gene *gldDEFG* de *Escherichia coli* e uma catalase codificada pelos genes *kate* ou *katG* de *Escherichia coli* (Loewen & Switala, 1986) ou por conversão química, por exemplo, usando-se um catalisador de radicais nitroxila, tal como AZADO (Furukawa et al., 2016), e recuperação de ácido glioxílico a partir do meio de conversão.

[0062] O isolamento opcional do ácido glicólico pode residir, no mínimo, na remoção das células microbianas do caldo de fermentação. O ácido glicólico pode ser adicionalmente purificado a partir de outras espécies orgânicas a partir do caldo de fermentação, conforme divulgado nos pedidos de patente WO2012/153041, WO2012/153042 e WO2012/153043 por destilações sucessivas. Alternativamente, o ácido glicólico pode ser purificado por etapas iterativas de cristalização, conforme divulgado na patente US 7439391 ou por extração líquido-líquido usando-

se solvente adequado. Os solventes que podem ser usados são bem conhecidos pelo especialista na técnica, que é capaz de escolher o solvente mais conveniente. Outra maneira de purificar o ácido glicólico a partir do caldo de fermentação é o uso do processo de extração fermentativa, também conhecido como processo de extração reativa ou processo de fermentação extrativa. A fermentação extrativa poderia ser considerada como um processo integrado, no qual um processo de reação, isto é, fermentação, é combinado com uma operação de purificação, isto é, extração líquida, conforme divulgado nos pedidos de patentes WO 2009/042950 ou WO 1999/54856. O processo apresenta a vantagem de permitir a remoção do ácido glicólico assim que ele é produzido, reduzindo-se a inibição do crescimento celular devido ao efeito tóxico do ácido glicólico e, assim, produzindo-se e recuperando-se o ácido glicólico em uma única etapa contínua, reduzindo-se, assim, o processamento a jusante ("downstream") e os custos de recuperação. O solvente é escolhido entre solventes que contêm oxigênio ligado a carbono ou solventes que contêm oxigênio ligado a fósforo ou aminas alifáticas de alto peso molecular. Os solventes preferidos são óxido de tri-n-octilfosfina, fosfato de tri-n-butila, lauriltrialquilmetilamina, tri-n-octilamina, tri-iso-octilamina, tri-n-(octildecil)-amina, sal de alquilamônio quaternário, polietilenoglicóis, polietilenoimina e

polipropilenoimina. Mais preferencialmente, o solvente usado é o óxido de tri-n-octilfosfina. De maneira vantajosa, a fermentação extrativa pode ser completada por uma etapa subsequente de cristalização ou destilação.

[0063] A etapa de bioconversão do ácido glicólico em ácido glioxílico é mediada por uma glicolato oxidase, também conhecida como (S) -2-hidroxiácido oxidase (número EC: 1.1.3.15) que catalisa a reação:



[0064] Esta enzima pertence à família das oxidorreduções, especificamente as que atuam sobre o grupo CH-OH do doador com oxigênio como aceptor.

[0065] A glicolato-oxidase usada nesta invenção pode corresponder a qualquer forma da enzima de ocorrência natural ou a qualquer variante destas enzimas naturais que exibam melhor estabilidade ou eficiência catalítica. A glicolato-oxidase de ocorrência natural usada pode ser extraída e purificada a partir de folhas de espinafre ou beterraba ou, alternativamente, o gene que codifica estas enzimas pode ser inserido em um microrganismo produtor, como divulgado nos pedidos de patente WO 1994/20631 e WO 1995/01444. Alternativamente, os genes *gldDEFG* de *Escherichia coli* A que codificam glicolato oxidase são superexpressos em um organismo produtor. O organismo produtor é escolhido entre *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Aspergillus nidulans*

ou *Escherichia coli*. Mais preferencialmente, é usada *Escherichia coli*. Como a glicolato oxidase gera H_2O_2 , é vantajoso usar, juntamente com a glicolato oxidase, uma catalase (Número EC: 1.11.1.6), a qual é endogenamente expressa em *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Aspergillus nidulans* ou *Escherichia coli*. Na *Escherichia coli*, a catalase é codificada pelos genes *katE* ou *katG*. Preferencialmente, a glicolato oxidase e a catalase são superexpressas no mesmo microrganismo. O uso de glicolato oxidase e catalase é divulgado nos pedidos de patente WO 1996/00793, WO 1994/20631 ou WO 1995/01444.

[0066] Para a bioconversão, a glicolato-oxidase e/ou catalase são colocadas em contato com o ácido glicólico adicionando-se diretamente as enzimas purificadas à solução de ácido glicólico (parcialmente purificado ou não) ou adicionando-se o caldo de fermentação do microrganismo produtor de glicolato oxidase e/ou catalase ou um extrato de célula lisada do microrganismo produtor de glicolato oxidase e/ou catalase. Para melhorar a eficiência da bioconversão, podem ser usadas enzimas imobilizadas após a sua purificação, como divulgado na patente US 5.439.813.

[0067] O ácido glioxílico formado é, então, purificado usando-se meios bem conhecidos pelo especialista na técnica, como, por exemplo, cristalização ou precipitação com hidróxido de cálcio ou extração líquido-líquido.

[0068] Em uma outra modalidade preferida da invenção, o microrganismo modificado é adicionalmente manipulado de modo a atenuar, pelo menos, a expressão de genes *ycdW*, a fim de evitar a conversão do ácido glioxílico em ácido glicólico. É um objetivo da invenção proporcionar um método para a produção de ácido glicólico usando-se um microrganismo modificado em que a expressão de pelo menos um gene escolhido entre *aceB*, *glcB*, *gcl* e *eda* esteja atenuada, a expressão do gene *xfp* de *Bifidobacterium lactis*, a expressão do gene *xfp* de *Bifidobacterium animalis*, ou do gene *xpkA* de *Lactobacillus pentosus* estejam superexpressas e a expressão do gene *ycdW* e/ou do gene *yiaE* estejam atenuadas ou completamente abolidas. Preferencialmente, no método para a produção de ácido glicólico em que se usa um microrganismo modificado, a expressão de pelo menos um gene escolhido entre *aceB*, *glcB*, *gcl* e *eda* está atenuada, e a expressão do gene *xfp* de *Bifidobacterium animalis* ou do gene *xpkA* de *Lactobacillus pentosus* está superexpressa, e a expressão do gene *ycdW* e do gene *yiaE* estejam atenuadas ou completamente abolidas.

[0069] Este método para a produção de ácido glicólico permite a produção de ácido glioxílico por conversão ou biológica ou química a partir do ácido glioxílico. Este quarto método da invenção compreende a etapa de isolamento opcional de ácido glioxílico a partir do caldo de

fermentação, conversão de ácido glioxílico em ácido glicólico ou por bioconversão usando-se uma glioxilato redutase ou por conversão química usando-se, por exemplo, boroidreto de sódio e recuperando-se ácido glicólico a partir do meio de conversão. A referida glioxilato redutase pode ser codificada pelo gene *ycdW* de *Escherichia coli* ou pelo gene *grxA* de *Rhizobium etli*.

[0070] O isolamento opcional do ácido glioxílico pode residir, no mínimo, na remoção das células microbianas do caldo de fermentação. O ácido glioxílico pode ser adicionalmente purificado a partir das outras espécies orgânicas a partir do caldo de fermentação por troca iônica ou por métodos de precipitação/cristalização ou por extração líquido-líquido. Outra maneira de purificar o ácido glioxílico a partir do caldo de fermentação é o uso do processo de fermentação extrativa. A fermentação extrativa poderia ser considerada como um processo integrado, no qual um processo de reação, isto é, fermentação, é combinado com uma operação de purificação, isto é, extração líquida, conforme divulgado nos pedidos de patentes WO 2009/042950 ou WO 1999/54856. O processo apresenta a vantagem de permitir a remoção do ácido glioxílico assim que ele é produzido, reduzindo-se a inibição do crescimento celular devido ao efeito tóxico do ácido glioxílico e, assim, produzindo-se e recuperando-se o ácido glicólico em uma única etapa contínua,

reduzindo-se, assim, o processamento a jusante ("downstream") e os custos de recuperação. O solvente é escolhido entre solventes que contêm oxigênio ligado a carbono ou solventes que contêm oxigênio ligado a fósforo ou aminas alifáticas de alto peso molecular. Os solventes preferidos são óxido de tri-n-octilfosfina, fosfato de tri-n-butila, lauriltrialquilmetilamina, tri-n-octilamina, tri-iso-octilamina, tri-n-(octildecil)-amina, sal de alquilamônio quaternário, polietilenoglicóis, polietilenoimina e polipropilenoimina. Mais preferencialmente, o solvente usado é o óxido de tri-n-octilfosfina. De maneira vantajosa, a fermentação extrativa pode ser completada por uma etapa subsequente de cristalização ou destilação. Alternativamente a fermentação extrativa, para diminuir a toxicidade do ácido glioxílico produzido durante a fermentação, é possível adicionar ao caldo de fermentação uma molécula que sabidamente forme um complexo com aldeídos, tais como a semicarbazida, ou carbohidrazida ou 2,4-dinitrofenil-hidrazina, de modo a se complexar com ácido glioxílico e, assim, reduzir a toxicidade do aldeído às células. Isto poderia permitir uma melhor produtividade de ácido glioxílico (Sardari et al., 2014).

[0071] A etapa de bioconversão do ácido glioxílico em ácido glicólico é mediada por uma glioxilato redutase. A glioxilato redutase foi primeiramente isolada a partir das

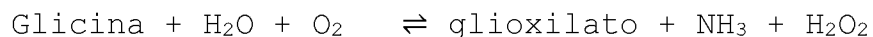
folhas de espinafre e é uma enzima que catalisa a redução do ácido glioxílico em ácido glicólico usando o cofator NADH ou NADPH. A glicolato redutase pode ser dependente de NADH (Número EC: 1.1.1.26) ou dependente de NADPH (Número EC: 1.1.1.79). Exemplos de glioxilato redutase dependentes de NADH que poderiam ser usados são: GxrA codificada pelo gene *gxrA* de *Rhizobium etli*, GOR1 codificada pelo gene *GOR1* de *Saccharomyces cerevisiae*, HprA codificada pelo gene *hprA* de *Metilobacterium extorquens* ou GyaR codificada pelo gene *gyaR* de *Pyrococcus furiosus*. Exemplos de glioxilato redutase dependentes de NADPH são: YcdW codificada pelo gene *ycdW* de *Escherichia coli*, YiaE codificada pelo gene *yiaE* de *Escherichia coli*, YjbG codificada pelo gene *yjgB* de *Escherichia coli*, YafB codificada pelo gene *yafB* de *Escherichia coli*, YqhD codificada pelo gene *yqhD* de *Escherichia coli* ou GLYR1 e GLYR2 codificadas pelos genes *GLYR1* e *GLYR2* de *Arabidopsis thaliana*... De maneira vantajosa, o microrganismo produtor da glioxilato redutase é *Escherichia coli*.

[0072] Para a bioconversão do ácido glioxílico em ácido glicólico, as enzimas glioxilato redutase requerem ou o cofator NADH ou o cofator NADPH. Em tal caso, a bioconversão precisa ser feita na presença da enzima específica e de células vivas capazes de produzir e regenerar os cofatores durante a reação. Este sistema é denominado

sistema biocatalisador de células inteiras. Uma solução de ácido glioxílico parcialmente purificada ou não é, portanto, colocada em contato com o caldo de fermentação do microrganismo produtor de glioxilato redutase que tenha produzido a enzima glioxilato redutase em excesso e que ainda seja viável para produzir e regenerar os cofatores. Para melhorar a eficiência da bioconversão, podem ser usadas enzimas imobilizadas, mas ainda na presença de um microrganismo vivo pré-tratado, de modo a ajudar a reação.

[0073] O ácido glioxílico formado é, então, purificado usando-se meios bem conhecidos pelo especialista na técnica, tais como, por exemplo, destilação, cristalização, precipitação com hidróxido de cálcio ou extração líquido-líquido.

[0074] Em uma outra modalidade da invenção, o ácido glioxílico pode ser produzido por bioconversão de glicina (Número CAS: 56-40-6) usando-se uma glicina oxidase. Glicina oxidase (Número EC: 1.4.3.19) que catalisa a reação:



[0075] A glicolato oxidase usada nesta invenção pode corresponder a qualquer forma de ocorrência natural da enzima ou a qualquer variante destas enzimas naturais que exibam melhor estabilidade ou eficiência catalítica, conforme divulgado no pedido de patente US 2016/0002610. A glicina oxidase foi identificada em *Bacillus subtilis* (Nishiya &

Imanaka, 1998; Job et al., 2002). Esta enzima pode ser extraída e purificada a partir de *Bacillus subtilis* ou, alternativamente, o gene que codifica esta enzima pode ser inserido em um microrganismo produtor. O organismo produtor é preferencialmente *Escherichia coli*. Como a glicina oxidase gera H_2O_2 , é vantajoso usar, juntamente com a glicina oxidase, uma catalase (Número EC: 1.11.1.6), a qual é expressa endogenamente por pelos genes *kate* e *katG* de *Escherichia coli*. Preferencialmente, a glicina oxidase e a catalase estão superexpressas no mesmo microrganismo.

[0076] Para a bioconversão, a glicina oxidase e/ou catalase são colocadas em contato com o ácido glicólico adicionando-se diretamente as enzimas purificadas à solução de glicina ou adicionando-se o caldo de fermentação do microrganismo produtor de glicina oxidase e/ou catalase ou um extrato de célula(s) lisada(s) do microrganismo produtor de glicina oxidase e/ou catalase. Para melhorar a eficiência da bioconversão, podem ser usadas enzimas imobilizadas após a sua purificação, como divulgado na patente US 5.439.813.

[0077] Finalmente, a invenção refere-se a um microrganismo modificado para a produção de ácido glicólico e/ou ácido glioxílico em que a expressão de pelo menos um gene escolhido entre *aceB*, *glcB*, *gcl* e *eda* esteja atenuada e a expressão de pelo menos um gene que codifica a fosfocetolase esteja intensificada. A fosocetolase é

codificada pelo gene *xfp* de *Bifidobacterium animalis*, pelo gene *xfp* de *Bifidobacterium lactis*, ou pelo gene *xpkA* de *Lactobacillus pentosus*.

[0078] Para a produção de ácido glicólico, o microrganismo da invenção é adicionalmente modificado para superexpressar o gene *ycdW* de *Escherichia coli* ou pelo menos um dos seus genes homólogos.

[0079] Para a produção de ácido glioxílico, o microrganismo da invenção é adicionalmente modificado para atenuar ou abolir completamente a expressão de pelo menos o gene *ycdW*.

[0080] Os microrganismos da invenção são escolhidos dentre *Enterobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Lactobacillaceae* ou levedura. Mais preferencialmente, os microrganismos da invenção são da espécie *Escherichia coli*.

EXEMPLOS

[0081] Os seguintes experimentos demonstram como produzir ácido glicólico ou ácido glioxílico usando-se uma cepa recombinante de *E. coli* produtora de ácido glicólico modificada como base.

[0082] Nos exemplos dados abaixo, foram usados métodos bem conhecidos na técnica para construir cepas de *E. coli* contendo vetores de replicação e/ou várias inserções, deleções e substituições cromossômicas usando-se

recombinação homóloga, como é bem descrita por Datsenko & Wanner, (2000).

PROTOSCOLOS

[0083] Foram usados vários protocolos para construir as cepas que produzem ácido glioxílico descritas nos exemplos seguintes.

[0084] O Protocolo 1 (Modificações cromossômicas por recombinação homóloga, seleção de recombinantes e excisão de cassete de antibiótico flanqueado por sequências FRT) e o Protocolo 2 (Transdução do fago P1) usados nesta invenção foram completamente descritos no pedido de patente WO 2013/001055.

[0085] Protocolo 3: Excisão de cassete antibiótico flanqueado por sequências LoxP

[0086] Os genes de resistência flanqueados por sequências LoxP foram removidos usando-se o plasmídeo pJW168 (Palmeros et al., 2000) portando o gene que codifica a recombinase Cre. Resumidamente, os clones que abrigam o plasmídeo pJW168 foram cultivados a 37 °C ou 42 °C em LB e, então, testados quanto à perda de resistência a antibiótico a 30 °C. Os clones sensíveis a antibióticos foram, então, verificados por PCR usando-se iniciadores adequados.

EXEMPLO 1: Supressão da superexpressão do gene *ycdW* em uma cepa recombinante de *E. coli* superprodutora de ácido glicólico - Descrição da cepa 1 e construção das cepas 2 a

3.

Descrição da Cepa 1

[0087] A cepa descrita no Exemplo 2, parte 2 do pedido de patente WO 2011/157728, e que corresponde à cepa parental de AG1413, isto é, a cepa AG1413 sem o plasmídeo pME101-ycdW-TT07-PaceA-aceA-TT01, será denominada cepa 1 no presente pedido de patente.

Construção da Cepa 2

[0088] Antes de se usar a cepa 1, os cassetes de resistência a antibióticos foram removidas dos "loci" *icd* (SEQ ID N° 01, que codifica a proteína com a sequência da SEQ ID N° 02) e *aceK* (SEQ ID N° 03, que codifica a proteína com a sequência da SEQ ID N° 04), usando-se a recombinase Flp (de acordo com o Protocolo 1) e a recombinase Cre (de acordo com o Protocolo 3), respectivamente. As transformantes sensíveis a canamicina e cloranfenicol foram, então, selecionados e a ausência dos marcadores de antibióticos foi verificada através de análise por PCR com oligonucleotídeos apropriados. A cepa retida foi denominada cepa 2.

Construção da Cepa 3

[0089] O gene *ycdW* (SEQ ID N° 05, que codifica a proteína com a sequência da SEQ ID N° 06), que codifica a glioxilato/hidroxipiruvato redutase, e portado pelo plasmídeo pME101-ycdW-TT07-PaceA-aceA-TT01 descrito no

pedido de patente WO 2010/108909, foi removido deste plasmídeo, juntamente com o seu promotor e *lacI* gene *lacI* (SEQ ID N° 07, que codifica a proteína com a sequência da SEQ ID N° 08), por enzimas de restrição e ligase, resultando no plasmídeo pAG0094.

[0090] O plasmídeo pAG0094 foi introduzido na cepa 2, dando origem à cepa 3.

EXEMPLO 2: Melhorando a produção de ácido glioxílico por remoção completa do gene *ycdW* em uma cepa recombinante de *E. coli* superprodutora de ácido glicólico - Construção das cepas 4 a 6.

[0091] A cópia endógena do gene *ycdW* foi excluída na cepa recombinante 2 de *E. coli* produtora de ácido glicólico.

[0092] Para se alcançar a superexpressão do gene *ycdW*, usou-se a estratégia de recombinação homóloga descrita por Datsenko & Wanner, 2000 (de acordo com o Protocolo 1).

[0093] Para a deleção de *ycdW*, um fragmento portador de um marcador de resistência flanqueado por sequências de DNA homólogas às regiões a montante e a jusante do gene *ycdW* foi amplificado por PCR pela técnica de PCR sobreposta (oligonucleotídeos sobrepostos). Refere-se às sequências para recombinação em regiões a montante e a jusante do gene *ycdW* como SEQ ID N° 09 e 10. O produto de PCR obtido "*ΔycdW::Km*" foi então introduzido por eletroporação na cepa MG1655 (pKD46). Os transformantes resistentes aos

antibióticos foram selecionados e a inserção do gene *ycdW* com o cassete de resistência foi verificada através de análise por PCR com oligonucleotídeos apropriados. A cepa retida foi designada MG1655 $\Delta ycdW::Km$. Por fim, a deleção de $\Delta ycdW::Km$ foi transferida por transdução de fago P1 (de acordo com o Protocolo 2) a partir de MG1655 $\Delta ycdW::Km$ para a cepa 2. Os transdutantes resistentes à canamicina foram selecionados e a presença da deleção de $\Delta ycdW::Km$ foi verificada por uma análise por PCR com oligonucleotídeos apropriados. A cepa retida foi denominada cepa 4.

[0094] A cópia endógena do gene *aceA* (SEQ ID N° 11, que codifica a proteína com a sequência de SEQ ID N° 12) foi então, deletada, na cepa 4.

[0095] Para se alcançar a superexpressão do gene *aceA*, usou-se a estratégia de recombinação homóloga descrita por Datsenko & Wanner, 2000 (de acordo com o Protocolo 1). Como os genes *aceB* (SEQ ID N° 13, que codifica a proteína com a sequência da SEQ ID N° 14) e *aceK* (SEQ ID N° 03, que codifica a proteína com a sequência de SEQ ID N° 04) foram previamente eliminados na cepa 4, a estratégia de recombinação homóloga é equivalente àquela usada para deletar o operon *aceBAK*.

[0096] Para a deleção de *aceBAK*, um fragmento portador de um marcador de resistência a antibióticos flanqueado por sequências de DNA homólogas às regiões a

montante e a jusante do gene *aceBAK* foi amplificado por PCR pela técnica de PCR sobreposta (oligonucleotídeos sobrepostos). Refere-se às sequências para recombinação em regiões a montante e a jusante do gene *aceBAK* como SEQ ID N° 15 e 16. O produto de PCR obtido " $\Delta aceBAK::Cm$ " foi então introduzido por eletroporação na cepa MG1655 (pKD46). Os transformantes resistentes aos antibióticos foram selecionados e a deleção do operon *aceBAK* com o cassete de resistência associado foi verificada através de análise por PCR com oligonucleotídeos apropriados. A cepa retida foi designada MG1655 $\Delta aceBAK::Cm$. Por fim, a deleção de $\Delta aceBAK::Cm$ foi transferida por transdução de fago P1 (de acordo com o Protocolo 2) a partir de MG1655 $\Delta aceBAK::Cm$ para a cepa 4. Os transdutantes resistentes a cloranfenicol foram selecionados e a presença da deleção de $\Delta aceBAK::Cm$ foi verificada por uma análise por PCR com oligonucleotídeos apropriados. A cepa retida foi denominada cepa 5.

[0097] O gene *ycdW* (SEQ ID N° 05 e N° 06), que codifica a glioxilato/hidroxipiruvato redutase, e portado pelo plasmídeo pME101-*ycdW*-TT07-PaceA-*aceA*-TT01, foi removido deste plasmídeo por enzimas de restrição e ligase, sem deletar o seu promotor e o gene *lacI* (ao contrário de pAG0094 descrito no Exemplo 1), resultando no plasmídeo pAG0303. Portanto, neste plasmídeo, uma parte da expressão gênica de *aceA* é conduzida através de seu promotor natural,

mas também é possível aumentar o nível da expressão de *aceA* adicionando-se IPTG através do promotor remanescente dos genes *ycdW* e *lacI*.

[0098] O plasmídeo pAG0303 foi introduzido na cepa 5, dando origem à cepa 6.

EXEMPLO 3: Ácido glicólico e produção de ácido glioxílico por fermentação com as cepas 3 e 6.

[0099] As cepas de produção foram avaliadas em frascos Erlenmeyer.

[0100] Cultivou-se uma pré-cultura de 5 mL a 37 °C durante 16 horas em um meio misto (meio LB 10% (Sigma 25%) com glicose 2,5 g.L⁻¹ e meio mínimo M1 90%). Ela foi usada para inocular uma cultura de 50 mL até uma DO₆₀₀ de 0,2 em meio M1. A composição do meio M1 é descrita na Tabela 1.

[0101] Quando necessário, foram adicionados antibióticos ao meio (espectinomicina a uma concentração final de 50 mg.L⁻¹) e IPTG a uma concentração final de 100 µM. A temperatura das culturas foi de 30 °C.

[0102] Quando a cultura atingiu uma DO₆₀₀ de até 5, os metabólitos extracelulares foram analisados por HPLC com detecção refratométrica (ácidos orgânicos e glicose).

[0103] Para cada cepa, foram realizadas várias repetições.

Tabela 1 Composição do meio M1.

Composto	Concentração
----------	--------------

	(g.L ⁻¹)
Ácido cítrico. H ₂ O	6,00
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1,00
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,04
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,0080
MnSO ₄ . H ₂ O	0,0200
CuCl ₂ . 2H ₂ O	0,0020
H ₃ BO ₃	0,0010
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,0004
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,0040
Na ₂ HPO ₄	2,00
KH ₂ PO ₄	10,48
K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	10,48
(NH ₄) ₂ HPO ₄	8,00
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,00
NH ₄ Cl	0,13
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,04
Tiamina	0,0100
MOPS	40
Glicose	10

Tabela 2: Títulos e rendimentos (R) de Ácido Glicólico (AG) e Ácido Glioxílico (AGx) em g de AG ou AGx por grama de açúcar consumido pelas cepas produtoras em frascos de agitação. Para a definição precisa do rendimento de AG ou AGx/glicose, vide rendimentos abaixo.

	Cepa 3	Cepa 6
[AG] (g.L ⁻¹)	1,1	0,4
[AGx] (g.L ⁻¹)	0,2	0,8
R AG (g.g ⁻¹)	0,11	0,03
R AGx (g.g ⁻¹)	0,02	0,10

[0104] Como pode ser visto na Tabela 2 acima, após a deleção das cópias de *ycdW* e da indução controlada do gene *aceA*, a cepa 6 produziu quantidades muito mais altas de Ácido Glioxílico do que a cepa 3. Como esperado, esta produção de ácido glioxílico está ligada à queda da síntese de Ácido Glicólico na cepa 6.

[0105] Os rendimentos de AG e AGx foram expressos da seguinte forma:

$$R_{AG} = \frac{AG \text{ (g)}}{\text{glicose consumida (g)}}$$

$$R_{AGx} = \frac{AGx \text{ (g)}}{\text{glicose consumida (g)}}$$

EXEMPLO 4: Melhorando a produção de Ácido glicólico por superexpressão completa de genes heterólogos que codificam a enzima fosfocetolase em uma cepa recombinante de *E. coli* superprodutora de ácido glicólico - Construção das cepas 7 a 12.

Construção das cepas 7 a 9: Reconstrução do gene de *E. coli* *pta* que codifica fosfato acetiltransferase em uma cepa de *E. coli* recombinante superprodutora de ácido glicólico

[0106] Na cepa AG1413 e na sua cepa parental, cepa 1, foram previamente eliminados tanto o gene *ackA* (SEQ ID N° 17, que codifica a proteína com a sequência da SEQ ID N° 18) quanto o gene *pta* (SEQ ID N° 19, que codifica a proteína com a sequência da SEQ ID N° 20), os quais estão organizados em

operons. A fim de se converter novamente acetilfosfato (o qual é gerado pela fosfocetolase nas seguintes cepas) em acetil-CoA, o gene *pta* foi reconstruído com base na cepa 1, ao mesmo tempo em que se conservou o gene *ackA*.

[0107] Para se realizar a reconstrução do gene *pta*, foi usado o mutante $\Delta ackA::Km$ da coleção Keio, tendo sido deletado apenas o gene *ackA* e portando um gene *pta* tipo selvagem. A deleção $\Delta ackA::Km$ associada ao gene *pta* tipo selvagem foi transferida por transdução do fago P1 (de acordo com o Protocolo 2) a partir do mutante Keio $\Delta ackA::Km$ para a cepa 2. Os transdutantes resistentes à canamicina foram selecionados e a presença tanto da deleção $\Delta ackA::Km$ quanto do gene *pta* tipo selvagem foi verificada por uma análise por PCR com oligonucleotídeos apropriados. A cepa retida foi denominada cepa 7.

[0108] Em seguida, o cassete de antibiótico foi removido da deleção $\Delta ackA$ usando-se a recombinase Flp (de acordo com o Protocolo 1) na cepa 7. Os transformantes sensíveis à canamicina foram selecionados e a ausência do marcador de antibiótico foi verificada através de análise por PCR com oligonucleotídeos apropriados. A cepa retida foi denominada cepa 8.

[0109] Para o ensaio de atividade Fosfato acetiltransferase, foi monitorada a liberação de CoA dependente de fosfato a partir de acetil-CoA com o reagente

tiol de Ellman, 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), medindo-se, a 30 °C, a formação do ânion tiofenolato a 412 nm ($\epsilon_{412} = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A mistura de ensaio (1 ml) continha KH_2PO_4 100 mM (pH 8), DTNB 0,5 mM e acetil-CoA 1 mM. Foi subtraído o valor da atividade determinado sem acetil-CoA no ensaio. A atividade específica é expressa em mili-unidades (mIU) por miligrama de proteína.

[0110] A atividade fosfato acetiltransferase da cepa 7 é 10 vezes maior do que a da cepa 8 (1100 mIU/mg para a cepa 7 e 110 mUI/mg para a cepa 8).

[0111] O plasmídeo pME101-ycdW-TT07-PaceA-aceA-TT01, descrito no pedido de patente WO2010/108909, foi, então, introduzido na cepa 8, dando origem à cepa 9.

Construção das cepas 10 a 12: Superexpressão de genes heterólogos que codificam enzima fosfocetolase em uma cepa de *E. coli* recombinante superprodutora de ácido glicólico

[0112] A fim de aumentar o pool de acetil-CoA e, assim, a produção de ácido glicólico, diferentes fosfocetolases foram superproduzidas em uma cepa de *E. coli* superprodutora de ácido glicólico.

[0113] Três genes diferentes que codificam enzimas fosfocetolases foram superexpressos individualmente na cepa 9:

- *xfp* (SEQ ID N° 21, que codifica a proteína com a sequência da SEQ ID N° 22) de *Bifidobacterium animalis*,

- *fxpk* (SEQ ID N° 23 que codifica a proteína com a sequência de SEQ ID N° 24) de *Bifidobacterium adolescentis*,
- *xpk* (SEQ ID N° 25 que codifica a proteína com a sequência de SEQ ID N° 26) de *Lactobacillus pentosus*.

[0114] Para cada gene (identificado pelo sufixo "Olec"), uma versão com códons harmonizados e otimizada quanto à produção em *E. coli* foi sintetizada sinteticamente pelo GeneArt Gene Synthesis Service da Thermo Fisher Scientific. Cada gene foi subclonado em um vetor pBBR1MCS5 (Kovach et al, 1995), juntamente com o promotor artificial *Ptrc* (o promotor artificial é o descrito para a superexpressão do operon *cysPUWAM* no pedido de patente WO 2009/043803; Brosius et al., 1985), usando-se os oligonucleotídeos apropriados, proporcionando, respectivamente, os plasmídeos detalhados na Tabela 3, abaixo.

Tabela 3: Plasmídeos para a superexpressão dos genes da fosfocetolase

Organismo de origem	Nome da versão com códons harmonizados que codifica o gene da fosfocetolase	SEQ ID N°	Nome dos plasmídeos para superexpressão dos genes da fosfocetolase
<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>xfpOlec</i>	27	pBBR1MCS5- <i>Ptrc01-xfpOlec</i>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>fxpkOlec</i>	28	pBBR1MCS5- <i>Ptrc01-fxpkOlec</i>
<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>xpkOlec</i>	29	pBBR1MCS5- <i>Ptrc01-xpkOlec</i>

[0115] Cada plasmídeo foi introduzido individualmente na cepa 9, dando origem às cepas descritas na Tabela 4, abaixo.

Tabela 4: Cepas compreendendo plasmídeos para a superexpressão dos genes da fosfocetolase

Nome dos plasmídeos para superexpressão dos genes da fosfocetolase	Nome das cepas resultantes correspondentes à cepa 9 portadora dos plasmídeos
pBBR1MCS5- <i>Ptrc01-xfp01ec</i>	Cepa 10
pBBR1MCS5- <i>Ptrc01-fxp01ec</i>	Cepa 11
pBBR1MCS5- <i>Ptrc01-xpk01ec</i>	Cepa 12

[0116] O plasmídeo pBBR1 estavelmente replica um número moderado de cópias.

[0117] Para se ter vários níveis de superexpressão dos genes da fosfocetolase, os genes também foram clonados nos seguintes plasmídeos com um diferente número de cópias na célula:

- o vetor com baixo número de cópias pCL1920 (Lerner & Inouye, 1990), plasmídeo pME101-ycdW-TT07-PaceA-aceA-TT01,
- e o plasmídeo pBAC (Epicentre®) bacteriano de cromossomo artificial, cujo número de cópias é um.

[0118] Plasmídeos de superexpressão de fosfocetolase, juntamente com o plasmídeo pME101-ycdW-TT07-PaceA-aceA-TT01, também foram introduzidos nas cepas 7 e 8.

Desempenhos em frascos de agitação e reatores

[0119] Primeiro, as cepas foram avaliadas em frascos de agitação como descrito no Exemplo 3.

Tabela 5: Títulos e rendimentos (R) de Ácido Glicólico (AG) em g de AG por grama de açúcar consumido pelas cepas produtoras em frascos de agitação. Para a definição precisa dos rendimentos de AG/glicose, vide Exemplo 3.

	Rendimento de AG ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
Cepa 9	0,286
Cepa 10	0,395
Cepa 11	0,337
Cepa 12	0,389

[0120] Como mostrado na Tabela 5, após a superexpressão de todos os genes da fosfoetolase testados, o rendimento da produção de Ácido Glicólico aumentou. O rendimento foi maior com a superexpressão dos genes da fosfoetolase de *Bifidobacterium animalis* e de *Lactobacillus pentosus*.

[0121] Estas cepas foram avaliadas em fermentadores de 2 L (Pierre Guerin) usando-se uma estratégia de lotes alimentados ("fedbatch").

[0122] Cultivou-se uma primeira pré-cultura a 37 °C durante 10 horas em um meio misto (meio LB 10% (Sigma 25%) com glicose 2,5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ e meio mínimo M1 90%). Ela foi usada para inocular uma segunda cultura-inóculo de 50 mL até uma

DO₆₀₀ de 0,2 em meio M1. Esta etapa de pré-cultura foi conduzida a 37 °C em frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL de meio sintético (M1) suplementado com MOPS 40 g.L⁻¹ e glicose 10 g.L⁻¹. Esta segunda pré-cultura foi usada para a inoculação do fermentador após atingir uma DO_{600 nm} próxima de 9.

[0123] O reator com 700 mL de meio sintético (M2) suplementado com glicose 20 g.L⁻¹ foi inoculado a uma densidade óptica inicial de cerca de 0,5. A composição do meio M2 é descrita na Tabela 6. A cultura foi conduzida a 30 °C com agitação e a concentração de oxigênio dissolvido foi mantida em valores entre 20 e 40%, preferencialmente 30% de saturação, aumentando-se a agitação e a aeração. O pH foi ajustado para 6,8 por adição automática de solução de NH₄OH/NaOH (15/5 p/p).

[0124] A cultura foi conduzida em lote até a exaustão da glicose. Nesse momento, uma solução de glicose 700 g.L⁻¹ suplementada com sulfato de magnésio, oligoelementos e tiamina foi adicionada para restaurar uma concentração de 20 g.L⁻¹ de glicose no reator. Foram feitas outras adições a cada vez que a glicose era exaurida. Após o quinto pulso, o pH foi aumentado para o valor de 7,4 graças a uma rampa de três horas.

[0125] As culturas foram interrompidas após 40 a 45 horas. Os metabólitos extracelulares foram analisados por

HPLC com detecção refratométrica (ácidos orgânicos e glicose).

[0126] Para cada cepa, foram realizadas várias repetições. Os desempenhos finais são apresentados na Tabela 7.

Tabela 6: Composição do meio M2.

Composto	Concentração (g.L ⁻¹)
Ácido cítrico. H ₂ O	3,00
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1,00
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,04
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,0080
MnSO ₄ . H ₂ O	0,0200
CuCl ₂ . 2H ₂ O	0,0020
H ₃ BO ₃	0,0010
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,0004
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,0040
KH ₂ PO ₄	0,70
K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	1,17
NH ₄ H ₂ PO ₄	2,99
(NH ₄) ₂ HPO ₄	3,45
(NH ₄) ₂ SO ₄	8,75
NH ₄ Cl	0,13
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,04
Tiamina	0,0100

Tabela 7: Desempenhos finais das cepas 9, 10 e 12 em reatores de 2L.

Cepa	Título final de AG	Produtividade final de AG	Rendimento final de AG
Cepa 8			
Cepa 9	Referência	Referência	Referência
Cepa 10	~	~	++
Cepa 12	~	~	+

[0127] O símbolo ~ indica que a variação do parâmetro está entre -5% e 5% em comparação com a cepa de referência. O símbolo + indica um aumento entre 5 e 10% e o símbolo ++ indica um aumento entre 10 e 20%.

[0128] Após a superexpressão dos genes da fosfocetolase, o rendimento de produção das cepas 10 e 12 mostra um aumento entre 5 e 20%, de acordo com a natureza do gene heterólogo testado. Não vimos nenhum efeito sobre o título ou sobre a produtividade. Com estes resultados, foi confirmado o benefício da atividade fosfocetolase sobre a produção de AG.

[0129] Os níveis de expressão dos genes da fosfocetolase não alteraram a tendência dos resultados. A produção de ácido glicólico foi melhorada com diferentes níveis de superexpressão dos 3 genes; *xfp01ec*, *fxpk01ec*, *xpk01e*, conduzida em pCL1920 ou em pBAC (dados não mostrados).

[0130] Os rendimentos são calculados da seguinte forma:

[0131] O volume do fermentador foi calculado adicionando-se, ao volume inicial, a quantidade de soluções adicionadas para regular o pH e alimentar a cultura e subtraindo-se o volume usado para amostragem e perdido por evaporação.

[0132] O volume dos lotes alimentados foi

continuamente seguido pesando-se o estoque de alimentação. A quantidade de glicose injetada foi, então, calculada com base no peso injetado, na densidade da solução e na concentração de glicose controlada pelo método de Brix ([Glicose]). O rendimento de AG foi expresso como se segue:

$$Y_{GA} = \frac{GA_f * V_f - GA_0 * V_0}{\text{Consumed glucose}}$$

$$R_{AG} = \frac{AG_f * V_f - AG_0 * V_0}{\text{glicose consumida}}$$

[0133] AG_0 e AG_f correspondem, respectivamente, às concentrações inicial e final de AG e V_0 e V_f , aos volumes inicial e final. A glicose consumida é expressa em g.

[0134] Ensaaios de D-Xilulose 5-Fosfato e Frutose 6-Fosfato Fosfocetolase com extrato bruto (X5PPK e F6PPK)

[0135] A atividade da fosfocetolase foi medida espectrofotometricamente como acetil-hidroxamato férrico produzido a partir do acetilfosfato produzido enzimaticamente de acordo com Racker et al., 1962 e Meile et al., 2001. A mistura reacional convencional de 0,075 ml consistia em fosfato de potássio 33,3 mM (pH 6,5), cloridrato de L-cisteína (1,9 mM), fluoreto de sódio (23 mM), iodoacetato de sódio (8 mM), D-frutose 6-fosfato (F6P) (100 mM) ou D-xilulose 5-fosfato (X5P) (27 mM) como substrato e o extrato bruto para iniciar a reação. Após incubação a 37 °C durante 10 ou 30 min, a reação enzimática foi interrompida

pela adição de 0,075 ml de cloridrato de hidroxilamina (2 M, pH 6,5). Após dez minutos à temperatura ambiente, 0,05 ml de ácido tricloroacético 15% (p/vol), 0,05 ml de HCl 4 M e 0,05 ml de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (5% [p/vol] em HCl 0,1 M) foram adicionados para o desenvolvimento da cor final do hidroxamato férrico. Após incubação a 25 °C sob agitação durante 5 min, a mistura foi centrifugada durante 5 min a 2250 x g, 200 µl de sobrenadante foram transferidos para uma nova microplaca para se medir a absorbância. A formação de hidroxamato férrico foi, então, quantificada espectrofotometricamente a 505 nm comparando-se com uma série de padrões de acetilfosfato entre 1,5 mM e 150 mM. Uma unidade de atividade fosfocetolase é definida como a quantidade de extrato que forma 1 mmol de acetilfosfato de acetila por min a partir ou de F6P ou de X5P. Foi subtraído o valor da atividade determinado sem substrato no ensaio. A atividade específica é expressa em mili-unidades por miligrama de proteína.

[0136] As atividades D-Xilulose 5-Fosfato e Frutose 6-Fosfato Fosfocetolase das cepas 10 a 12 são fornecidas na Tabela 8.

Tabela 8: Atividades D-Xilulose 5-Fosfato e 6-Fosfato fosfocetolase medidas no extrato bruto

Cepa	Atividade X5PPK	Atividade F6PPK mIU/mg
------	-----------------	------------------------

	mIU/mg	
Cepa 9	ND	ND
Cepa 10	690	250
Cepa 11	115	30
Cepa 12	650	ND

ND: Não detectável

[0137] As enzimas fosfocetolase codificadas por *xfp* de *Bifidobacterium animalis* e *fxpk* de *Bifidobacterium adolescentis* expressas em *E. coli* catalisam ambas as atividades sobre os substratos xilulose 5-fosfato e frutose 6-fosfato. No entanto, estas enzimas são mais ativas sobre o substrato Xilulose 5-fosfato do que sobre a frutose 6-fosfato, como pode ser visto na Tabela 8. Em contraste, a enzima fosfocetolase codificada por *xpk* de *Lactobacillus pentosus* expresso em *E. coli* foi exclusivamente ativa sobre o substrato Xilulose 5-fosfato.

[0138] Os resultados deste exemplo, mostrando a produção de Ácido Glicólico das cepas 10, 11 e 12 que portam diferentes enzimas fosfocetolase (FC) em comparação com uma cepa de referência 9 sem qualquer FC, demonstram que a atividade fosfocetolase melhora o rendimento do Ácido Glicólico por glicose consumida independentemente da especificidade para substrato da enzima (X5PPK ou F6PPK).

EXEMPLO 5: Melhorando a produção de Ácido glicólico tanto pela supressão da expressão de *ycdW* quanto pela superexpressão de genes heterólogos que codificam a enzima fosfocetolase em uma cepa recombinante de *E. coli*

superprodutora de ácido glicólico - Construção das cepas 13 a 17.

Construção das cepas 13 a 14: Supressão da expressão do gene *ycdW* de *E. coli* que codifica glioxilato/hidroxipiruvato redutase na cepa $\Delta ackA+pta$ AG1413

[0139] A cepa AG1413 possui duas cópias do gene *ycdW*, uma no cromossomo e uma no plasmídeo pME101-*ycdW*-TT07-*PaceA*-*aceA*-TT01.

[0140] Para deletar a cópia cromossômica de *ycdW* baseada na cepa AG1413, a deleção $\Delta ycdW::Km$, descrita no Exemplo 2, foi transferida por transdução de fago P1 (de acordo com o Protocolo 2) a partir de MG1655 $\Delta ycdW::Km$ para a cepa 2. Os transdutantes resistentes à canamicina foram selecionados e a presença da deleção de $\Delta ycdW::Km$ foi verificada por uma análise por PCR com oligonucleotídeos apropriados. A cepa retida foi denominada cepa 13.

[0141] Em seguida, o plasmídeo pAG0303 descrito no Exemplo 2, que superexpressa o gene *aceA* sem o gene *ycdW*, foi introduzido na cepa 13, dando origem à cepa 14.

Construção das cepas 15 a 16: Supressão da expressão do gene *ycdW* de *E. coli* que codifica glioxilato/hidroxipiruvato redutase na cepa 9 *pta* tipo selvagem

[0142] A cepa 9 possui duas cópias do gene *ycdW*, uma no cromossomo e uma no plasmídeo pME101-*ycdW*-TT07-*PaceA*-*aceA*-TT01.

[0143] Para deletar a cópia cromossômica de *ycdW* baseada na cepa 9, a deleção $\Delta ycdW::Km$, descrita no Exemplo 2, foi transferida por transdução de fago P1 (de acordo com o Protocolo 2) a partir de MG1655 $\Delta ycdW::Km$ para a cepa 8. Os transdutantes resistentes à canamicina foram selecionados e a presença da deleção de $\Delta ycdW::Km$ foi verificada por uma análise por PCR com oligonucleotídeos apropriados. A cepa retida foi denominada cepa 15.

[0144] Em seguida, o plasmídeo pAG0303 descrito no Exemplo 2, que superexpressa o gene *aceA* sem o gene *ycdW*, foi introduzido na cepa 15, dando origem à cepa 16.

Construção da cepa 17: Superexpressão de genes de *Bifidobacterium animalis* que codificam enzima fosfocetolase em uma cepa de *E. coli* recombinante superprodutora de ácido glicólico

[0145] A versão com códons harmonizados do gene *xfp01ec* de *Bifidobacterium animalis* que codifica a enzima fosfoetolase foi superexpressa na cepa 16.

[0146] Para superexpressar este gene na cepa 16, o plasmídeo *pBBR1MCS5-Ptrc01-xfp01ec* descrito no Exemplo 4 foi introduzido na cepa 16, dando origem à cepa 17.

[0147] Para testar diferentes níveis de superexpressão do gene da fosfocetolase, o gene *xfp01ec* também foi clonado em um plasmídeo com um número de cópias menor do que pBBR1: o vetor pCL1920 com baixo número de

cópias (Lerner & Inouye, 1990), pAG303 descrito no Exemplo 2.

[0148] Todas as modificações descritas acima também foram feitas com base na cepa 7.

[0149] O mesmo trabalho também foi realizado para os dois outros genes da foscoetolase, *fxpkOlec* e *xpkOlec*.

Desempenhos nos frascos de agitação

[0150] Primeiro, as cepas foram avaliadas em frascos de agitação como descrito no Exemplo 3.

Tabela 9: Rendimentos (R) de Ácido Glicoxílico (AGx) em g de AGx por grama de açúcar consumido pelas cepas produtoras em frascos de agitação. Para a definição precisa dos rendimentos de AGx/glicose, vide Exemplo 3.

Cepa	Rendimento de AGx (g.g ⁻¹)
Cepa 14	0,02
Cepa 16	0,02
Cepa 17	0,03

[0151] Como pode ser visto na Tabela 9 acima, a superexpressão do gene da fosfoetolase de *Bifidobacterium animalis* aumentou ligeiramente a produção de Ácido Glioxílico (cepa 17 versus cepa 14).

[0152] Os mesmos resultados, um aumento na produção de ácido glioxílico, também foram obtidos com as outras

enzimas fosfocetolase testadas (dados não mostrados).

Ensaio de D-Xilulose 5-Fosfato e Frutose 6-Fosfato
Fosfocetolase com extrato bruto (X5PPK e F6PPK)

[0153] A atividade fosfocetolase foi medida de acordo com o protocolo descrito acima no Exemplo 4. As atividades D-Xilulose 5-Fosfato e Frutose 6-Fosfato Fosfocetolase das cepas 16 e 17 são fornecidas na Tabela 10.

Tabela 10: Atividades de D-Xilulose 5-Fosfato e 6-Fosfato fosfocetolase medidas no extrato bruto

Cepa	Atividade X5PPK mIU/mg	Atividade F6PPK mIU/mg
Cepa 16	ND	ND
Cepa 17	710	300

ND: Não detectável

[0154] A enzima fosfocetolase codificada por *xfp* de *Bifidobacterium animalis* e *fxpk* de *Bifidobacterium adolescentis* expressa em *E. coli* catalisa ambas as atividades sobre os substratos Xilulose 5-fosfato e frutose 6-fosfato. A enzima foi mais ativa sobre o substrato Xilulose 5-fosfato.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brosius J, Erfle M, Storella J, (1985), J Biol Chem., 260(6):3539-41
- Datsenko KA & Wanner BL, (2000), Proc Natl Acad Sci U S A., 97: 6640-6645
- Cativiela C, Fraile JM, Garcia JI, Lazaro B, Mayoral JA, Pallares A, (2003), Green Chemistry, 5: 275-277

- Furukawa K, Inada H, Shibuya M, Yamamoto Y, (2016),
Org. Lett., 18(17): 4230-4233
- Isobe K & Nishise H, (1999), J. Biotechnol., 75:
265-271
- Job V, Marccone GL, Pilone MS, Pollegioni L, (2002),
J. Biol. Chem., 277(9): 6985-6993
- Kataoka M, Sasaki M, Hidalgo AR, Nakano M, Shimizu
S, (2001), Biosci. Biotechnol. Biochem, 65(10): 2265-2270
- Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris
MA, Roop RM 2nd, Peterson KM, (1995), Gene., 166(1):175-6
- Lerner CG, Inouye M, (1990), Nucleic Acids Res.,
18(15):4631
- Loewen & Switala, (1986), Biochem Cell
Biol., 64(7):638-46.
- Meile L, Rohr LM, Geissmann TA, Herensperger M,
Teuber M, (2001), J Bacteriol., 183 (9), 2929-2936
- Nishiya Y & Imanaka T, (1998), FEBS Letters, 438:
263-266
- Palmeros B, Wild J, Szybalski W, Le Borgne S,
Hernández-Chávez G, Gosset G, Valle F, Bolivar F., (2000),
Gene, 247(1-2): 255-64
- Papini M, Nookaew I, Siewer V, Nielsen J, (2012),
Appl. Microbiol. Biotechnol., 95: 1001-1010
- Posthuma CC, Bader R, Engelmann R, Postma PW,

Hengstenberg W, Pouwels PH, (2002), Appl. Environ. Microbiol., 68(9): 831-837

- Racker E, (1962), Methods Enzymol., 5, 276-280

- Sardari RRR, Dishisha T, Pyo SH, Hatti-Kaul R, (2014), J. Biotechnol., 192: 223-230

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a produção de ácido glicólico e/ou ácido glioxílico **caracterizado** pelo fato de que é a partir de carboidratos como única fonte de carbono usando-se pelo menos uma etapa de fermentação e um microrganismo modificado, em que, no referido microrganismo modificado:

- a expressão de pelo menos um gene escolhido entre *aceB*, *glcB*, *gcl* e *eda* está atenuada e,
- a expressão de pelo menos um gene que codifica Xilulose 5-Fosfato fosfoacetolase e/ou Frutose 6-Fosfato fosfocease está aumentada.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o gene que codifica a foscoetolase é escolhido dentre: o gene *xpkA* de *Lactobacillus pentosus*, o gene *xfp* de *Bifidobacterium animalis*, ou o gene *xfp* de *Bifidobacterium lactis*, ou seus genes homólogos.

3. Método para a produção de ácido glicólico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que o microrganismo modificado adicionalmente superexpressa o gene *ycdW* de *Escherichia coli* ou seus genes homólogos.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, para a produção de ácido glioxílico a partir de ácido glicólico, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionalmente as etapas de:

- opcionalmente, isolamento do ácido glicólico a partir do caldo de fermentação,
- conversão do ácido glicólico em ácido glioxílico ou por bioconversão a partir do ácido glicólico usando-se uma glicolato oxidase codificada por genes *gldDEFG* de *Escherichia coli* e uma catalase codificada pelos genes *kate* ou *katG* de *Escherichia coli*, ou por conversão química usando-se um catalisador de radicais nitroxila,
- recuperação do ácido glioxílico.

5. Método, de acordo coma reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que a glicolato oxidase e a catalase são expressas no mesmo microrganismo.

6. Método para a produção de ácido glioxílico, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que, no microrganismo modificado, pelo menos o gene *ycdW* de *Escherichia coli* está atenuado.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, para a produção de ácido glicólico a partir de ácido glioxílico, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionalmente as etapas de:

- opcionalmente, isolamento do ácido glioxílico a partir do caldo de fermentação,
- conversão do ácido glioxílico em ácido glicólico ou por bioconversão a partir do ácido glioxílico, usando-se

uma glioxilato redutase codificada pelo gene *ycdW* de *Escherichia coli* ou pelo gene *grxA* de *Rhizobium etli*, ou por conversão química, usando-se boroidreto de sódio,

- recuperação do ácido glicólico.

8. Método para a produção de ácido glioxílico a partir da glicina **caracterizado** pelo fato de que se colocam em contato a glicina e um microrganismo que superexpressa o gene que codifica a glicina oxidase de *Bacillus subtilis* e, opcionalmente, os genes *katE* ou *katG* que codificam catalase de *Escherichia coli*.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado** pelo fato de que o ácido glicólico é purificado por etapas de cristalização, destilação, extração líquido-líquido ou fermentação extrativa.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado** pelo fato de que o ácido glioxílico é purificado por etapas de troca iônica, cristalização, precipitação ou fermentação extrativa.

11. Microrganismo modificado para a produção de ácido glicólico ou de ácido glioxílico, **caracterizado** pelo fato de que

- a expressão de pelo menos um gene escolhido entre *aceB*, *glcB*, *gcl* e *eda* está atenuada e,
- a expressão de pelo menos um gene que codifica a

fosfocetolase está intensificada.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que o gene que codifica a foscoetolase é escolhido dentre: o gene *xpkA* de *Lactobacillus pentosus*, o gene *xfp* de *Bifidobacterium animalis*, ou o gene *xfp* de *Bifidobacterium lactis*, ou seus genes homólogos.

13. Microrganismo, de acordo com a reivindicação 11 ou 12, **caracterizado** pelo fato de que adicionalmente:

- superexpressa o gene *ycdW* de *Escherichia coli* ou seus genes homólogos para a produção de ácido glicólico, ou
- contém atenuação da expressão de pelo menos o gene *ycdW* de *Escherichia coli* para a produção de ácido glioxílico.

14. Microrganismo, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **caracterizado** pelo fato de que o microrganismo é escolhido dentre *Enterobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Corynebacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, ou levedura.

15. Microorganismo, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que o referido microorganismo é da espécie *Escherichia coli*.

Resumo da Patente de Invenção para: **"MÉTODOS E MICRORGANISMOS
PARA A PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLICÓLICO E/OU ÁCIDO GLIOXÍLICO"**

A presente invenção refere-se a métodos e microrganismos recombinantes úteis para a produção de ácido glicólico e/ou ácido glioxílico. Os métodos da invenção envolvem ou apenas uma etapa de fermentação dos microrganismos modificados da invenção ou uma etapa de fermentação dos microrganismos modificados da invenção e uma etapa de conversão ou biológica ou química do ácido glicólico ou do ácido glioxílico, o microrganismo da invenção que superexpressa um gene de fosfocetolase.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de Sequências R.03.049.PI-BR.txt
- Data de Geração do Código: 25/07/2019
- Hora de Geração do Código: 11:16:55
- Código de Controle:
 - Campo 1: 0F7FC2B1A85CE3B6
 - Campo 2: B139F8B53DBAEA11