



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

(11) PI 0925344-0 B1



(22) Data do Depósito: 07/01/2009

(45) Data de Concessão: 22/01/2019

(54) Título: CEPA DE ESCHERICHIA COLI PRODUTORA DE L-TREONINA E MÉTODO DE PRODUÇÃO DE L-TREONINA

(51) Int.Cl.: C12N 15/04.

(30) Prioridade Unionista: 08/01/2008 KR 10-20080002310.

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

(72) Inventor(es): KWANG HO LEE; JAE YEONG JU; JI SUN LEE; YOUNG BIN HWANG; SUNG HOO JHON; EUN SUNG KOH; CHUL HA KIM; SOO AN SHIN.

(86) Pedido PCT: PCT KR2009000066 de 07/01/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/088216 de 16/07/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 08/07/2010

(57) Resumo: CEPA DE Escherichia coli PRODUTORA DE L-TREONINA E MÉTODO DE PRODUÇÃO DE L-TREONINA. São descritos uma Escherichia coli produtora de L-treonina em que um promotor de um gene da carboxilase do fosfoenolpiruvato (ppc) sobre o cromossomo é substituído por um promotor de um gene da sintase da cisteína (cysK) e um método de produção de L-treonina usando o mesmo. A Escherichia coli recombinante pode produzir L-treonina com um alto rendimento e, deste modo, pode ser extensamente usada em indústrias médicas, farmacêuticas e de alimentação, particularmente para uma alimentação animal..

**“CEPA DE *Escherichia coli* PRODUTORA DE L-TREONINA
E MÉTODO DE PRODUÇÃO DE L-TREONINA”**

RELATÓRIO DESCRITIVO

REFERÊNCIA REMISSIVA

A PEDIDO DE PATENTE CORRELATO

1. Este Pedido reivindica o benefício do Pedido de Patente coreano 10-2008-0002310, depositado em 8 de janeiro de 2008, no Escritório de Propriedade Intelectual coreano, cuja revelação é aqui incorporada em sua totalidade por referência.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

2. Campo da Invenção

3. Uma ou mais modalidades da presente invenção relacionam-se com uma *cepa de Escherichia coli (E. coli)* produtora de L-treonina com com produtividade intensificada de L-treonina em que um promotor de um gene da carboxilase do fosfoenolpiruvato (*ppc*) sobre o cromossomo é substituído por um promotor de um gene da sintase da cisteína (*cysK*) e um método de produzir L-treonina usando o mesmo.

4. Descrição da Técnica Correlata

5. A L-treonina é um aminoácido essencial e é extensamente usado como aditivo da alimentação animal ou aditivo de alimentos e também é usado como matéria-prima para a síntese de fluidos ou drogas médicas. Enquanto a proteína animal contém uma quantidade suficiente de L-treonina, a proteína vegetal é deficiente em L-treonina. Deste modo, é provável que a L-treonina seja deficiente em dietas animais principalmente vegetarianas e, deste modo, é extensamente usada em particular como aditivo para a alimentação animal.

6. A L-treonina é principalmente produzida por um processo de fermentação usando *Escherichia coli* (*E.coli*) ou *Corynebacterium*, que é desenvolvida por mutagênese artificial ou recombinação genética. Para produzir a L-treonina, é usada uma cepa mutante derivada a partir de uma cepa do tipo selvagem de *Escherichia coli* (*E.coli*), *Corynebacteria sp.*, *Serratia sp.*, ou *Providencia sp.* Os exemplos da cepa mutante incluem uma cepa análoga do aminoácido ou mutante resistente a droga e um diaminopimelic ácido diaminopimélico, uma metionina, uma lisina ou uma cepa mutante auxotrófica de isoleucina que tem também um análogo de aminoácido ou resistência a droga. Entre os métodos de produzir L-treonina usando uma cepa mutante, um método de uso de um microorganismo que pertence à espécie *Escherichia coli* tem fenótipos auxotróficos de ácido diaminopimélico e metionina e é mutacionado de forma que a biossíntese da L-treonina não é afetada pela inibição de regeneração de treonina é revelada na Patente japonesa 10037/81.

7. Um processo de fermentação que usa uma cepa recombinante pode também ser usado na produção de L-treonina. Por exemplo, a Publicação de Pedido de Patente japonesa 05-227977 revela um método de produção de L-treonina usando um *E. coli* recombinante em que um operon de treonina que consiste em genes que codificam a aspartoquinase, a desidrogenase da homoserina, a homoserina quinase e a sintase da treonina é introduzido numa forma de plasmídio e um método de produção de L-treonina usando *Brevibacterium flavum* de produção de treonina em que é introduzido um operon de treonina derivado a partir de *E. coli* (Turba E, *et al*, *Agric. Biol. Chem.* 53:2269-2271, 1989).

8. Em geral, a expressão de um gene específico num microorganismo pode ser intensificada aumentando o número de cópia do gene no microorganismo. Para isto, é usado um plasmídio que dá um número de cópias maior para um microorganismo [Sambrook *et al.*,

Molecular Cloning, 2º, 1989, 1.3-1.5]. Isto é, o número do gene pode ser aumentado tanto quanto o número de cópias do plasmídeo por um microorganismo único inserindo um gene alvo no plasmídeo cujo número de cópia pode ser mantido num nível alto e, então, transformando o microorganismo com o plasmídeo recombinante obtido. Têm sido feitas também tentativas para intensificar a produtividade da treonina usando este método e foi reportado um sucesso parcial (Patente US 5.538.873). Contudo, esta tecnologia que usa um plasmídeo induz a expressão excessiva de apenas um gene específico na maioria dos casos, impondo, assim, um fardo pesado sobre um microorganismo hospedeiro. Além disso, podem ser perdidos plasmídios durante o cultivo de uma cepa recombinante, diminuindo, assim, a estabilidade do plasmídeo. Para resolver estes problemas do método de produção de treonina usando uma cepa recombinante em que é introduzido um plasmídeo, foram desenvolvidos a adição de um antibiótico numa cultura e métodos de uso de um plasmídeo cuja expressão é controlável [Sambrook *et al. Molecular Cloning*, 2º, 1989, 1.5-1.6, 1.9-1.11]. No caso de usar o plasmídeo cuja expressão é controlável para aliviar o fardo sobre um microorganismo hospedeiro e obter uma grande quantidade de células, durante a fase de crescimento, um microorganismo hospedeiro é propagado artificialmente sob condições em que não acontece a expressão de um gene alvo sobre o plasmídeo e, depois do crescimento suficiente do microorganismo hospedeiro, é induzida a expressão temporária do gene, obtendo-se, assim, um material alvo. Todavia, os métodos que usam plasmídios cuja expressão é controlável podem ser apenas usados quando um produto de gene final for uma proteína ou um metabolito secundário. Num caso em que um produto de gene é um metabolito primário que é produzido ao mesmo tempo em que os microorganismos começam a crescer, deve ser induzida a expressão de um gene alvo durante a fase de crescimento. De outra forma, é difícil antecipar a acumulação do metabolito primário. Visto que a treonina pertence a um metabolito primário, o caso posterior é também aplicado à treonina.

9. Deste modo, para intensificar a produtividade da treonina, que é um metabolito primário, é revelada a inserção de genes envolvidos na biossíntese da treonina no DNA cromossômico de um microorganismo na Patente US 5.939.307, em vez de usar um método de introduzir um plasmídeo com genes relacionados com a biossíntese da treonina num microorganismo. Os métodos de aumentar os genes relacionados com a biossíntese da treonina e a expressão da mesma foram diversamente desenvolvidos, mas existe ainda uma necessidade de desenvolver um método de produção mais econômica de L-treonina com alto rendimento.

10. Para aumentar o rendimento da produção de L-treonina, tem sido intensivamente conduzida pesquisa sobre uma rota de biossíntese a partir do oxaloacetato até à treonina. Com relação a isto, pretendemos primeiro induzir o fluxo de carbono ao longo de uma rota de fosfoenolpiruvato até o oxaloacetato intensificando a atividade da fosfoenolpiruvato carboxilase envolvida numa etapa exatamente antes da biossíntese da L-treonina. Para isto, estudamos e apuramos que uma cepa de microorganismo capaz de produzir L-treonina em que um promotor de um gene de fosfoenolpiruvato carboxilase (*ppc*) sobre o cromossomo era substituído por um promotor de um gene que codifica a sintase da cisteína (*cysK*) para aumentar a expressão de um gene que codifica *ppc*, que é uma primeira enzima na biossíntese da L-treonina depois da glicólise, produzia L-treonina com alto rendimento, completando, deste modo, a presente invenção.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

11. Uma ou mais modalidades da presente invenção proporcionam uma cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) capaz de produzir L-treonina com alto rendimento.

12. Uma ou mais modalidades da presente invenção também proporcionam um método de produzir L-treonina usando a cepa de

E. coli, por meio do que a L-treonina pode ser produzida com eficiência.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

13. As características e vantagens da presente invenção descritas acima e outras tornar-se-ão mais evidentes pela descrição em detalhe de modalidades exemplificativas da mesma com referência aos desenhos anexos em que:

14. a **Figura 1** é um diagrama que ilustra um processo de construção de um vetor recombinante pUC-PcysK; e

15. a **Figura 2** é um diagrama que ilustra um processo de construção de um vetor recombinante pUCpcysKmloxP.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

16. A presente invenção proporciona um microorganismo produtor de L-treonina em que um promotor de um gene de fosfoenolpiruvato carboxilase natural (*ppc*) sobre o cromossomo é substituído por um promotor de um gene da sintase da cisteína (*cysK*).

17. No microorganismo produtor de L-treonina, a expressão de *ppc* aumenta de tal modo que um promotor de um gene de codificação de *ppc*, que converte o fosfoenolpiruvato produzido depois da glicólise em oxaloacetato, o material de partida da biossíntese da L-treonina é substituído pelo promotor do gene *cysK* e a produtividade da L-treonina pode aumentar, em consequência.

18. O microorganismo pode incluir uma célula procariótica ou eucariótica capaz de produzir L-treonina em que um promotor de um gene *ppc* sobre o cromossomo é substituído por um promotor de um gene *cysK*. Por exemplo, o microorganismo pode ser uma cepa de microorganismo que pertence ao gênero da *Escherichia*, ao gênero da *Erwinia*, ao gênero da *Serratia*, ao gênero da *Providencia*, ao gênero da *Corynebacterium* ou ao gênero da *Brevibacterium*. Em particular, o

microorganismo pode ser um microorganismo que pertence à família da Enterobacteriaceae e, mais particularmente, um microorganismo que pertence ao gênero da *Escherichia*. Mais particularmente, o microorganismo pode ser *Escherichia coli* CA030031 (KCCM 10910).

19. A *E. coli* CA030031 é derivada a partir de *E. coli* KCCM 10541 que é derivada a partir de uma *E. coli* produtora de L-treonina, KFCC 10718 (Publicação de Patente coreana 92-8395). A *E. coli* KFCC 10718 tem resistência a um análogo da L-metionina, um fenótipo auxotrófico da metionina, resistência a um análogo da L-treonina, um fenótipo auxotrófico da isoleucina de escape, resistência a um análogo da L-lisina e resistência ao ácido α -aminobutírico e é capaz de produzir L-treonina. Deste modo, o microorganismo pode incluir também um microorganismo mutante para produzir L-treonina, além de um microorganismo do tipo selvagem. Por exemplo, o microorganismo mutante pode ser um microorganismo que tem resistência a um análogo da L-metionina, um fenótipo auxotrófico da metionina, resistência a um análogo da L-treonina, um fenótipo auxotrófico da isoleucina de escape, resistência a um análogo da L-lisina e resistência ao ácido α -aminobutírico e pertence à *E. coli* capaz de produzir L-treonina.

20. Numa modalidade, o microorganismo pode ser *E. coli* que tem um fenótipo auxotrófico da metionina e resistências a um análogo da treonina, um análogo da lisina, um análogo da isoleucina e um análogo da metionina. Por exemplo, o análogo da L-metionina pode ser pelo menos um composto selecionado a partir do grupo que consiste em D,L-metionina, norleucina, α -metilmetionina e L-metionina-D,L-sulfoximina, o análogo da L-treonina pode incluir pelo menos um composto selecionado a partir do grupo que consiste no ácido α -amino- β -hidroxi valérico e D,L-treonina hidroxamato e o análogo da L-lisina pode ser pelo menos um composto selecionado a partir do grupo que consiste em S-(2-aminoetil)-L-cisteína e δ -metil-L-lisina. Os exemplos do microorganismo mutante podem incluir um microorganismo em que

um gene *pckA* envolvido na conversão do oxaloacetato (OAA) em fosfoenol piruvato (PEP), que é um intermediário envolvido na biossíntese da L-treonina, é inativado, um microorganismo em que um gene *tyrR* que reprime um gene *lysC* que é envolvido na conversão do oxaloacetato em aspartato é inativado ou um microorganismo em que um gene *galR* que reprime a expressão de um gene *galP* que é envolvido no influxo de glicose é inativado.

21. No microorganismo da presente invenção, o promotor do gene *ppc* sobre o cromossomo é substituído pelo promotor do gene *cysK* para aumentar a expressão do mesmo. O promotor do gene *cysK* aqui usado pode ser derivado a partir de um gene *cysK* com uma taxa de expressão alta e pode ter uma seqüência de nucleotídios de SEQ ID NO: 10.

22. A presente invenção também proporciona um método de produção de L-treonina, incluindo o método: cultivar um microorganismo transformado com produtividade intensificada de L-treonina em que um promotor de um gene *ppc* natural sobre o cromossomo é substituído por um promotor de um gene *cysK*; e isolar a L-treonina a partir da cultura do microorganismo.

23. No método de produção de L-treonina, o microorganismo transformado pode ser *E. coli*, por exemplo, *E. coli* CA030031 (KCCM 10910).

24. Uma ou mais modalidades da presente invenção serão, agora, descritas mais completamente com referência aos exemplos seguintes. Todavia, estes exemplos são proporcionados apenas com propósitos ilustrativos e não se pretende que limitem o escopo da presente invenção.

Exemplo 1:

Construção do vetor recombinante pUCpcysKmloxP

(1) Preparação do fragmento Pcysk

25. Para obter um fragmento de DNA de 0,3 kb contendo um promotor de um gene *cysK* (SEQ ID NO: 10), foi extraído o DNA genômico (gDNA) de W3110, que é uma cepa de *E. coli* do tipo selvagem, usando um sistema QIAGEN Genomic-tip e foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR) usando o gDNA como gabarito e um kit PCR HL premix (fabricado por BIONEER, Coréia). Para amplificar o promotor do gene *cysK*, foi realizado PCR usando iniciadores de SEQ ID NOS: 1 e 2 como se segue: 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, anelando a 55°C durante 30 segundos e alongamento a 72°C durante 2,5 minutos.

26. Os produtos de PCR foram digeridos com KpnI e EcoRV, eletroforezados sobre um gel de agarose a 0,8% e então eluídos, para obter um fragmento de DNA de 0,3 kb (em seguida, chamado de “fragmento de PcysK”).

a. Construção do vetor recombinante pUC-PcysK

27. A Figura 1 é um diagrama que ilustra um processo de construção do vetor recombinante pUC-PcysK contendo um promotor de um gene *cysK*.

28. O plasmídeo pUC19 (New England Biolabs, EUA) e o fragmento de PcysK obtido de acordo com o Exemplo 1-(1) foram, cada um, digeridos com enzimas de restrição KpnI e SmaI e ligados um com o outro para construir o vetor pUC-PcysK.

b. Construção do vetor recombinante pUCpcysKmloxP

29. A Figura 2 é um diagrama que ilustra um processo de construção de um vetor recombinante pUCpcysKmloxP.

30. Em geral, numa experiência de deleção de genes causada por inativação de uma etapa, sempre que um gene é deletado, uma

seqüência de um sítio de reconhecimento da recombinase loxP permanece sobre um DNA cromossômico. Foi reportado que, devido às seqüências de loxP que permanecem sobre o DNA cromossômico, quando as cepa são adicionalmente modificadas para desenvolvimento adicional, a eficiência pode ser significativamente diminuída (Nagy A., *Genesis*, 26:99, 2000). Um método melhorado de deleção de genes usando mutantes loxP, que são chamados de lox71 e lox 66 foi proposto por Suzuki (*Appl. Environ. Microbiol.* 71:8472, 2005). Deste modo, para substituir mais eficientemente um promotor de um gene *ppc* sobre o cromossomo por um promotor de um gene *cysK* usando os mutantes loxP, construímos o vetor pUCpcysKloxP tendo tanto um cassete mutante loxP-Cm^R-loxP como o promotor do gene *cysK*.

31. Como mostrado na Figura 2, a PCR foi realizada usando o plasmídio pACYC184 (New England Biolab) como gabarito usando iniciadores de SEQ ID NOS: 3 e 4 como se segue: 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, anelamento a 55°C durante 30 segundos e alongamento a 72°C por 1 minuto para obter 1,1 kb de fragmento de PCR. O vetor pUC-PcysK construído de acordo com o Exemplo 1-(2) e o 1,1 kb de fragmento de DNA obtido usando pACYA184 como gabarito foram, cada um, digeridos com enzimas de restrição NdeI/KpnI, ligados um ao outro e transformados em *E. coli*. Então, foram selecionadas células tendo DNA ligados com precisão ao vetor usando um método geral e o plasmídio pUCpcysKloxP foi purificado a partir da cultura das células.

Exemplo 2:

Preparação de *E. coli* KCCM de 10541 *pcyks-ppc* recombinante

32. Para substituir um promotor nativo de um gene *ppc* (SEQ ID NO: 9) que codifica a fosfoenolpiruvato carboxilase sobre o

cromossomo por um promotor de um gene *cysK*, foi realizado um método de inativação conhecido (Warner *et al.*, *PNAS*, 6;97(12):6640, 2000) sobre *E. coli* KCCM 10541.

33. Primeiro, foi realizada PCR usando o plasmídio pUCpcysKmloxP construído de acordo com o Exemplo 1 como gabarito usando iniciadores de SEQ ID NOS: 5 e 8 como se segue: 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, anelamento a 55°C durante 30 segundos e alongamento a 72°C durante 1 minuto para obter fragmentos de DNA e os fragmentos de DNA obtidos foram purificados usando um kit de QIAGEN (kit de PCR Purification). Subseqüentemente, foi realizada mais PCR usando iniciadores de SEQ ID NOS: 6 e 7 e os fragmentos de DNA purificados como gabarito, como se segue: 30 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, anelamento a 55°C durante 30 segundos e alongamento a 72°C durante 1 minuto. Os fragmentos de DNA resultante foram purificados, os fragmentos de DNA purificados foram introduzidos por eletroporação em *E. coli* KCCM 10541 em que o vetor pKD46 foi introduzido (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97(12), 6640-6645(2000)) e uma colônia única foi selecionada sobre uma placa Luria-Bertani (LB) contendo 15 µg/mL de cloranfenicol. A cepa selecionada era uma cepa em que o fragmento de DNA foi inserido num sítio promotor de um gene *ppc*. O vetor pJW168 (*BMG Biothechnol.* 2001;1:7. 26 de setembro de 2001) foi introduzido na cepa selecionada para preparar *E. coli* KCCM 10541-PcyK-ppc recombinante em que o promotor *naive* do gene *ppc* foi substituído pelo promotor do gene *cysK*, por remoção do gene de resistência a antibióticos.

Exemplo 3:

Comparação quanto à produtividade de L-treonina entre microorganismos recombinantes

34. O microorganismo recombinante preparado de acordo

com o Exemplo 2 foi cultivado num meio de título de treonina, como mostrado na Tabela 1 abaixo, num frasco de Erlenmeyer, e foi confirmado se a produtividade de L-treonina foi melhorada.

Tabela 1

Composição	Concentração (por litro)
Glicose	70 g
KH_2SO_4	2 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	25 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5 mg
DL-metionina	0,15 g
Extrato de levedura	2 g
Carbonato de cálcio	30 g
pH	6,8

35. 1 alça de platina de *E. coli* KCCM 10541 e *E. coli* KCCM 10541 *pcysks-ppc* que foram cultivadas num meio sólido LB numa incubadora a 33°C durante a noite foram, cada uma, inoculadas em 25 ml de meio de título, como mostrado na Tabela 1, e cultivadas na incubadora a 33°C a 200 rpm durante 48 horas. Os resultados são mostrados na Tabela 2 abaixo.

36. Como mostrado na Tabela 2, quando a cepa mãe *E. coli* KCCM 10541 foi cultivada durante 48 horas, produziu 29,8 g/L de L-

treonina, enquanto a *E. coli* KCCM 10541 *pcysks-ppc* do Exemplo 2 produziu 34,7 g/L de L-treonina, que tem uma produtividade 4,9 g/L mais alta do que aquela da cepa mãe. Deste modo, foi confirmado que a cepa recombinante em que o promotor do gene *ppc* foi substituído pelo promotor do gene *cysK* tem produtividade intensificada de L-treonina. A *E. coli* KCCM 10541 *pcysks-ppc* transformada foi chamada de *E. coli* CA030031 e depositada no Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM) em 20 de dezembro de 2007 (Acesso No: KCCM 10910).

Tabela 2

Cepa	L-treonina (g/L)
KCCM10541 (cepa mãe)	29,8
KCCM10541-PcysK- <i>ppc</i>	34,7

37. Como descrito acima, de acordo com a presente invenção, num microorganismo em que um promotor de um gene *ppc* sobre o cromossomo é substituído por um promotor de um gene *cysK*, a expressão do gene *ppc*, que é uma enzima que converte fosfoenolpiruvato em oxaloacetato que é um precursor da biossíntese da L-treonina, aumenta, intensificando, assim, significativamente a produtividade de L-treonina em 16% ou mais. O microorganismo pode produzir L-treonina com alto rendimento e, deste modo, pode ser largamente usada nas indústrias médicas, farmacêuticas e de alimentação, particularmente para a alimentação animal.

38. Embora a presente invenção tenha sido particularmente mostrada e descrita com referência a modalidades exemplificativas da mesma, ficará entendido por aqueles de capacidade ordinária na técnica que podem ser nela feitas várias mudanças na forma e nos detalhes

sem sair do espírito e do escopo da presente invenção, conforme definida pelas Reivindicações seguintes.

REIVINDICAÇÕES

1. Cepa de *Escherichia coli* Produtora de L-Treonina, caracterizada por que um promotor de um gene da carboxilase fosfoenolpiruvato (*ppc*) sobre o cromossomo é substituído com um promotor de um gene da sintase da cisteína (*cysK*),

em que o promotor do gene *cysK* possui uma sequência nucleotídica de SEQ ID NO: 10.

2. Cepa de *Escherichia coli* Produtora de L-Treonina, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado** por ser *Escherichia coli* CA030031 de número de acesso KCCM 10910.

3. Método de Produção de L-Treonina, caracterizado por que compreende: cultivar a cepa *Escherichia coli* de acordo com qualquer uma das Reivindicações 1 e 2; e isolar a L-treonina a partir da cultura da cepa de *Escherichia coli*.

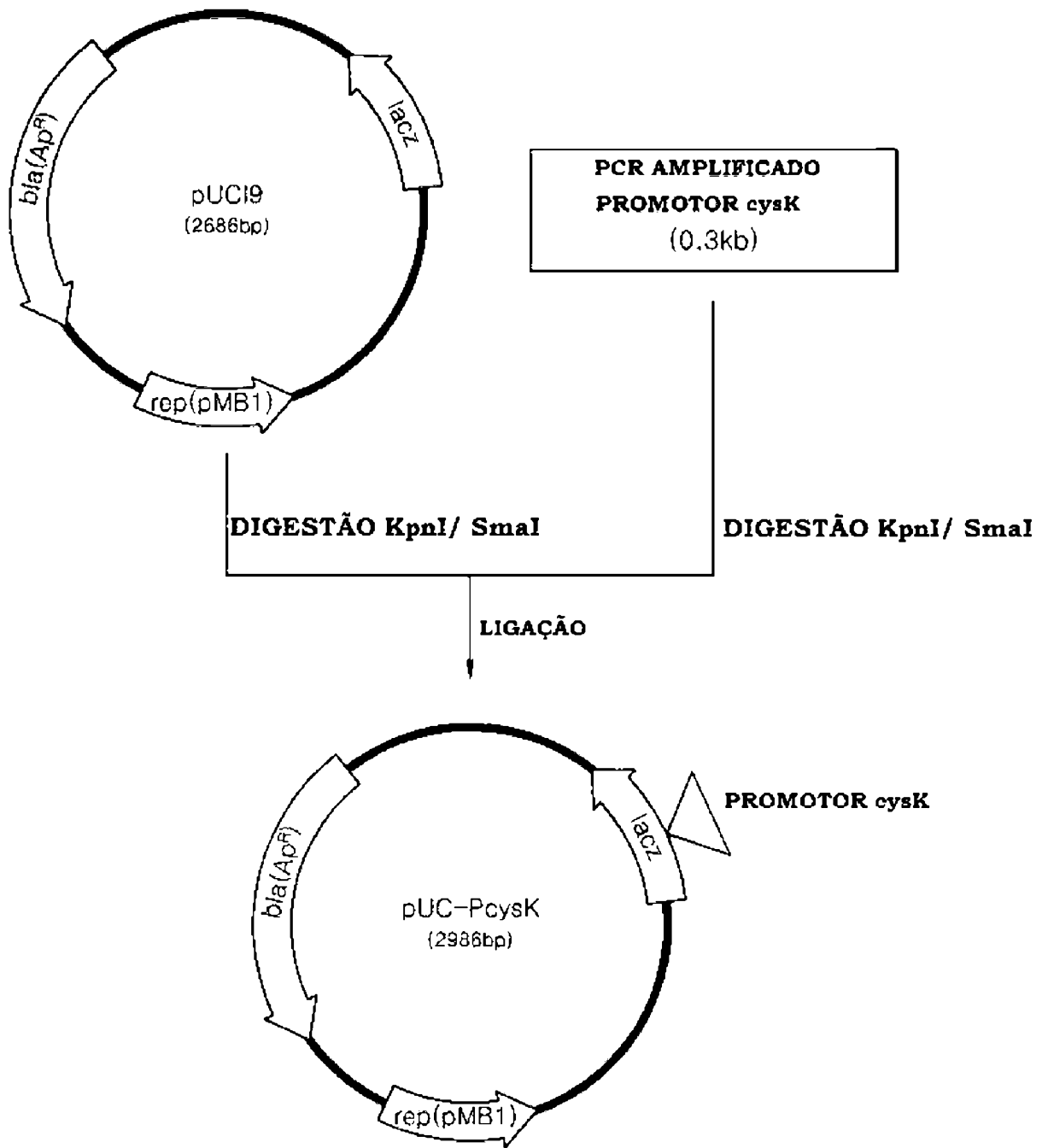
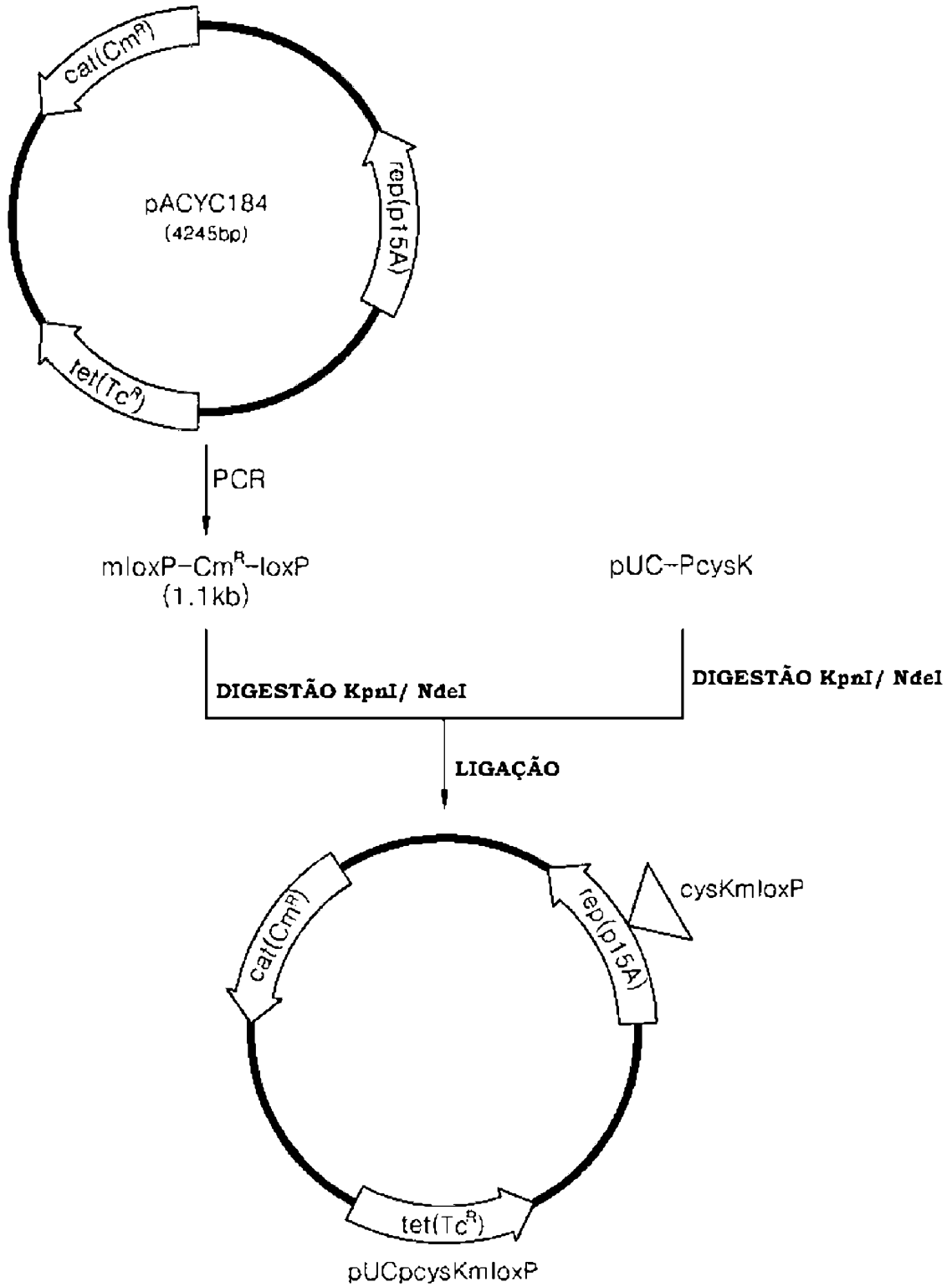


FIG. 1

**FIG. 2**