



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

(11) BR 112020003867-9 B1



(22) Data do Depósito: 27/03/2019

(45) Data de Concessão: 12/04/2022

(54) Título: POLINUCLEOTÍDEO QUE TEM ATIVIDADE DE PROMOTOR, VETOR, MICRO-ORGANISMO DO GÊNERO CORYNEBACTERIUM, MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE UMA SUBSTÂNCIA-ALVO E PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FERMENTADA, E, COMPOSIÇÃO FERMENTADA

(51) Int.Cl.: C12N 15/77; C12N 9/10; C12N 9/14; C12P 13/04; C07K 14/34.

(30) Prioridade Unionista: 27/03/2018 KR 10-2018-0035156.

(73) Titular(es): CJ CHEILJEDANG CORPORATION.

(72) Inventor(es): JI YEON LEE; JIN SOOK CHANG; HYUNG JOON KIM; BYOUNG HOON YOON; SUN HYOUNG CHOI; YUNJUNG CHOI.

(86) Pedido PCT: PCT KR2019003565 de 27/03/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/190192 de 03/10/2019

(85) Data do Início da Fase Nacional: 27/02/2020

(57) Resumo: A presente revelação se refere a um promotor inovador e a um método de produção L-aminoácidos com uso do promotor, e mais especificamente, a um polinucleotídeo inovador que tem atividade de promotor, um vetor e um micro-organismo do gênero Corynebacterium que compreende o polinucleotídeo, um método de produção de L-aminoácidos e uma composição fermentada com uso do micro-organismo e de uma composição fermentada.

POLINUCLEOTÍDEO QUE TEM ATIVIDADE DE PROMOTOR, VETOR, MICRO-ORGANISMO DO GÊNERO CORYNEBACTERIUM, MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE UMA SUBSTÂNCIA-ALVO E PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FERMENTADA, E, COMPOSIÇÃO FERMENTADA

[CAMPO DA TÉCNICA]

[001] A presente invenção refere-se a um promotor inovador e um método de produção L-aminoácido com uso do promotor, e mais especificamente, a um polinucleotídeo inovador que tem atividade de promotor, um vetor e um micro-organismo do gênero *Corynebacterium* que compreende o polinucleotídeo, um método de produção L-aminoácidos e uma composição fermentada com uso do micro-organismo e da composição fermentada.

[ANTECEDENTES DA TÉCNICA]

[002] Os L-aminoácidos são as unidades estruturais básicas das proteínas e são usados como materiais importantes, como matérias-primas farmacêuticas, aditivos alimentares, rações animal, suplementos nutricionais, pesticidas, bactericidas etc. Entre esses, o L-ácido glutâmico é um aminoácido representativo produzido por fermentação e tem um sabor único e distinto (sabor umami) e, portanto, é um aminoácido importante amplamente usado no campo alimentar, bem como no campo médico e em outros campos de ração animal. Além disso, a glicina é usada principalmente como intensificador de sabor na indústria alimentícia por causa de seu sabor doce e é usada com intensificadores de sabor naturais para melhorar o sabor. Além disso, a glicina também é usada por sua atividade antioxidante, ação tampão etc., e em termos de medicamento, é usada em soluções de infusão, antiácidos, preparações com vários aminoácidos e suplementos nutricionais.

[003] Um método típico para a produção de aminoácidos inclui um método de fermentação com uso de um micro-organismo do gênero

Brevibacterium ou *Corynebacterium* (Amino Acid Fermentation, Gakkai Shuppan Center: 195-215, 1986) ou com uso de *Escherichia coli* ou micro-organismos dos gêneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Penicillium*, *Klebsiella*, *Erwinia*, *Pantoea* etc. (Patentes números US 3.220.929 e 6.682.912). Ademais, tais aminoácidos também são produzidos por um método industrial, com uso de um processo sintético, como o método de ácido monocloroacético, o método de Strecker ou similares.

[004] Adicionalmente, vários estudos foram realizados para produzir eficientemente aminoácidos; por exemplo, esforços foram feitos para desenvolver micro-organismos ou tecnologias de processo de fermentação para produzir aminoácidos com alta eficiência. Particularmente, métodos de abordagem para materiais específicos para os alvos foram desenvolvidos, como aprimoramento da expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese dos aminoácidos na cepa do gênero *Corynebacterium* ou exclusão de genes desnecessários para a biossíntese de aminoácidos (Patetes números KR 10-0924065 e 1208480). Além desses métodos, também foi utilizado um método para remover genes que não estão envolvidos na produção de aminoácidos e um método para remover genes cujas funções para a produção de aminoácidos não são especificamente conhecidas. No entanto, ainda existe uma necessidade crescente de estudar métodos para a produção eficiente de aminoácidos com alto rendimento.

[INVENÇÃO]

[PROBLEMA DA TÉCNICA]

[005] Os presentes inventores fizeram esforços para desenvolver um método com capacidade para produzir simultaneamente vários aminoácidos e, como resultado, desenvolveram um novo polinucleotídeo com a atividade de promotor da presente invenção e constataram que o novo polinucleotídeo pode melhorar a produtividade da glicina enquanto manter a produtividade de ácido glutâmico da cepa, completando assim a presente invenção.

[SOLUÇÃO DA TÉCNICA]

[006] Um objetivo da presente invenção é fornecer um polinucleotídeo que tem atividade de promotor, em que, na sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 1, os 53º e 55º nucleotídeos são substituídos por T; ou os 53º e 55º nucleotídeos são substituídos por T e o 60º nucleotídeo é substituído por G.

[007] Outro objetivo da presente invenção é fornecer um vetor que compreende o polinucleotídeo; e um gene que codifica uma proteína-alvo ligada de maneira funcional ao polinucleotídeo.

[008] Ainda outro objetivo da presente invenção é fornecer um micro-organismo do gênero *Corynebacterium* que compreende o polinucleotídeo; e um gene que codifica uma proteína-alvo ligada de maneira funcional ao polinucleotídeo.

[009] Ainda outro objetivo da presente invenção é fornecer um método de produção a uma substância-alvo, que compreende: cultivar o microrganismo do gênero *Corynebacterium* em um meio; e recuperar uma substância-alvo do meio.

[0010] Ainda outro objetivo da presente invenção é fornecer um método de preparação a uma composição fermentada, que compreende a fermentação cultivando-se o microrganismo do gênero *Corynebacterium* em um meio.

[0011] Ainda outro objetivo da presente invenção é fornecer uma composição fermentada preparada pelo método acima.

[EFEITOS VANTAJOSOS]

[0012] O promotor inovador da presente invenção é introduzido em um micro-organismo que produz aminoácidos para aumentar as quantidades de produção dos aminoácidos nos micro-organismos. Em particular, no caso de produzir os aminoácidos usando-se o promotor inovador, a glicina, que foi preparada por um método sintético existente, pode ser produzida por um

método de fermentação e, além disso, o ácido glutâmico e a glicina podem ser produzidos simultaneamente. Portanto, o promotor inovador pode ser útil para a produção dos aminoácidos. Além disso, a presente invenção pode melhorar o sabor e a palatabilidade de um produto fermentado, regulando-se as quantidades de ácido glutâmico e glicina no produto fermentado para a preparação de um caldo fermentado e sua aplicação em produtos sazonais.

[MELHOR MODO]

[0013] Doravante, a presente invenção será descrita em detalhes. Enquanto isso, cada descrição e modalidade revelada na presente invenção pode ser aplicada a outras descrições e modalidades. Ou seja, todas as combinações de vários elementos revelados na presente invenção se enquadram no escopo da presente invenção. Além disso, as descrições específicas reveladas abaixo não devem ser interpretadas como limitativas do escopo da presente invenção.

[0014] Para alcançar os objetivos acima, um aspecto da presente invenção fornece um polinucleotídeo que tem atividade de promotor, em que, na sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 1, os 53º e 55º nucleotídeos são substituídos por T; ou os 53º e 55º nucleotídeos são substituídos por T e o 60º nucleotídeo é substituído por G.

[0015] Conforme usado no presente documento, o termo “sequência e nucleotídeos de SEQ ID NO: 1” pode se referir a uma parte da sequência de promotores do gene da fosforibosil-ATP pirofosfatase (HisE).

[0016] Em particular, o termo “fosforibosil-ATP pirofosfatase” se refere a uma enzima envolvida na rota de síntese de histidina, na qual a L-histidina é sintetizada a partir de 1-difosfato de 5-fosfo-alfa-D-ribose e pode ser intercambiável como “HisE” na presente invenção. A rota de síntese de histidina consiste em um total de nove etapas que relacionam nove enzimas respectivamente (HisG-HisE-HisI-HisA-HisH-HisB-HisC-HisN-HisD), em que o HisE se relaciona com a segunda etapa após a ATP

fosforibosiltransferase (HisG), que se refere à primeira etapa.

[0017] Conforme usado no presente documento, o termo “promotor” se refere a uma sequência de um nucleotídeo não traduzido a montante de uma região de codificação, que inclui um domínio de ligação à polimerase e tem uma atividade de iniciação da transcrição para um gene-alvo do promotor no mRNA, que é um domínio de DNA ao qual uma polimerase se liga para iniciar a transcrição de um gene e pode estar localizado na região 5’ da área de iniciação da transcrição de mRNA. Em particular, o gene-alvo do promotor pode ser um gene que codifica fosforibosil-ATP pirofosfatase, mas não está limitado a isso.

[0018] Na presente invenção, o polinucleotídeo que tem a atividade de um promotor que inclui a sequência de polinucleotídeos consiste em SEQ ID NO: 2 ou 3 podem ser chamados de forma intercambiável pelos termos “o polinucleotídeo”, “a sequência de nucleotídeos da presente invenção”, “polinucleotídeo da presente invenção”, “promotor hisEG” etc. Ademais, esses termos podem ser usados na presente invenção.

[0019] O polinucleotídeo da presente invenção é um no qual uma sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 1, isto é, uma sequência de promotores do gene *hisEG*, é modificada e, especificamente, tal modificação pode ser uma na qual, na sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 1, os 53^o e 55^o nucleotídeos são substituídos por T; ou os 53^o e 55^o nucleotídeos são substituídos por T e o 60^o nucleotídeo é substituído por G. Conseqüentemente, o polinucleotídeo pode ser um que consiste na sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 2 ou 3.

[0020] Em particular, o termo “modificação” se refere a uma mudança fenotípica que é genética ou não geneticamente estável e pode ser intercambiavelmente chamado pelo termo “mutação” na presente invenção.

[0021] Especificamente, o polinucleotídeo pode ter atividade de promotor que é modificada (aumentada ou diminuída) em relação à atividade

de um polinucleotídeo, que não inclui a modificação de polinucleotídeo. Consequentemente, a expressão de um gene-alvo ligado de maneira funcional ao polinucleotídeo e a atividade de uma proteína codificada pelo gene-alvo podem ser reguladas (aumentadas ou diminuídas) e, além disso, a expressão de genes diferentes do gene-alvo pode ser regulada.

[0022] Para os objetivos da presente invenção, o polinucleotídeo pode ser um para melhorar a expressão do gene *hisE*. Adicionalmente, os genes, *hisE* e *hisG*, consistem em operões e, portanto, o polinucleotídeo pode ainda ter um propósito de melhorar a expressão do gene *hisG*.

[0023] Adicionalmente, o polinucleotídeo pode ser um para aumentar a quantidade de produção de glicina.

[0024] Em particular, o termo “HisG”, conforme usado no presente documento, se refere à “ATP fosforibosiltransferase” e é uma enzima envolvida na rota de síntese de histidina. A rota de síntese de histidina consiste em um total de nove enzimas (HisG-HisE-HisI-HisA-HisH-HisB-HisC-HisN-HisD), em que o HisG constitui a primeira etapa.

[0025] Consequentemente, os genes, *hisE* e *hisG*, consistem em operões e, portanto, o polinucleotídeo da presente invenção pode regular a transcrição do gene *hisE*, bem como do gene *hisG*. Portanto, o gene-alvo pode ser um gene que codifica ATP fosforibosiltransferase fosforibosil-ATP pirofosfatase (HisE), um gene que codifica ATP fosforibosiltransferase (HisG) ou uma combinação dos mesmos.

[0026] Sabe-se que o HisE e HisG estão envolvidos na produção de histidina, mas a relação do mesmo com a produção de glicina não é conhecida e foi identificada pela primeira vez pelos presentes inventores. Em particular, os presentes inventores confirmaram pela primeira vez o aumento da atividade das enzimas HisE e HisG devido à superexpressão de *hisE* e/ou *hisG* pela modificação do promotor do gene *hisEG*, bem como os efeitos de aumento e que mantém a quantidade de produção de glicina devido à mesma.

[0027] No presente documento, o termo “L-ácido glutâmico” ou “L-glutamato” se refere a um tipo de aminoácido e é classificado como um aminoácido não essencial. O L-ácido glutâmico é conhecido por ser o neurotransmissor excitatório mais comum no sistema nervoso central. Ademais, visto que L-ácido glutâmico tem sabor umami, o glutamato monossódico (MSG) foi desenvolvido a partir do mesmo e é amplamente usado como intensificador de sabor. Geralmente é produzido através da fermentação de micro-organismos que produzem ácido glutâmico.

[0028] Adicionalmente, o termo “glicina” se refere a um aminoácido que tem uma forma cristalina incolor e um sabor doce. A glicina é usada principalmente como intensificador de sabor para alimentos e, em termos de medicamento, é usada em soluções de infusão, antiácidos, preparações com vários aminoácidos e suplementos nutricionais. Em geral, a glicina é preparada por um método sintético industrial, como o método de ácido monocloroacético, o método de Strecker ou similares. No entanto, existe um inconveniente em que, uma vez que uma mistura de aminoácidos do tipo D e do tipo L é produzida quando se usa o método sintético, é necessário realizar a resolução óptica. Portanto, é necessário preparar a glicina por um método de fermentação que tem várias vantagens, isto é, as condições de reação são moderadas, a produção em massa é possível em um curto período de tempo, o processo é favorável ao meio ambiente e o material produzido é biodegradável.

[0029] Especificamente, o polinucleotídeo pode ser um composto da sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 2 ou 3.

[0030] Adicionalmente, a sequência de nucleotídeos da presente invenção pode ser modificada por métodos de mutagênese conhecidos, como evolução dirigida, mutagênese sítio-dirigida *etc.*

[0031] Portanto, o polinucleotídeo pode compreender um polinucleotídeo que inclui a sequência de nucleotídeos que tem uma

homologia à sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 2 ou 3 de pelo menos 60%, especificamente pelo menos 70%, mais especificamente pelo menos 80%, e ainda mais especificamente pelo menos 83%, 84%, 88%, 90%, 93%, 95% ou 97%. É evidente que uma sequência de polinucleotídeos que tem tal homologia, uma parte da qual é excluída, modificada, substituída ou adicionada, está também dentro do escopo da presente invenção, desde que a sequência de polinucleotídeos resultante tem uma atividade biológica substancialmente equivalente ou que corresponde à sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 2 ou 3.

[0032] Conforme usado no presente documento, o termo “homologia” pode indicar o grau de correspondência com a dada sequência de nucleotídeos e pode ser apresentado como uma porcentagem (%). Na presente invenção, uma sequência de homologias que tem uma atividade que é idêntica ou similar à dada sequência de nucleotídeos é apresentada como “% de homologia”. A homologia à sequência de nucleotídeos pode ser determinada por, por exemplo, algoritmo BLAST (consulte Karlin e Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 90, 5.873(1993) ou FASTA (consulte Pearson, *Methods Enzymol.*, 183, 63, 1990). Com base nesse algoritmo, programas chamados BLASTN ou BLASTX foram desenvolvidos (consulte <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

[0033] Conforme usado no presente documento, o termo “condições estritas” se refere a condições que permitem hibridização específica entre polinucleotídeos. Por exemplo, tais condições estritas são especificamente descritas na literatura (por exemplo, J. Sambrook *et al*). Por exemplo, as condições estritas podem incluir condições em que genes que têm uma homologia alta (por exemplo, 60% ou mais, especificamente 90% ou mais, mais especificamente 95% ou mais, ainda mais especificamente 97% ou mais e ainda mais especificamente 99% ou mais) pode hibridizar entre si, enquanto genes que têm uma homologia menor não pode hibridizar

entre si; ou condições para hibridização meridional convencional (isto é, condições para lavar uma vez e especificamente duas ou três vezes a uma concentração e temperatura de sal que corresponde a 60 °C, 1×SSC, 0,1% SDS, especificamente a 60 °C, 0,1×SSC, 0,1% SDS; e mais especificamente a 68 °C, 0,1×SSC, 0,1% SDS). Hibridação exige que dois nucleotídeos tenham sequências complementares, embora incompatibilidades entre bases sejam possíveis dependendo da severidade de hibridação. O termo “complementar” é usado para descrever a relação entre bases nucleotídicas que têm capacidade para serem hibridizadas entre si. Por exemplo, com relação ao DNA, adenosina é complementar à timina e citosina é complementa à guanina. Portanto, a presente invenção também pode incluir sequências de nucleotídeos substancialmente similares bem como fragmentos de polinucleotídeo isolados complementares à sequência toda.

[0034] Especificamente, o polinucleotídeo que tem homologia pode ser detectado com o uso de condições de hibridização, que inclui uma etapa de hibridização a um valor T_m de 55 °C e com o uso das condições descritas acima. Além disso, o valor T_m pode ser 60 °C, 63 °C ou 65 °C, mas não se limita a esses. Um indivíduo versado na técnica pode ajustar apropriadamente o valor T_m de acordo com seu propósito. A estringência apropriada para hibridizar os polinucleotídeos depende do comprimento e do grau de complementaridade dos polinucleotídeos, e as variáveis são bem conhecidas na técnica (consulte Sambrook *et al.*, supra, 9,50 a 9,51, 11,7 a 11,8).

[0035] Em particular, a expressão “consiste na sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 2 ou 3” significa que, como quando se usa uma enzima de restrição, a adição, exclusão e/ou mutação de um nucleotídeo não é excluída, o que pode ocorrer durante o processo de ligação a um gene-alvo quando o polinucleotídeo é ligado ao gene-alvo e usado como um promotor.

[0036] Por exemplo, o polinucleotídeo que tem a atividade de um promotor que consiste na sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 2 ou 3

pode ser incluído sem limitação se incluir a sequência de nucleotídeos que tem a atividade de promotor da presente invenção e que é hibridizado sob condições estridentes com uma sequência complementar a toda ou a uma parte da sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 2 ou 3.

[0037] Além disso, o polinucleotídeo da presente invenção pode ser ligado de maneira funcional a um gene que codifica uma proteína-alvo.

[0038] Conforme usado no presente documento, o termo “sequência reguladora de expressão de gene” se refere a uma sequência que inclui o polinucleotídeo da presente invenção e tem capacidade para expressar um gene-alvo ligado de maneira funcional ao polinucleotídeo.

[0039] Um versado na técnica pode ser capaz de tentar melhorar a expressão do gene-alvo modificando-se a sequência reguladora de gene que inclui um promotor, por exemplo, o aprimoramento da expressão de gene pela modificação de um códon de iniciação. Em uma modalidade, a modificação pode ser uma substituição do códon de iniciação de 'GTG' para 'ATG'.

[0040] Conforme usado no presente documento, o termo “ligado de maneira funcional” significa que o polinucleotídeo da presente invenção com atividade promotora está funcionalmente ligado à sequência de genes para iniciar e mediar a transcrição de um gene-alvo. A ligação operacional com a sequência de genes pode ser alcançada com uso de uma técnica recombinante de gene conhecida na técnica e a clivagem e ligação de DNA de sítio específico podem ser realizadas usando-se uma enzima de restrição e ligase conhecida na técnica, mas não estão limitadas a mesma.

[0041] Além disso, a sequência reguladora de expressão de gene da presente invenção pode incluir ainda qualquer sequência operadora para regular a transcrição de genes, além de promotores para realizar a transcrição de genes, bem como uma sequência que codifica um sítio de ligação de ribossomo de mRNA adequado, DNA para regular a rescisão de transcrição e tradução, etc.

[0042] Por exemplo, uma sequência reguladora adequada para procariontes pode ainda incluir sítios de ligação de ribossomo além de promotores, mas não está limitada a isso. O polinucleotídeo da presente invenção que tem atividade de promotor pode consistir em uma sequência para regular a expressão de gene conforme descrito acima, conforme exigido por um versado na técnica.

[0043] Na presente invenção, o gene-alvo se refere a um gene que codifica uma proteína-alvo cuja expressão deve ser regulada em um micro-organismo.

[0044] Por exemplo, o gene pode ser um gene envolvido na produção de aminoácidos como ácido glutâmico, glicina, histidina etc., mas não está limitado ao mesmo. Especificamente, o gene pode ser um gene que codifica uma enzima relacionada à biossíntese de histidina, mas não está limitado a mesma. Mais especificamente, o gene pode ser um gene que codifica HisE e/ou HisG, mas não está limitado ao mesmo. Por exemplo, o gene hisE e o gene hisG podem constituir um operão e o polinucleotídeo da presente invenção pode aumentar a atividade transcricional do hisE e/ou hisG. Adicionalmente, o hisE e hisG podem ser genes endógenos ou estranhos e podem incluir mutações para regular suas atividades. Por exemplo, o HisG pode incluir mutação de liberação de inibição de retroalimentação de histidina. A sequência do gene que codifica o HisE ou HisG pode ser facilmente obtida por um versado na técnica através de um banco de dados conhecido como o GenBank dos Institutos Nacionais da Saúde (NIH).

[0045] Para os objetivos da presente invenção, a sequência reguladora de expressão de gene pode aumentar a expressão dos genes que codificam as enzimas envolvidas na síntese de histidina e, especificamente, pode aumentar a expressão do gene hisE e/ou do gene hisG.

[0046] Ainda outro aspecto da presente invenção fornece um vetor que compreende o polinucleotídeo; e um gene que codifica uma proteína-alvo

ligada de maneira funcional ao polinucleotídeo, a sequência reguladora da expressão de gene e um vetor que compreende o gene que codifica uma proteína-alvo.

[0047] O polinucleotídeo é conforme descrito acima.

[0048] Especificamente, a proteína-alvo pode ser fosforibosil-ATP pirofosfatase (HisE), ATP fosforibosiltransferase (HisG) ou uma combinação dos mesmos. Como proteínas-alvo, HisE e HisG podem incluir uma proteína que tem uma homologia e podem ser aquelas em que parte do aminoácido (ou aminoácidos) é modificada. Em uma modalidade, ATP fosforibosiltransferase (HisG) pode ser uma na qual os 233^o e 235^o aminoácidos da sequência de aminoácidos HisG de SEQ ID NO: 16 são substituídos por histidina (H) e glutamina (Q), respectivamente.

[0049] Conforme usado no presente documento, o termo “vetor” se refere a uma molécula de DNA artificial com um material genético com capacidade para expressar um gene-alvo em um hospedeiro adequado e se refere a uma construção de DNA que inclui o polinucleotídeo ou uma sequência reguladora de expressão de gene adequada e uma sequência de nucleotídeos do gene que codifica uma proteína-alvo ligada de maneira funcional à sequência reguladora.

[0050] O vetor usado na presente invenção não é particularmente limitado desde que possa ser expresso em uma célula hospedeira e qualquer vetor conhecido na técnica pode ser usado para transformar a célula hospedeira. Exemplos do vetor convencional podem incluir plasmídeos naturais ou recombinantes, cosmídeos, vírus e bacteriófagos.

[0051] Por exemplo, como um vetor fágico ou vetor cosmídeo, podem ser utilizados pWE15, M13, λLB3, λBL4, λIXII, λASHII, λAPII, λt10, λt11, Charon4A, Charon21A, etc.; e como um vetor plasmídico, podem ser usados aqueles com base em pBR, pUC, pBluescriptII, pGEM, pTZ, pCL, pET, etc.

[0052] Adicionalmente, um promotor endógeno no cromossomo pode

ser substituído pelo polinucleotídeo da presente invenção que tem atividade de promotor através do vetor para inserção cromossômica na célula hospedeira. Por exemplo, os vetores pECCG117, pDZ, pACYC177, pACYC184, pCL, pUC19, pBR322, pMW118, pCC1BAC, pCES208, pXMJ19 etc. podem ser usados, mas não estão limitados a isso.

[0053] Adicionalmente, a inserção do polinucleotídeo no cromossomo pode ser realizada por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo, por recombinação homóloga.

[0054] Visto que o vetor da presente invenção pode ser inserido no cromossomo por indução de uma recombinação homóloga, o marcador de seleção pode ser adicionalmente incluído para confirmar uma inserção de gene bem-sucedida no cromossomo. Um marcador de seleção é para examinar as células que são transformadas com o vetor, em outras palavras, para determinar se o polinucleotídeo está inserido. Os marcadores que fornecem fenótipos selecionáveis, como resistência a medicamentos, auxotrofia, resistência a agentes tóxicos ou expressão de proteínas de superfície, podem ser usados. Em um ambiente tratado com um agente seletivo, apenas as células que expressam o marcador de seleção podem sobreviver, ou as células mostram um fenótipo diferente e, portanto, as células transformadas com sucesso podem ser selecionadas por esse método.

[0055] Conforme usado no presente documento, o termo “transformação” se refere à introdução do vetor que compreende o polinucleotídeo ou a sequência reguladora de expressão de gene e o gene que codifica uma proteína-alvo na célula hospedeira, a fim de permitir a expressão do gene na célula hospedeira. Além disso, desde que o gene-alvo possa ser expresso na célula hospedeira, não importa se o polinucleotídeo transformado e o gene transformado que codifica o gene-alvo estão localizados no cromossomo da célula hospedeira ou fora do cromossomo, e ambos os casos estão incluídos.

[0056] O método de transformação pode incluir todos os métodos para introduzir a sequência reguladora de expressão de gene e o gene que codifica uma proteína-alvo na célula, e pode ser realizado selecionando-se uma técnica padrão adequada conhecida na técnica, que depende da célula hospedeira. Por exemplo, uma técnica padrão adequada pode ser selecionada entre eletroporação, precipitação com fosfato de cálcio (CaPO₄), precipitação com cloreto de cálcio (CaCl₂), micro injeção, uma técnica de polietilenoglicol (PEG), uma técnica DEAE-dextrano, técnica lipossômica catiônica e uma técnica de acetato-DMSO de lítio, mas não se limita a mesma.

[0057] Ainda outro aspecto da presente invenção fornece um micro-organismo do gênero *Corynebacterium* que compreende o polinucleotídeo; e um gene que codifica um gene-alvo ligado de maneira funcional ao polinucleotídeo.

[0058] O polinucleotídeo e o gene que codificam um gene-alvo ligado de maneira funcional ao polinucleotídeo são como descritos acima.

[0059] Conforme usado no presente documento, o termo “micro-organismo” inclui todos os microrganismos do tipo selvagem e um micro-organismo geneticamente modificado natural ou artificialmente, e pode ser um micro-organismo com um mecanismo atenuado ou reforçado particular devido à inserção de um gene estranho ou reforço ou atenuação de atividade de um gene endógeno.

[0060] Na presente invenção, o micro-organismo pode incluir o polinucleotídeo, especificamente o polinucleotídeo e/ou um gene que codifica um gene-alvo ligado de maneira funcional ao polinucleotídeo. Alternativamente, o micro-organismo pode incluir o polinucleotídeo ou a sequência reguladora de expressão de gene, e o vetor que inclui o polinucleotídeo ou a sequência reguladora de expressão de gene e o gene que codifica uma proteína-alvo, mas não está limitado a isso. Ademais, o polinucleotídeo, o gene que codifica a proteína-alvo e o vetor podem ser

introduzidos no micro-organismo por transformação, mas não estão limitados ao mesmo. Além disso, desde que o gene possa ser expresso no micro-organismo, não importa se o polinucleotídeo e o gene que codifica uma proteína-alvo estão localizados no cromossomo ou fora do cromossomo.

[0061] Para os objetivos da presente invenção, o micro-organismo que inclui o polinucleotídeo e o gene que codifica uma proteína-alvo pode ser aquele em que a quantidade de produção de ácido glutâmico é mantida e a quantidade de produção de glicina aumentada.

[0062] Por exemplo, o micro-organismo pode ser aquele em que a atividade de HisE e/ou HisG é aprimorada.

[0063] Na presente invenção, o microrganismo pode ser incluído sem limitação, desde que seja um microrganismo no qual o polinucleotídeo da presente invenção com atividade de promotor seja introduzido para que funcione como um promotor.

[0064] Especificamente, o microrganismo pode ser um microrganismo do gênero *Corynebacterium*; mais especificamente pode ser *Corynebacterium glutamicum* ou *Corynebacterium flavum*; e ainda mais especificamente pode ser *Corynebacterium glutamicum*, mas não está limitado a isso.

[0065] Ainda outro aspecto da presente invenção fornece um método de produção a uma substância-alvo, que compreende: cultivar o microrganismo do gênero *Corynebacterium* em um meio; e recuperar uma substância-alvo do meio.

[0066] O polinucleotídeo e o micro-organismo são como descritos acima.

[0067] Na presente invenção, a substância-alvo pode ser um aminoácido. Especificamente, o aminoácido pode ser um aminoácido do tipo L, salvo indicação em contrário, e pode ser um aminoácido selecionado do grupo que consiste em glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, treonina,

serina, cisteína, glutamina, metionina, aspartato, asparagina, ácido glutâmico, lisina, arginina, histidina, fenilalanina, tirosina, triptofano, prolina e uma combinação dos mesmos, mas não está limitado aos mesmos.

[0068] Mais especificamente, o aminoácido pode ser ácido glutâmico, glicina ou uma combinação dos mesmos, mas não está limitado aos mesmos.

[0069] Conforme usado no presente documento, o termo “cultura” se refere à cultura de um micro-organismo sob condições ambientais artificialmente controladas. Na presente invenção, o método de produção de uma substância-alvo com uso de um micro-organismo com o polinucleotídeo pode ser executado por um método amplamente conhecido na técnica. Especificamente, a cultura pode ser executada em um processo em batelada ou em um processo contínuo, como um processo em batelada alimentado ou um processo repetido em batelada alimentado, mas não está limitado a isso. O meio usado para a cultura precisa atender aos requisitos de uma cepa específica empregada. O meio de cultura adequado para o cultivo da cepa de *Corynebacterium* é conhecido na técnica (por exemplo, Manual of Methods for General Bacteriology da Sociedade Americana de Bacteriologia, Washington DC, EUA, 1981).

[0070] As fontes de carbono que podem ser usadas no meio de cultura podem ser sacarídeos e carboidratos, como glicose, sacarose, lactose, frutose, maltose, amido e celulose; óleos e lipídios, como óleo de soja, óleo de semente de girassol, óleo de amendoim e óleo de coco; ácidos graxos como ácido palmítico, ácido estérico, ácido linoleico; álcoois como glicerol e etanol; e ácidos orgânicos como ácido acético. Esses materiais podem ser usados separadamente ou em combinação, mas não estão limitados aos mesmos.

[0071] Exemplos de fontes de nitrogênio que podem ser usadas incluem peptona, extrato de levedura, caldo, extrato de malte, licor de milho, farelo de soja e ureia ou compostos inorgânicos, como sulfato de amônio,

cloreto de amônio, fosfato de amônio, carbonato de amônio e nitrato de amônio. Essas fontes de nitrogênio também podem ser usadas separadamente ou em combinação, mas não estão limitadas as mesmas.

[0072] As fontes de fósforo que podem ser usadas no meio de cultura podem incluir hidrogenofosfato dipotássico, di-hidrogenofosfato de potássio ou sais que contêm sódio correspondentes. Ademais, o meio de cultura pode conter sais metálicos essenciais para o crescimento das células e pode ser suplementado com materiais essenciais para o crescimento, como aminoácidos e vitaminas, além dos materiais acima. Além disso, podem ser usados precursores adequados para o meio de cultura. As substâncias cruas acima podem ser adequadamente alimentadas na cultura de maneira descontínua ou contínua.

[0073] Durante a cultura do microrganismo, o pH da cultura pode ser ajustado por um composto básico adequado, como hidróxido de sódio, hidróxido de potássio ou amônia, ou um composto ácido, como ácido fosfórico ou ácido sulfúrico. A formação de espuma pode ser ajustada por um agente anti-esponjamento, como um éster de poliglicol de ácidos graxos. A condição aeróbica da cultura pode ser mantida através da introdução de oxigênio ou misturas de gás que contêm oxigênio (por exemplo, ar).

[0074] A temperatura da cultura (meio) pode ser geralmente de 20 °C a 45 °C, especificamente de 25 °C a 40 °C. A cultura pode continuar até que a quantidade desejada de produção da substância-alvo seja obtida, especificamente por 10 horas a 160 horas.

[0075] A recuperação da substância-alvo da cultura (meio) pode ser executada por um método de separação convencional conhecido na técnica. Para o método de separação, métodos como centrifugação, filtração, cromatografia, cristalização etc. podem ser usados. Por exemplo, um sobrenadante obtido por centrifugação do meio de cultura a uma velocidade baixa para remover a biomassa pode ser separado por cromatografia de troca

iônica, mas não está limitado a isso. Em um método alternativo, a substância-alvo pode ser recuperada sem um processo de purificação adicional, realizando-se processos de separação e filtração de células bacterianas a partir de um produto de cultura (meio). Em outro método alternativo, a substância-alvo pode ser recuperada e a etapa de recuperação pode incluir ainda um processo de purificação.

[0076] Ainda outro aspecto da presente invenção fornece um método de preparação de uma composição fermentada, que compreende a fermentação pela cultura do microrganismo do gênero *Corynebacterium* em um meio.

[0077] Ainda outro aspecto da presente invenção fornece uma composição fermentada preparada pelo método acima.

[0078] O polinucleotídeo e o microrganismo são conforme descritos acima, e a etapa de cultura do microrganismo em um meio é também conforme descrito acima.

[0079] Conforme usado no presente documento, o termo “a composição fermentada” se refere a uma composição obtida cultivando-se o micro-organismo da presente invenção em um meio. Além disso, a composição fermentada pode incluir uma composição na forma de um líquido ou pó obtido após a cultura do microrganismo seguido de um pós-tratamento adequado. Em particular, o processo de pós-tratamento adequado pode incluir, por exemplo, um processo de cultura de um microrganismo, um processo de remoção de células bacterianas, um processo de concentração, um processo de filtração e um processo de mistura de veículos e pode incluir ainda um processo de secagem. Em alguns casos, o processo pós-tratamento pode não incluir um processo de purificação. A composição fermentada, obtida cultivando-se o micro-organismo da presente invenção, é caracterizada por a quantidade de produção de ácido glutâmico ser aumentada enquanto a quantidade de produção de ácido láctico é reduzida, possibilitando assim

proporcionar um sabor otimizado.

[0080] Além disso, “a composição fermentada” não exclui produtos sazonais (por exemplo, produtos de sopa em pó, produtos sazonais para lanches etc.) que contêm a composição na forma de um líquido ou pó. Além disso, a “composição fermentada” não exclui casos em que uma substância obtida por um processo de não fermentação ou outra substância obtida por um processo não natural é ainda incluída, desde que a composição obtida cultivando-se o microrganismo da presente invenção esteja contida no mesmo.

[MODO PARA A INVENÇÃO]

[0081] Doravante, a presente invenção será descrita em detalhes com as modalidades exemplificativas anexas. No entanto, as modalidades exemplificativas reveladas no presente documento têm apenas propósitos ilustrativos e não devem ser interpretadas como limitantes do escopo da presente invenção.

EXEMPLO 1: SELEÇÃO DE CEPA MUTANTE PARA AUMENTAR PRODUTIVIDADE DE GLICINA

EXEMPLO 1-1: INDUÇÃO DE MUTAÇÃO ALEATÓRIA POR IRRADIAÇÃO UV

[0082] Para selecionar cepas mutantes com produtividade de glicina aprimorada, isto é, produtos alvo de fermentação, *Corynebacterium glutamicum* do tipo selvagem (ATCC13869) foi colocado em placas em meio nutritivo que contém ágar e cultivado a 30 °C por 16 horas. Centenas de colônias assim obtidas foram irradiadas com UV à temperatura ambiente para induzir uma mutação aleatória no genoma da cepa.

EXEMPLO 1-2: EXPERIMENTO EM TÍTULO DE FERMENTAÇÃO DE CEPA INDUTORA DE MUTAÇÃO E SELEÇÃO DE CEPA

[0083] Depois disso, o experimento em título de fermentação das cepas mutantes, em que a mutação aleatória foi induzida, foi executado.

[0084] Cada colônia foi subcultivada no meio nutritivo e, então, cultivada em meio de fermentação por 5 horas. Depois disso, 25% entre 40 foi adicionado a cada meio a uma concentração de 0,4% e, então, cada colônia foi novamente cultivada por 32 horas.

MEIO NUTRITIVO:

Glicose 1%, suco de carne 0,5%, polipeptona 1%, cloreto de sódio 0,25%, extrato de levedura 0,5%, ágar 2%, ureia 0,2%, pH 7,2

MEIO DE FERMENTAÇÃO:

Açúcar não refinado 6%, carbonato de cálcio 5%, sulfato de amônio 2,25%, monofosfato de potássio 0,1%, sulfato de magnésio 0,04%, sulfato de ferro (10 mg/l), biotina (0,3 mg/l), cloridrato de tiamina (0,2 mg/l)

[0085] Cada uma das colônias foi cultivada sob as condições acima e, então, foram selecionadas cepas mutantes que produzem L-ácido glutâmico, cuja quantidade produzida é igual ou maior que aquela produzida pelo *Corynebacterium glutamicum* do tipo selvagem(ATCC13869). Ademais, em relação às cepas mutantes selecionadas, a concentração de L-ácido glutâmico foi medida por YSI e a concentração de glicina foi medida por HPLC. As concentrações medidas de L-ácido glutâmico e glicina são mostradas na Tabela 1.

[TABELA 1]

Cepa	L-ácido glutâmico (g/l)	L-glicina (mg/l)
ATCC13869	14,0	119
ATCC13869-g1	13,2	102
ATCC13869-g2	9,6	35
ATCC13869-g3	13,9	121
ATCC13869-g4	13,3	110
ATCC13869-g5	12,7	101
ATCC13869-g6	14,8	132
ATCC13869-g7	2,1	7
ATCC13869-g8	8,4	75
ATCC13869-g9	13,5	115
ATCC13869-g10	14,2	143
ATCC13869-g11	12,6	108
ATCC13869-g12	13,7	103
ATCC13869-g13	10,1	82
ATCC13869-g14	14,2	105
ATCC13869-g15	13,5	100
ATCC13869-g16	7,2	67
ATCC13869-g17	12,8	101

ATCC13869-g18	13,0	99
ATCC13869-g19	11,9	82
ATCC13869-g20	14,0	152
ATCC13869-g21	13,8	111
ATCC13869-g22	9,7	120
ATCC13869-g23	13,2	114
ATCC13869-g24	13,3	114

[0086] Com base na Tabela 1, “ATCC13869-g3”, “ATCC13869-g6”, “ATCC13869-g10”, “ATCC13869-g10” e “ATCC13869-g20” foram selecionados como as cepas nas quais a quantidade de ácido glutâmico produzido foi igual ou maior e a quantidade de glicina produzida foi aumentada em comparação com as produzidas na cepa do tipo selvagem.

EXEMPLO 2: CONFIRMAÇÃO DE MUTAÇÃO ATRAVÉS SEQUENCIAMENTO DE GENES

[0087] Para confirmar a mutação de gene das cepas mutantes, genes nas cepas ATCC13869-g3, ATCC13869-g6, ATCC13869-g10, e ATCC13869-g20 foram sequenciados e comparado com aqueles da cepa do tipo selvagem.

[0088] Como resultado, foi constatado que as cepas ATCC13869-g3 e ATCC13869-g10 contidas na mesma mutação em uma posição específica na região de promotor de um gene que codifica fosforibosil-ATP pirofosfatase (HisE). Adicionalmente, foi constatado que a cepa ATCC13869-g20 continha uma mutação adicional, ademais à mesma mutação, em uma posição específica na região de promotor de um gene que codifica HisE das cepas ATCC13869-g3 e ATCC13869-g10.

[0089] Especificamente, foi confirmado que as cepas ATCC13869-g3 e ATCC13869-g10 continham mutações na qual os 53^o e 55^o nucleotídeos , A e G, na sequência da região de promotor de SEQ ID NO: 1 são substituídos por T. Foi confirmado que a cepa ATCC13869-g20 continha uma mutação na qual, na sequência de nucleotídeos da região de promotor de SEQ ID NO: 1, o 53^o nucleotídeo (isto é, A) foi substituído por T e 55^o o nucleotídeo (isto é, G) foi substituído por T e o 60^o nucleotídeo (isto é, T) foi substituído por G. A região de promotor de SEQ ID NO: 1 era uma sequência comumente incluída

em um micro-organismo do gênero *Corynebacterium*, mais especificamente, o *Corynebacterium glutamicum* do tipo selvagem (ATCC13032, ATCC13869 e ATCC14067).

[0090] Portanto, nos Exemplos 3 e 4, tentativas foram feitas para confirmar a possibilidade de a mutação acima ter afetado a produção de ácido glutâmico e glicina no micro-organismo do gênero *Corynebacterium*.

EXEMPLO 3: PREPARAÇÃO DE CEPA INTRODUZIDA COM MUTAÇÃO E CONFIRMAÇÃO DE QUANTIDADE DE PRODUÇÃO DE GLICINA

EXEMPLO 3-1: PREPARAÇÃO DE CEPA INTRODUZIDA COM MUTAÇÃO

[0091] Preparação de uma cepa mutante introduzida com a mutação confirmada no Exemplo 2 foi tentada. Especificamente, para introduzir a mutação no *Corynebacterium glutamicum* ATCC13869 do tipo selvagem (isto é, para substituir os 53^o e 55^o nucleotídeos da sequência de polinucleotídeos de SEQ ID NO: 1 por T; ou para substituir os 53^o e 55^o nucleotídeos da sequência de polinucleotídeos de SEQ ID NO: 1 por T e o 60^o nucleotídeo da sequência de polinucleotídeos de SEQ ID NO: 1 por G), o oligonucleotídeo em uma direção reversa, que contém uma mutação-alvo, foi projetado com um comprimento de 75 mer (SEQ ID NO: 4 ou 5).

[0092] Especificamente, o oligonucleotídeo (30 µg) de SEQ ID NO: 4 ou 5 foi transformado nas cepas ATCC13869 e ATCC13032 de *Corynebacterium glutamicum* do tipo selvagem com uso de um método de pulso elétrico (Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999, 52: 541 a 545) e, então, um meio líquido complexo (1 ml) foi adicionado ao mesmo. Os resultantes foram, então, cultivados a 30 °C por 30 minutos enquanto agita a 160 rpm. Depois disso, o meio de cultura foi incubado em gelo por 10 minutos, centrifugado a 4.000 rpm a 4 °C por 10 minutos e, então, o sobrenadante foi removido para obter células microbianas. Depois disso, uma solução de

glicerol de 10% (4 °C) foi adicionada ao mesmo e misturada e, então, os resultados foram centrifugados a 4.000 rpm a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e, então, as células microbianas foram lavadas. Tal procedimento foi repetido uma vez mais para lavar novamente as células microbianas e uma solução de glicerol de 10% (4 °C e 0,1 ml) foi adicionada ao mesmo para preparar as cepas para a próxima transformação. Depois disso, o processo para a transformação foi repetido 10 vezes com o oligonucleotídeo de SEQ ID NO: 4 ou 5 com uso do método de pulso elétrico descrito acima e, então, os resultantes foram colocados em placas em um meio de placa complexo para obter colônias (Nat. Protoc., outubro de 2014; 9(10): 2.301-16).

[0093] Como resultado de execução das análises da sequência de genes das colônias obtidas, foi confirmado que a mutação-alvo foi introduzida nas cepas. Ademais, as cepas nas quais a mutação foi introduzida foram chamadas de “ATCC13869::hisEG-pro-2mt”, “ATCC13869::hisEG-pro-3mt” e “ATCC13032::hisEG-pro-2mt”, “ATCC13032::hisEG-pro-3mt”.

Exemplo 3-2: Confirmação de quantidade de produção de glicina

[0094] As cepas mutantes ATCC13869::hisEG-pro-2mt, ATCC13869::hisEG-pro-3mt e ATCC13032::hisEG-pro-2mt, ATCC13032::hisEG-pro-3mt, que foram preparadas no Exemplo 3-1 e suas cepas ATCC13869 e ATCC13032 de *Corynebacterium glutamicum* do tipo selvagem foram cultivadas da mesma maneira que no Exemplo 1-2.

[0095] Após a cultura ser completada, as concentrações de L-ácido glutâmico e glicina em cada meio foram medidas. As concentrações medidas de L-ácido glutâmico e glicina são mostradas na Tabela 2 abaixo.

[TABELA 2]

Cepa	L-ácido glutâmico (g/l)	L-glicina (mg/l)
ATCC13869	14,2	122
IATCC13869::hisEG-pro-2mt	14,0	134
IATCC13869::hisEG-pro-3mt	14,3	141

ATCC13032	9,1	73
ATCC13032::hisEG-pro-2mt	9,4	91
ATCC13032::hisEG-pro-3mt	9,3	99

[0096] Conforme mostrado na Tabela 2, foi confirmado que a concentração de L-ácido glutâmico produzida por cada uma dentre as cepas ATCC13869::hisEG-pro-2mt, ATCC13869::hisEG-pro-3mt e ATCC13032::hisEG-pro-2mt, ATCC13032::hisEG-pro-3mt de *Corynebacterium glutamicum*, nas quais a mutação foi introduzida, foi similar àquela produzida por cada uma dentre as cepas ATCC13869 e ATCC13032 de *Corynebacterium glutamicum* do tipo selvagem.

[0097] Pelo contrário, as cepas ATCC13869 e ATCC13032 de *Corynebacterium glutamicum* do tipo selvagem produziram 122 mg/l e 73 mg/l de glicina, respectivamente. No entanto, as cepas ATCC13869::hisEG-pro-2mt e ATCC13032::hisEG-pro-2mt produziram 134 mg/l e 91 mg/l de glicina, respectivamente. Portanto, foi confirmado que as concentrações de glicina produzidas nas cepas mutantes foram maiores que aquelas produzidas nas cepas do tipo selvagem. Adicionalmente, as cepas ATCC13869::hisEG-pro-3mt e ATCC13032::hisEG-pro-3mt produziram 141 mg/l de glicina e 99 mg/l de glicina, respectivamente, mostrando assim concentrações maiores de glicina que aquelas produzidas nas cepas ATCC13869::hisEG-pro-2mt e ATCC13032::hisEG-pro-2mt.

[0098] Ou seja, foi confirmado que as mutações aumentaram notavelmente a produtividade de glicina, mantendo a produtividade de L-ácido glutâmico nos micro-organismos sem efeito significativo sobre a mesma.

[0099] Enquanto isso, as cepas ATCC13869::hisEG-pro-2mt e ATCC13869::hisEG-pro-3mt foram depositadas no Centro de Cultura de Micro-organismos da Coreia (KCCM), que é uma autoridade depositária internacional sob o Tratado de Budapeste, em 28 de fevereiro de 2018 e 14 de março de 2019, com a cepa chamada de “CA02-9206” e “CA02-9215”, e

receberam os números de acesso KCCM12226P e KCCM12457P.

EXEMPLO 4: CONFIRMAÇÃO DE QUANTIDADES DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLUTÂMICO E GLICINA DE KFCC11074 NAS QUAIS A MUTAÇÃO É INTRODUZIDA

EXEMPLO 4-1: PREPARAÇÃO DE VETOR NO QUAL A MUTAÇÃO É INTRODUZIDA

[00100] Para confirmar se a mutação exibe os mesmos efeitos, mesmo nas cepas com produtividade aprimorada de ácido glutâmico, além das cepas do tipo selvagem, foram feitas tentativas para introduzir a mutação na cepa KFCC11074 (Patente número KR 10-0292299), conhecida como cepa produtora de ácido glutâmico.

[00101] Especificamente, um vetor para substituição de genes foi construído para substituir os 53^o e 55^o nucleotídeos da sequência de polinucleotídeos de SEQ ID NO: 1, que estão contidos na cepa, por T; e para substituir os 53^o e 55^o nucleotídeos da sequência de polinucleotídeos de SEQ ID NO: 1 por T e o 60^o nucleotídeo da sequência de polinucleotídeos de SEQ ID NO: 1 por G. Os fragmentos de gene para construir o vetor foram obtidos por PCR com uso de DNA genômico ATCC13869 como um modelo. Com base nas informações em sequências de genes e nucleotídeos adjacentes do *Corynebacterium glutamicum* (ATCC13869) registrado no Institutos Nacionais da Saúde GenBank (NIH GenBank), iniciadores que polinucleotídeos de SEQ ID NOS: 6, 7, 8, 9, 10 e 11 foram preparados.

[00102] Após a desnaturação a 95 °C por 5 minutos, PCR foi executado por um total de 30 ciclos sob as seguintes condições: desnaturação a 95 °C por 30 segundos, hibridização a 55 °C por 30 segundos, e polimerização a 72 °C por 1 minuto. Depois disso, a reação de polimerização foi realizada a 72 °C por 5 minutos. Mais especificamente, o polinucleotídeo (500 bp) amplificado com uso de iniciadores de SEQ ID NOS: 6 e 7 e o polinucleotídeo (500 bp) amplificado com uso dos iniciadores de SEQ ID

NOS: 8 e 9 foram obtidos. Os dois fragmentos de DNA obtidos foram ligados ao vetor pDZ (Patente número KR 10-0924065 e Publicação Internacional número 2008-033001), que foram digeridos com uma enzima de restrição Sall, com uso de uma enzima de infusão e, assim, um único vetor para a substituição de genes, que inclui um promotor hisE, foi preparado e o vetor foi chamado de “pDZ-hisE-pro-2mt”. Adicionalmente, o polinucleotídeo (500 bp) amplificado com uso dos iniciadores de SEQ ID NOS: 6 e 11 e o polinucleotídeo (500 bp) amplificado com uso dos iniciadores de SEQ ID NOS: 10 e 9 foram obtidos. Os dois fragmentos de DNA obtidos foram ligados ao vetor pDZ (Patente número KR 10-0924065 e Publicação Internacional número 2008-033001), que foram digeridos com uma enzima de restrição Sall, com uso de uma enzima de infusão e, assim, um único vetor para a substituição de genes, que inclui um promotor hisE, foi preparado e o vetor foi chamado de “pDZ-hisE-pro-3mt”. As informações nas sequências iniciadoras usadas pela preparação de vetor são mostradas na Tabela 3 abaixo.

[TABELA 3]

SEQ ID NO	Iniciador	Sequência (5' a 3')
4	hisE-pro-2mt-AF	GATCCTCTAGAGTCGACTTCGACGAATCCCTCG
5	hisE-pro-2mt-AR	CGGTACATTATACCACACAACAGTTATCAATG
6	hisE-pro-2mt-BF	GTGGTATAATGTACCGAGTGAAGACATTTGAC
7	hisE-pro-2mt-BR	ATGCCTGCAGGTCGACTGATACCCAAATCGAG
10	hisE-pro-3mt-AR	CGGTCCATTATACCACACAACAGTTATCAATG
11	hisE-pro-3mt-BF	GTGGTATAATGGACCGAGTGAAGACATTTGAC

EXEMPLO 4-2: PREPARAÇÃO DE KFCC11074 NA QUAL A MUTAÇÃO É INTRODUZIDA E CONFIRMAÇÃO DE QUANTIDADES DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLUTÂMICO E GLICINA

[00103] Os vetores para substituição de genes (isto é, pDZ-hisE-pro-2mt e pDZ-hisE-pro-3mt), que foram preparados no Exemplo 4-1, foram introduzidos na cepa KFCC11074 por eletroporação para preparar “KFCC11074_Pro(2mt)_hisEG” e “KFCC11074_Pro(3mt)_hisEG”, que são as cepas produtoras de ácido glutâmico e glicina nas quais a mutação foi

introduzida.

[00104] Especificamente, foram preparados através de transformação (Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999, 52: 541 a 545), e a cepa na qual o vetor foi inserido no cromossomo por recombinação de sequências homólogas foi selecionada em um meio nutritivo de ágar que contém canamicina (25 mg/l). A cepa primária selecionada foi novamente sujeita a uma interseção secundária, e as cepas nas quais as duas ou três mutações-alvo foram introduzidas foram selecionadas, respectivamente. A mutação (substituição) da cepa finalmente transformada foi confirmada por sequenciamento após executar PCR com uso de um par de iniciadores de SEQ ID NOS: 6 e 9.

[00105] Depois disso, as cepas selecionadas KFCC11074_Pro(2mt)_hisEG e KFCC11074_Pro(3mt)_hisEG foram colocadas em placas em um meio nutritivo e cultivadas a 30 °C por 16 horas. Um meio de fermentação (25 ml), que foi pressurizado e esterilizado a 121 °C por 15 minutos, foi dispensado em um frasco de Erlenmeyer (250 ml) para agitar, e, então, a cepa cultivada no meio nutritivo foi inoculada e cultivada por 48 horas. As condições de cultura foram definidas a 200 rpm, 37 °C e pH 8,0. As composições do meio nutritivo e do meio de fermentação são as seguintes.

MEIO NUTRITIVO:

Glicose 1%, suco de carne 0,5%, polipeptona 1%, cloreto de sódio 0,25%, extrato de levedura 0,5%, ágar 2%, ureia 0,2%, pH 7,2

MEIO DE FERMENTAÇÃO:

Açúcar não refinado 6%, carbonato de cálcio 5%, sulfato de amônio 2,25%, monofosfato de potássio 0,1%, sulfato de magnésio 0,04%, sulfato de ferro (10 mg/l), biotina (0,3 mg/l), cloridrato de tiamina (0,2 mg/l)

[00106] Após a conclusão da cultura, as quantidades de produção de L-ácido glutâmico e glicina foram medidas com uso de HPLC, e os resultados de medição são mostrados na Tabela 4 abaixo.

[TABELA 4]

Cepa	L-ácido glutâmico (g/l)	L-glicina (mg/l)
KFCC11074	11,8	170
KFCC11074_Pro(2mt)_hisEG	11,7	203
KFCC11074_Pro(3mt)_hisEG	12,0	212

[00107] Conforme mostrado na Tabela 4, foi confirmado que a concentração de L-ácido glutâmico produzida pelas cepas KFCC11074_Pro(2mt)_hisEG e KFCC11074_Pro(3mt)_hisEG de *Corynebacterium glutamicum*, nas quais a mutação foi introduzida, foi similar àquela produzida pela cepa KFCC11074 de *Corynebacterium glutamicum* sem a mutação.

[00108] Por outro lado, foi confirmado que a concentração de glicina produzida pelas cepas KFCC11074_Pro(2mt)_hisEG e KFCC11074_Pro(3mt)_hisEG foi aumentada em 33 mg/l e 42 mg/l em relação àquela produzida pela cepa KFCC11074, respectivamente.

[00109] Ou seja, foi confirmado que a mutação aumentou notavelmente a produtividade de glicina, mantendo a produtividade de L-ácido glutâmico nos micro-organismos sem efeito significativo sobre a mesma.

EXEMPLO 5: PREPARAÇÃO DE CEPAS NAS QUAIS É INTRODUZIDA A MUTAÇÃO DE LIBERAÇÃO DE INIBIÇÃO DE RETROALIMENTAÇÃO DE HISG E CONFIRMAÇÃO DE PRODUTIVIDADE DE ÁCIDO GLUTÂMICO E GLICINA

EXEMPLO 5-1: PREPARAÇÃO DE VETOR NO QUAL É INTRODUZIDA A MUTAÇÃO DE LIBERAÇÃO DE INIBIÇÃO DE RETROALIMENTAÇÃO DE HISG

[00110] Visto que foi confirmado através de Exemplos 1-1 a 4-2 acima que a produtividade de glicina das cepas foi aumentada pela mutação no promotor do gene *hisEG*, a mutação de liberação de inibição de retroalimentação de histidina foi introduzida nas cepas para maximizar o efeito de aumento da produtividade de glicina. Depois disso, a produtividade

de glicina foi confirmada.

[00111] Enquanto isso, os genes *hisE* e *hisG* são compostos de operões, e esses genes estão envolvidos na rota de biossíntese de histidina. Em particular, uma vez que o *HisG* é inibido por retroalimentação pela histidina de produto, foram feitas tentativas para confirmar se a produtividade de glicina das cepas aumentaria quando a mutação de liberação de inibição de retroalimentação for introduzida para aumentar a atividade do *HisG*.

[00112] Especificamente, foram feitas tentativas para introduzir os mutantes G233H e T235Q conhecidos na literatura (Schendzielorz et al., 2014) no gene *hisG*. Um vetor para substituição de genes foi construído para substituir os 233^o e 235^o aminoácidos da sequência de aminoácidos *HisG* de SEQ ID NO: 16 por H e Q, respectivamente. Os fragmentos de gene para construir o vetor foram obtidos por PCR com uso de DNA genômico ATCC13869 como um modelo. Com base nas informações em sequências de genes e nucleotídeos adjacentes do *Corynebacterium glutamicum* (ATCC13869) registrado no Instituto Nacional da Saúde GenBank (NIH GenBank), iniciadores que polinucleotídeos de SEQ ID NOS: 12, 13, 14, e 15 foram preparados.

[00113] Após a desnaturação a 95 °C por 5 minutos, PCR foi executado por um total de 30 ciclos sob as seguintes condições: desnaturação a 95 °C por 30 segundos, hibridização a 55 °C por 30 segundos, e polimerização a 72 °C por 1 minuto. Depois disso, a reação de polimerização foi realizada a 72 °C por 5 minutos. O polinucleotídeo (722 bp) amplificado com uso dos iniciadores de SEQ ID NOS: 12 e 13 e o polinucleotídeo (798 bp) amplificado com uso dos iniciadores de SEQ ID NOS: 14 e 15 foram obtidos. Os dois fragmentos de DNA obtidos foram ligados ao vetor pDZ (Patente número KR 10-0924065 e Publicação Internacional número 2008-033001), que foram digeridos com uma enzima de restrição *SalI*, com uso de uma enzima de infusão e, assim, um único vetor (1,5 kbp) para a substituição

de genes, que inclui o polinucleotídeo que contém o mutante hisG(G233H/T235Q) foi preparado e o vetor foi chamado de “pDZ-hisG(G233H/T235Q)”. As informações nas sequências iniciadoras usadas pela preparação de vetor são mostradas na Tabela 5 abaixo.

[TABELA 5]

SEQ NO	ID	Iniciador	Sequência (5' a 3')
12		hisG(G233H/T235Q)-AF	GATCCTCTAGAGTCGACCCCAAACAAGGGCTCGC
13		hisG(G233H/T235Q)-AR	CGTGCCAGTGGGGATACCTGTGGGTGGG
14		hisG(G233H/T235Q)-BF	AACCCAGGCCTATCCCACCCACAGGTATC
15		hisG(G233H/T235Q)-BR	ATGCCTGCAGGTTCGACGCAAGGTTGGCAACAAC

EXEMPLO 5-2: PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DE CEPA MUTADA NO PROMOTOR HISE NA QUAL A MUTAÇÃO POR LIBERAÇÃO DE INIBIÇÃO DE RETROALIMENTAÇÃO DE HISG É INTRODUZIDA

[00114] “pDZ-hisG(G233H/T235Q)”, o vetor para substituição de genes que foi preparado através do Exemplo 5-1 acima, foi introduzido na cepa KFCC11074 para preparar a cepa KFCC11074_hisG(G233H/T235Q) que tem liberação de inibição de retroalimentação de HisG. Ademais, o vetor foi introduzido nas cepas KFCC11074_Pro(2mt)_hisEG e KFCC11074_Pro(3mt)_hisEG para preparar as cepas KFCC11074_hisG(G233H/T235Q)_Pro(2mt)_hisEG e KFCC11074_hisG(G233H/T235Q)_Pro(3mt)_hisEG, nas quais a mutação da presente invenção foi introduzida.

[00115] Especificamente, as cepas foram preparadas através de transformação (Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999, 52: 541 a 545), e as cepas nas quais o vetor foi inserido no cromossomo por recombinação de sequências homólogas foram selecionadas em um meio nutritivo de ágar que contém canamicina (25 mg/l). As cepas primárias selecionadas foram novamente sujeitas a uma interseção secundária, e as cepas nas quais as mutações-alvo G233H/T235Q são introduzidas foram selecionadas. A mutação (substituição) das cepas finalmente transformadas foi confirmada por

sequenciamento após executar PCT com uso de um par de iniciadores de SEQ ID NOS: 12 e 15.

[00116] Depois disso, as cepas selecionadas KFCC11074_hisG(G233H/T235Q) e KFCC11074_hisG(G233H/T235Q) Pro(2mt)_hisEG foram cultivadas da mesma maneira que no Exemplo 4-2. Após a conclusão da cultura, as concentrações de L-ácido glutâmico e glicina em cada meio foram medidas. As concentrações medidas de L-ácido glutâmico e glicina são mostradas na Tabela 6 abaixo.

[TABELA 6]

Cepa	L-ácido glutâmico (g/l)	L-glicina (mg/l)
KFCC11074_hisG(G233H/T235Q)	10,3	445,7
KFCC11074_hisG(G233H/T235Q)_Pro(2mt)_hisEG	10,1	760,0
KFCC11074_hisG(G233H/T235Q)_Pro(3mt)_hisEG	10,3	783,2

[00117] Conforme mostrado na Tabela 6, foi confirmado que a concentração de L-ácido glutâmico produzido pelas cepas KFCC11074_hisG(G233H/T235Q)_Pro(2mt)_hisEG e KFCC11074_hisG(G233H/T235Q)_Pro(3mt)_hisEG de *Corynebacterium glutamicum*, nas quais a mutação de promotor hisEG foi introduzida, era similar àquela produzida pela cepa KFCC11074_hisG(G233H/T235Q) de *Corynebacterium glutamicum* na qual apenas a mutação de liberação de inibição de retroalimentação de HisG foi introduzida.

[00118] Enquanto isso, foi confirmado que a concentração de glicina produzida pelas cepas KFCC11074_hisG(G233H/T235Q)_Pro(2mt)_hisEG e KFCC11074_hisG(G233H/T235Q)_Pro(3mt)_hisEG aumentou notavelmente em 314,3 mg/l em relação à produzida pela cepa KFCC11074_hisG(G233H/T235Q).

[00119] Ou seja, foi confirmado que as mutações aumentaram notavelmente a produtividade de glicina, mantendo a produtividade de L-ácido glutâmico nos micro-organismos sem efeito significativo sobre a mesma. Ademais, tais resultados foram exibidos pelas atividades aumentadas

de hisE e hisG.

EXEMPLO 6: PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÃO FERMENTADA PARA PREPARAÇÃO DE PRODUTOS SAZONAIS

[00120] Conforme descrito acima, foi confirmado que as cepas que contêm o nucleotídeo da presente invenção mostraram uma capacidade aumentada para produzir glicina sem ter nenhum efeito significativo no L-ácido glutâmico. Portanto, uma tentativa foi feita para preparar uma composição fermentada com uso de um micro-organismo do gênero *Corynebacterium* que contém os nucleotídeos do presente pedido.

[00121] Por exemplo, foi tentado preparar a composição fermentada com uso de ácido glutâmico, que é basicamente um material sazonal bem conhecido, como um ingrediente ativo, e a cepa de fermentação e os processos de fermentação foram controlados para aumentar as proporções de outros ingredientes de subproduto dos materiais sazonais para o fim de aumentar a constituição do sabor rico.

EXEMPLO 6-1: PREPARAÇÃO DE COMPOSIÇÃO FERMENTADA COM USO DE FERMENTADOR DE 5 L

[00122] Especificamente, composições fermentadas foram preparadas com uso de um fermentador de 5 l pelas cepas usadas no Exemplo 5.

[00123] Todos os ingredientes usados na preparação do meio de cultura usados foram os correspondentes à qualidade alimentar.

[00124] Meio de partícula inicial primário foi preparado da seguinte forma:

Glicose (1%), Peptona (10 g), Extrato de Levedura (1%), Peptona (1%), Sulfato de Amônio (0,1%), NaCl (0,25%), KH_2PO_4 (0,15%), K_2HPO_4 (0,15%), pH (8,0)

[00125] Meio de partícula inicial secundário foi preparado da seguinte forma:

Açúcar Orgânico Não Refinado (4,6% com uma pureza de

98,5%), Sulfato de Magnésio (0,05%), Extrato de Levedura (0,5%), KH_2PO_4 (0,2%), Sulfato de Ferro (0,002%), Biotina (1 mg/l), Tiamina HCl (2 mg/l), uma pequena quantidade de um agente anti-esponjamento, pH (7,2)

[00126] O meio de fermentação foi preparado conforme a seguir:

Açúcar Orgânico Não Refinado (4% com uma pureza de 98,5%), Sulfato de Magnésio (0,03%), Extrato de Levedura (1%), Ácido Fosfórico (0,22%), KOH (0,4%), Biotina (0,2 mg/l), Tiamina HCl (0,6 mg/l), Sulfato de Manganês (0,002%), Sulfato de Ferro (0,002%), Sulfato de Zinco (0,002%), Sulfato de Cobre (0,006%), uma pequena quantidade de um agente anti-esponjamento, pH (7,4)

[00127] O meio de partícula inicial primário (50 ml) foi dispensado em cada frasco de Erlenmeyer de agitação de 500 ml, autoclavado a 121 °C sob pressão por 20 minutos. Então, cada cultura de partícula inicial foi inoculada e incubada com agitação a uma velocidade de rotação de 200 rpm, a 30 °C por 5 a 7 horas.

[00128] O meio de partícula inicial secundário foi preparado em uma quantidade de 0,25 l em um fermentador de teste de 1,5 l, autoclavado a 121 °C sob pressão por 20 minutos e resfriado. Então, o meio de partícula inicial primário (50 ml) foi inoculado e incubado a uma velocidade de rotação de 900 rpm, a 31,5 °C por 15 horas.

[00129] O meio de fermentação foi preparado em uma quantidade de 0,25 l em um fermentador de teste de 5 l, autoclavado a 121 °C sob pressão por 20 minutos e resfriado. Então, o meio de partícula inicial secundário (0,26 l) foi inoculado no mesmo e incubado a uma velocidade de rotação de 900 rpm, a 30 °C a 34 °C.

[00130] Durante a cultura nas condições acima, o pH da cultura de fermentação foi ajustado continuamente com uso de 28% de água de amônia para estar na faixa de 7,0 a 7,4 durante a cultura do *Corynebacterium glutamicum*. Quando a concentração de açúcar residual na cultura se situou na

faixa de 0,5% a 1,5%, o açúcar não refinado orgânico esterilizado foi continuamente adicionado para continuar a cultura até que a quantidade total de açúcar adicionado se tornasse 30% a 34% da quantidade do caldo fermentado.

[TABELA 7]

Cepa	Resultados de Análises (g/l)						
	Ingrediente Ativo			Subproduto			
	Sólido	Ácido Glutâmico	Glicina	Aminoácido	Ácido Orgânico	Açúcar Residual	Íons
KFCC11074	140,2	64,2	0,18	11,5	3,5	12,0	11,1
KFCC11074_hisG(G233H/T235Q)_Pro(3mt)_hisEG	147,3	59,0	2,43	16,4	2,7	15,1	10,7

[00131] Como resultado, conforme mostrado na Tabela 7 acima, foi confirmado que, embora não houvesse diferença significativa na quantidade de produção de ácido glutâmico entre as duas cepas, a quantidade de glicina no caldo fermentado produzida pela cepa KFCC11074_hisG(G233H/T235Q)_Pro(3mt)_hisEG de *Corynebacterium glutamicum*, na qual a mutação foi introduzida, aumentou significativamente.

[00132] Mesmo no caso em que uma composição fermentada foi preparada com uso de um fermentador de 3kl, não houve diferença significativa na quantidade de produção de ácido glutâmico entre as duas cepas. No entanto, a cepa KFCC11074_hisG(G233H/T235Q)_Pro(3mt)_hisEG de *Corynebacterium glutamicum*, na qual a mutação foi introduzida, mostrou um aumento significativo na quantidade de glicina em comparação com a cepa KFCC11074 (isto é, 0,2 g/l vs 3,2 g/l) embora não tenha havido diferença significativa na quantidade de produção de ácido glutâmico entre as duas cepas (64,2 g/l vs 73 g/l).

[00133] A partir do supracitado, um indivíduo versado na técnica à qual a presente invenção pertence terá capacidade para entender que a presente invenção pode ser incorporada em outras formas específicas sem modificar os conceitos técnicos ou características essenciais da presente invenção. Nesse sentido, as modalidades exemplificativas reveladas no

presente documento têm apenas propósitos ilustrativos e não devem ser interpretadas como limitantes do escopo da presente invenção. Pelo contrário, a presente invenção destina-se a abranger não apenas as modalidades exemplificativas, mas também várias alternativas, modificações, equivalentes e outras modalidades que podem estar incluídas no espírito e no escopo da presente invenção, conforme definido pelas reivindicações anexas.

[NÚMERO DE ADESÃO]

Instituição Depositária: Centro de Cultura de Micro-organismos da Coreia

Número de Adesão: KCCM12226P

Data de Depósito: 28 de fevereiro de 2018

Instituição Depositária: Centro de Cultura de Micro-organismos da Coreia

Número de Adesão: KCCM12457P

Data de Depósito: 14 de março de 2019

REIVINDICAÇÕES

1. Polinucleotídeo que tem atividade de promotor, caracterizado pelo fato de que, na sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 1, os 53º e 55º nucleotídeos são substituídos por T; ou os 53º e 55º nucleotídeos são substituídos por T e o 60º nucleotídeo é substituído por G.

2. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo consiste na sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 2 ou 3.

3. Polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo está ligado de maneira funcional a um gene que codifica uma proteína-alvo,

em que a proteína-alvo é fosforibosil-ATP pirofosfatase (HisE), ATP fosforibosiltransferase (HisG) ou uma combinação das mesmas.

4. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende o polinucleotídeo como definido na reivindicação 1 ou 2; e um gene que codifica uma proteína-alvo ligada de maneira funcional ao polinucleotídeo.

5. Vetor de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a proteína-alvo é fosforibosil-ATP pirofosfatase (HisE), ATP fosforibosiltransferase (HisG) ou uma combinação das mesmas.

6. Micro-organismo do gênero *Corynebacterium*, caracterizado pelo fato de que compreende o polinucleotídeo como definido na reivindicação 1; e um gene que codifica uma proteína-alvo ligada de maneira funcional ao polinucleotídeo.

7. Micro-organismo de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo consiste na sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO: 2 ou 3.

8. Micro-organismo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que a proteína-alvo é fosforibosil-ATP pirofosfatase: (HisE), ATP fosforibosiltransferase (HisG) ou uma combinação

das mesmas.

9. Micro-organismo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que, na ATP fosforibosiltransferase (HisG), os 233º e 235º aminoácidos da sequência de aminoácidos HisG de SEQ ID NO: 16 são substituídos por histidina (H) e glutamina (Q), respectivamente.

10. Micro-organismo de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 9, caracterizado pelo fato de que o micro-organismo do gênero *Corynebacterium* é *Corynebacterium glutamicum*.

11. Método de produção de uma substância-alvo, caracterizado pelo fato de que compreende:

cultivar o micro-organismo do gênero *Corynebacterium* como definido em qualquer uma das reivindicações 6 a 9, em um meio; e

recuperar a substância-alvo do meio.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a substância-alvo é um aminoácido.

13. Método de preparação de uma composição fermentada, caracterizado pelo fato de que compreende fermentar cultivando-se o micro-organismo do gênero *Corynebacterium* como definido em qualquer uma das reivindicações 6 a 9, em um meio.

14. Composição fermentada, caracterizada pelo fato de que compreende um meio de cultura fermentado pelo micro-organismo do gênero *Corynebacterium* como definido em qualquer uma das reivindicações 6 a 9.