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

(11) BR 112015029716-1 B1

(22) Data do Depósito: 22/06/2015

(45) Data de Concessão: 19/07/2022

(54) Título: MICRORGANISMO PRODUTOR DE O-ACETIL HOMOSERINA E MÉTODO DE PRODUÇÃO O-ACETIL HOMOSERINA USANDO O MESMO

(51) Int.Cl.: C12N 1/21; C12N 15/52; C12P 13/06.

(30) Prioridade Unionista: 23/06/2014 KR 10-2014-0076779.

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

(72) Inventor(es): HYUN AH KIM; JU HEE SEO; YONG UK SHIN; SO YOUNG KIM; SANG KYOUM KIM; KWANG HO NA; JEE YEON BAE; SUNG KWANG SON; HYE RYUN YOO; JIN GEUN CHOI.

(86) Pedido PCT: PCT KR2015006307 de 22/06/2015

(87) Publicação PCT: WO 2015/199396 de 30/12/2015

(85) Data do Início da Fase Nacional: 26/11/2015

(57) Resumo: MICRORGANISMO PRODUTOR DE O-ACETIL HOMOSERINA E MÉTODO DE PRODUÇÃO O-ACETIL HOMOSERINA USANDO O MESMO. É descrito um microrganismo da Escherichia sp. produtor de O-acetil homoserina, e um método de produção de O-acetil homoserina com elevado rendimento usando o micro-organismo.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para: **"MICRORGANISMO PRODUTOR DE *O*-ACETIL HOMOSERINA E MÉTODO DE PRODUÇÃO *O*-ACETIL HOMOSERINA USANDO O MESMO".**

CAMPO TÉCNICO

[001] A presente invenção se refere a um microrganismo da *Escherichia sp*. produtor de *O*-acetil homoserina, e um método de produção de *O*-acetil homoserina com elevado rendimento usando o micro-organismo.

ANTECEDENTES DA TÉCNICA

[002] A *O*-acetil homoserina atua como um precursor da metionina, a qual é um dos aminoácidos essenciais para o corpo. A metionina tem sido amplamente utilizada como um componente de soluções de infusão médica e matéria-prima para produtos medicinais, bem como uma ração para animais e aditivo alimentar.

[003] A metionina pode ser biologicamente ou quimicamente sintetizada. Recentemente, um processo de duas etapas, em que um precursor de L-metionina produzido por fermentação é convertido em L-metionina por uma reação enzimática, foi divulgado (Publicação Internacional N° WO 2008/013432). No processo de duas etapas acima, *O*-succinil homoserina e *O*-acetil homoserina podem ser usados como o precursor da metionina, e é importante que a *O*-acetil homoserina seja produzida com rendimento elevado para a produção da metionina em larga escala e eficaz em termos de custos.

DESCRIÇÃO

PROBLEMA TÉCNICO

[004] Os inventores da presente invenção, procurando ao mesmo tempo melhorar a produção de *O*-acetil homoserina, descobriram que a redução da expressão ou atividade da proteína citrato sintase pode aumentar significativamente a capacidade de produção da *O*-acetil homoserina, completando assim a presente invenção.

SOLUÇÃO TÉCNICA

[005] Um objeto da presente invenção consiste em proporcionar um

microrganismo produtor de *O*-acetil homoserina com capacidade melhorada de produção *O*-acetil homoserina.

[006] Um outro objeto da presente invenção consiste em proporcionar um método para a produção da *O*-acetil homoserina usando o micro-organismo.

EFEITOS VANTAJOSOS

[007] O uso do microrganismo com capacidade de produção de *O*-acetil homoserina de acordo com a presente invenção pode produzir *O*-acetil homoserina em um rendimento mais elevado e de uma forma mais amiga do ambiente do que a síntese química. Além disso, a *O*-acetil homoserina assim produzida pode ser utilizada como um precursor para a síntese de metionina e de ácido acético pela *O*-acetil homoserina sulfidrilase, permitindo assim a bioconversão da L-metionina, e a L-metionina assim convertida pode ser amplamente utilizada na produção de alimentos ou aditivos alimentares para seres humanos, bem como alimentos para animais ou aditivos para a alimentação animal.

DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[008] FIG. 1 é um desenho do cassete de expressão para a construção de um microrganismo com uma atividade atenuada de citrato sintase.

[009] FIG. 2 é um mapa de restrição do ARN antissentido da *pBAD24*-citrato sintase (asRNA) do vetor**.**

MELHOR MODO

[010] Em um aspecto, a presente invenção proporciona um microrganismo da *Escherichia sp*. produtor de *O*-acetil homoserina, em que a atividade endógena da proteína e citrato sintase é atenuada ou inativada.

[011] Tal como aqui usado, o termo "*O*-acetil homoserina", sendo um material intermediário específico em uma via de biossíntese da metionina de um micro-organismo, se refere a um acetil-derivado da L-homoserina. *O*-acetil homoserina pode ser produzida por uma atividade da enzima de transferência de um grupo acetil a partir de acetil-CoA em homoserina usando homoserina e acetil-CoA como substratos.

[012] Tal como aqui usado, o termo “um microrganismo que produz *O*-acetil homoserina” inclui um micro-organismo, o qual, sendo um microrganismo eucariota ou procariota produtor de *O*-acetil homoserina dentro de um organismo vivo, é fornecido com capacidade de produção de *O*-acetil homoserina com o seu parente microrganismos em capacidade de produção de *O*-acetil homoserina, ou um microrganismo que é fornecido endogenamente com a capacidade de produção de *O*-acetil homoserina.

[013] Capacidades de produção de *O*-acetil homoserina podem ser fornecida ou promovida pela melhoria das espécies. Os micro-organismos tendo a capacidade de produzir *O*-acetil homoserina podem incluir microrganismo pertencente ao *Escherichia sp.*, *Erwinia sp.*, *Serratia sp.*, *Providencia sp.*, *Corynebacteria sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Leptospira spp.*, *Salmonella sp.*, *Brevibacteria sp.*, *Hypomononas sp*, *Chromobacterium sp*, e *Norcardia sp* ou fungos, ou leveduras.; especificamente, micro-organismos que pertence a *Escherichia sp*, *Corynebacteria sp*, *Leptospira sp*, e leveduras; e, mais especificamente, micro-organismos pertencente ao *Escherichia sp.*, como um exemplo específico, a *Escherichia coli*. Os micro-organismos tendo a capacidade de produção de *O*-acetil homoserina podem ser micro-organismos produtores de L-lisina, L-treonina, L-isoleucina, ou L-metionina, ou os seus derivados, mas não se limitam a estes.

[014] Tal como aqui usado, o termo “citrato sintase (EC 2.3.3.1)” se refere a uma enzima, na primeira etapa do ciclo de TCA que medeia a reação entre o oxaloacetato e acetil-CoA. Especificamente, a citrato sintase medeia a reação de condensação entre um resíduo de etil com dois átomos de carbono, o qual está na acetil-CoA e oxaloacetato tendo quatro átomos de carbono, gerando, assim, um citrato possuindo seis átomos de carbono. Em *Escherichia coli*, a citrato sintase é designada GltA, e citrato sintase e GltA são usados de forma permutável na presente invenção.

[015] acetil-CoA + oxaloacetato + H_2O -> + citrato + CoA-SH

[016] Especificamente, citrato sintase pode ser um derivada de

Escherichia sp., E mais especificamente, GltA derivada de *Escherichia coli*. Citrato sintase pode ser uma proteína que compreende uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID Nº: 4 ou aquelas que possuem uma homologia de 70% ou mais com a sequência de aminoácidos da SEQ ID Nº: 4, especificamente 80% ou mais, ou, mais especificamente, 90% ou mais. Além disso, como uma sequência que tem uma homologia, se a sequência de aminoácidos é uma que tenha a mesma atividade ou correspondente a da citrato sintase com a da SEQ ID Nº: 4, é óbvio que as sequências de aminoácidos com uma exclusão, modificação, substituição, ou uma adição, na parte das sequências também devem ser incluídas no âmbito da presente invenção. Além disso, com base no código genético degenerado, as sequências de polinucleotídeo que codificam a mesma sequência de aminoácidos e as suas variantes devem também ser incluídas no âmbito da presente invenção.

[017] Tal como aqui usado, o termo atividade “endógeno” se refere a um estado natural de uma proteína em um microrganismo ou um estado de atividade da proteína correspondente fornecida no microrganismo antes de modificação.

[018] A “a atenuação ou inativação de uma atividade da proteína em comparação com a sua atividade endógena” se refere a uma redução ou eliminação da atividade da proteína quando comparado com a que possuía no seu estado natural. A atenuação é um conceito que se refere a um caso em que a atividade de uma proteína é reduzida em comparação com a que originalmente possuída pelo microrganismo devido a uma alteração no gene que codifica a proteína, um caso em que o nível de expressão proteica global é menor do que a da cepa de tipo natural do micro-organismo, ou uma combinação dos mesmos, mas não está limitada a eles. A inativação inclui um caso em que o gene que codifica a proteína não é expresso como um tudo em comparação com a da cepa de tipo natural e um caso em que o gene é expresso, mas não apresenta atividade.

[019] A atenuação ou inativação da atividade de uma proteína pode ser conseguida por vários métodos bem conhecidos na arte. Exemplos dos referidos métodos podem incluir um método de substituir o gene que codifica a proteína no cromossomo com um gene modificado de modo a que a atividade enzimática pode ser reduzida, incluindo o caso quando a atividade da proteína é removida; um método de introdução de uma modificação na sequência do gene que codifica a regulação da expressão da proteína no cromossomo; um método de substituição da sequência do gene que codifica a proteína com uma sequência que tem uma atividade fraca ou nenhuma atividade de regulação da expressão; um método de remover uma parte ou a totalidade do gene que codifica a proteína no cromossomo; um método de introdução de um oligonucleotídeo antissentido (por exemplo, ARN antissentido), que inibe a tradução do ARNm em uma proteína através de uma ligação complementar ao transcrito do gene no cromossomo; um método para tornar impossível a ligação do ribossomo pela formação de uma estrutura secundária através da adição artificialmente de uma sequência de Shine-Dalgarno (SD) e a sua sequência complementar na extremidade dianteira da sequência SD do gene que codifica a proteína; um método de engenharia de transcrição reversa (RTE), que acrescenta um promotor, de modo a ser transcrito reversamente no terminal 3' da sequência aberta de leitura (ORF), da sequência correspondente, etc., e também inclui uma combinação dos mesmos, mas são não limitada aos mesmos.

[020] Especificamente, o método de exclusão de uma parte ou de todo o gene que codifica uma proteína pode ser realizada pela substituição do polinucleotídeo, que codifica a proteína alvo endógena no cromossomo através de um vetor para a inserção de cromossomos em um micro-organismo, com um polinucleotídeo ou um marcador de onde parte da sequência do polinucleotídeo está excluída. Por exemplo, pode ser usado um método de exclusão do gene por recombinação homóloga, mas não está limitado a ele. Além disso, tal como aqui usado, o termo “parte”, embora possa variar

dependendo do tipo de polinucleotídeo, pode fazer referência especificamente de 1 nucleotídeo a 300 nucleotídeos, mais especificamente de 1 nucleotídeo a 100 nucleotídeos, e ainda mais especificamente de 1 nucleotídeo a 50 nucleotídeos, mas não está limitado a estes.

[021] Além disso, o método da modificação da sequência de regulação da expressão pode ser realizado através da indução de uma variação na sequência de regulação da expressão da sequência do polinucleotídeo através de exclusão, inserção, substituição conservativa, substituição não conservativa, ou uma combinação das mesmas, de modo a atenuar mais a atividade da sequência de regulação da expressão; ou através da substituição da sequência do polinucleotídeo por uma sequência do polinucleotídeo com uma atividade mais fraca. A sequência do polinucleotídeo pode incluir um promotor, uma sequência operadora, uma sequência que codifica um domínio de ligação ao ribossomo, e uma sequência de regulação da terminação da transcrição e da tradução, mas não está limitado a estas.

[022] Além disso, o método de modificar a sequência do gene no cromossomo pode ser realizado através da indução de uma variação na sequência através da exclusão, inserção, substituição conservativa, substituição não conservativa, ou uma combinação das mesmas, de modo a atenuar mais a atividade da sequência de regulação da expressão; ou pela substituição da sequência com uma sequência melhorada de genes tendo uma atividade mais fraca ou uma sequência melhorada do gene tendo nenhuma atividade, mas não está limitado a estas.

[023] Especificamente, para a atenuação da atividade da proteína citrato sintase, parte de um aminoácido(s) na sequência de aminoácidos da proteína citrato sintase pode ser substituída com outro aminoácido(s). Mais especificamente, uma citrato sintase possuindo uma sequência de aminoácidos, em que o aminoácido 145 ou o aminoácido 167 da sequência de aminoácidos da proteína citrato sintase é substituído de tirosina (Y) ou lisina (K) para outro aminoácido(s) podem ser incluídas. Ainda mais especificamente, a

citrato sintase pode ser uma tendo uma sequência de gene que codifica um polipeptídio modificado, em que o aminoácido 145 da sequência de aminoácidos da proteína de citrato sintase é substituído de tirosina (Y) para alanina (A), e o aminoácido 167 é substituído de lisina (K) para alanina (A). Em particular, o número de resíduos de aminoácidos foi determinado por ordem sequencial depois de definir o aminoácido posicionado ao lado da metionina, que é codificada pelo códon de iniciação, como o primeiro aminoácido. O polipeptídio pode, respectivamente, ter uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID Nº: 1 ou 2. Além disso, se a atividade da citrato sintase é mais fraca do que a de um de tipo selvagem, a citrato sintase pode incluir sequências de aminoácidos possuindo uma homologia de 80% ou mais à da sequência de aminoácidos da SEQ ID Nº: 1 ou 2, especialmente 90% ou mais, mais especificamente de 95% ou mais, e ainda mais especificamente de 97% ou mais. Como uma sequência que tem uma homologia, se a sequência de aminoácidos é uma que tem substancialmente a mesmo atividade biológica ou correspondente a de uma proteína da SEQ ID Nº: 1 ou 2, é óbvio que as sequências de aminoácidos com uma exclusão, modificação, substituição, ou uma adição parcial das sequências, também devem ser incluídas no âmbito da presente invenção.

[024] Tal como aqui usado, o termo “homologia” se refere a um percentual de identidade entre dois polinucleotídeo ou frações polipeptídicas. A homologia entre as sequências a partir de uma fração de outra fração pode ser determinada por uma tecnologia conhecida no estado da técnica. Por exemplo, a homologia pode ser determinada pelo arranjo direto da informação da sequência entre duas moléculas polinucleotídicas diferentes ou dois polipeptídios diferentes, usando um programa de computador de arranjo e obtendo facilmente a informação da sequência. O programa de computador pode incluir BLAST (NCBI), CLC Main Workbench (CLC bio), MegAlignTM (DNASTAR Inc), etc. Além disso, a homologia entre os polinucleotídeos pode ser determinada por hibridação dos polinucleotídeo sob a condição de

formação de uma cadeia dupla estável entre regiões homólogas, decompondo com uma nuclease específica de cadeia simples, e determinar os fragmentos decompostos.

[025] Tal como aqui usado, o termo “homologia” se refere a uma relação entre as proteínas que possuem “origem evolutiva comum” incluindo proteínas homólogas derivadas a partir de proteínas da superfamília em todas as suas formas gramaticais ou com variações de escrita, e aquelas derivadas a partir de espécies diferentes. Essas proteínas (e os genes que codificam à mesma) têm homologias da sequência refletidas pelos elevados níveis de semelhança das sequências. No entanto, o termo “homologia”, pelo seu uso generalizado e uso na presente invenção, se referem a uma similaridade da sequência quando modificada por um adjetivo, tal como “muito elevada”, em vez de se referir a origem evolutiva comum.

[026] Em uma modalidade exemplar da presente invenção, o microrganismo pode ser um em que a atividade da gama cistationina sintase (CE 2.5.1.48), homoserina quinase (CE 2.7.1.39), ou a atividade de ambas são mais fracas do que as suas atividades endógenas, ou inativada.

[027] Tal como aqui usado, o termo “gama cistationina sintase” se refere a uma enzima que pode sintetizar cistationina pela reação química descrita abaixo, usando *O*-succinil homoserina e L-cisteína como substratos. Na presente invenção, a gama cistationina sintase de *E. coli*, é designada como “MetB”.

[028] *O*-succinil-L-homoserina + L-cisteína -> L-cistationina + succinato

[029] Especificamente, a gama cistationina sintase de *E. coli*, embora não esteja particularmente limitada a esta, pode ser uma proteína que compreende uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID Nº: 9 ou aquelas possuindo uma homologia de 70% ou mais com a sequência de aminoácidos da SEQ ID Nº: 9, especificamente 80% ou mais, e mais especificamente de 90% ou mais. Além disso, como uma sequência que tem uma homologia, se a sequência de aminoácidos é uma que tenha a mesma atividade da homoserina

quinase ou correspondente com a sequência de aminoácidos da SEQ ID Nº: 9, é óbvio que as sequências de aminoácidos com uma exclusão, uma modificação, uma substituição, ou uma adição parcial das sequências devem também ser incluídas no âmbito da presente invenção. Além disso, com base no código genético degenerado, sequências de polinucleotídeo que codificam a mesma sequência de aminoácidos e as suas variantes devem também ser incluídas no âmbito da presente invenção.

[030] O método para a atenuação e inativação da atividade da gama cistationina sintase pode ser realizada de acordo com o método descrito acima.

[031] Tal como aqui usado, o termo “homoserina-quinase” se refere a uma enzima que causa a fosforilação da serina, que realiza a reação química descrita abaixo. Na presente invenção, a homoserina quinase a partir de *E. coli*, é designado como “ThrB”.

[032] ATP + L-homoserina -> ADP + *O*-fosf*O*-L-homoserina

[033] Especificamente, homoserina quinase a partir de *Escherichia sp*, embora não particularmente limitada a esta, pode ser uma proteína que compreende uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID Nº: 11 ou aquelas que possuem uma homologia de 70% ou mais com a sequência de aminoácidos da SEQ ID Nº: 11, especificamente 80% ou mais, ou mais especificamente de 90% ou mais. Além disso, como uma sequência que tem uma homologia, se a sequência de aminoácidos é uma que tenha a mesma atividade da homoserina quinase ou correspondente com a sequência de aminoácidos da SEQ ID Nº: 11, é óbvio que as sequências de aminoácidos com uma exclusão, uma modificação, uma substituição, ou uma adição parcial das sequências, também devem ser incluídas no âmbito da presente invenção. Além disso, com base no código genético degenerado, sequências de polinucleotídeo que codificam a mesma sequência de aminoácidos e as suas variantes devem também ser incluídas no âmbito da presente invenção.

[034] O método para a atenuação e inativação da atividade da homoserina quinase pode ser realizado de acordo com o método descrito acima.

[035] Em um aspecto específico da presente invenção, o microrganismo pode ser um, em que a atividade da homoserina *O*-acetil transferase é ainda introduzida ou aumentada, ou a homoserina *O*-succinil transferase endógena é ainda modificada para ter a atividade da homoserina *O*-acetil transferase.

[036] Tal como aqui usado, o termo “homoserina *O*-acetil transferase (EC 2.3.1.31)” se refere a uma enzima possuindo uma atividade de transferência de um grupo acetil a partir da acetil-CoA à homoserina.

[037] Especificamente, o microrganismo de acordo com a presente invenção pode ser introduzido com a atividade da homoserina *O*-acetil transferase. A homoserina *O*-acetil transferase pode ser derivada de várias espécies de micro-organismos, por exemplo, a partir de um microrganismo selecionado a partir *Corynebacteria sp.*, *Leptospira sp.*, *Deinococcus sp.*, *Deinococcus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Mycobacterium sp.* e especificamente, a *O*-acetil homoserinatransferase pode ser aquelas que inclui as sequências de aminoácidos representadas pela SEQ ID Nº: 13 (*Leptospira meyeri*), SEQ ID Nº: 14 (*Corynebacterium glutamicum*), ou SEQ ID Nº: 15 (*Deinococcus radiodurans*), mas não está limitada a eles. Além disso, a homoserina *O*-acetil transferase pode ser uma proteína que compreende as sequências de aminoácidos acima ou aquelas possuindo uma homologia de 70% ou mais, com as sequências de aminoácidos acima referidas, especificamente, 80% ou mais elevadas, ou mais especificamente, de 90% ou mais. Além disso, com base no código genético degenerado, sequências de polinucleotídeo que codificam a mesma sequência de aminoácidos e as suas variantes devem também ser incluídas no âmbito da presente invenção.

[038] Exemplos de homoserina *O*-acetil transferase para serem utilizadas na presente invenção são revelados no pedido de patente coreano publicado sob o N° 10-2011-0023703 e pedido de patente europeu publicado sob o N° EP 2290051, e as descrições completas destes documentos de patentes podem ser incluídas como referências na presente invenção.

[039] Adicionalmente, a proteína, em que a homoserina *O*-succinil

transferase endógena (CE 2.3.1.46) é modificada para ter a atividade da homoserina *O*-acetil transferase, se refere a um polipeptídio, em que a especificidade do substrato do polipeptídio possuindo a atividade de homoserina *O*-succinil transferase é alterada de succinil-CoA a acetil-CoA. Além disso, a proteína modificada, embora não seja particularmente limitada a estas, pode ser um polipeptídio possuindo atividade homoserina *O*-acetil transferase, ao contrário do seu tipo selvagem, através da substituição de parte da sequência de aminoácidos do polipeptídio tendo atividade homoserina *O*-succinil transferase.

[040] Exemplos de homoserina *O*-succinil transferase podem ser um polipeptídio a partir de *Enterobacteria sp.*, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, ou *Escherichia sp.*, especificamente, um polipeptídio a partir de *Escherichia sp*. possuindo a atividade da homoserina *O*-succinil transferase, por exemplo, um polipeptídio possuindo atividade de homoserina *O*-succinil transferase a partir de *E. coli*. Mais especificamente, a homoserina *O*-succinil transferase a partir de *E. coli* pode ter a sequência de aminoácidos representada SEQ ID Nº: 16, mas não está limitada a elas. A homoserina *O*-succinil transferase a partir de *E. coli* é designado como “MetA”.

[041] A homoserina *O*-succinil transferase modificada pode ser um polipeptídio variante, na qual o aminoácido 111 do polipeptídio representado pela SEQ ID Nº: 16 ou polipeptídios possuindo uma homologia de 95% ou mais com a sequência do polinucleotídeos da SEQ ID Nº: 16 é substituído por ácido glutâmico, e, adicionalmente, o aminoácido 112 é substituído por treonina ou histidina. Especificamente, o polipeptídio pode ser um variante do polipeptídio possuindo a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID Nºs: 17 a 19. Além disso, o polipeptídio variante pode ser uma proteína que compreende uma sequência de aminoácidos possuindo uma homologia de 70% ou mais, com sequência de aminoácidos acima, mais especificamente de 80% ou mais, ou mais especificamente 90% ou mais. Além disso, com base no código genético degenerado, sequências de polinucleotídeos que codificam a mesma

sequência de aminoácidos e as suas variantes devem também ser incluídas no âmbito da presente invenção. A informação sobre a homoserina *O*-succinil transferase modificada pode ser obtida a partir do pedido de patente coreano publicado sob o N° 10-2012-0070531 ou publicação Internacional Nº WO 2012/087039, e a descrição inteira destes documentos de patentes são incluídas como referências na presente invenção.

[042] Tal como aqui usado, o termo “introdução ou aumento da atividade” se refere a fornecer a atividade de uma proteína particular a um microrganismo que não possui a proteína; ou aumento da atividade intracelular da proteína no microrganismo que possui a proteína, e assim por diante, e se refere ao aumento da atividade intracelular da proteína em comparação com a atividade endógena da proteína.

[043] Tal como aqui usado, o termo “introdução ou aumento da atividade da proteína” se refere não só para o desenho de um efeito maior do que a função original, devido ao aumento da atividade da própria proteína, mas também o aumento na atividade da proteína devido ao aumento da atividade do gene endógeno, a amplificação do gene endógeno por fatores internos ou externos, o aumento do número de cópias, a introdução de genes a partir do exterior, o aumento da atividade da enzima em função da substituição, modificação ou mutação, etc., mas não está limitada a estas.

[044] No exemplo acima, o aumento do número de cópias do gene, embora não seja particularmente limitado a isso, pode ser realizado em um estado operativamente ligado a um vetor, ou por ser inserida no cromossomo dentro de uma célula hospedeira. Especificamente, o método pode ser executado através da introdução de um vetor, no qual um polinucleotídeo que codifica a proteína da presente invenção é operativamente ligado a, e pode ser replicado e funcionar independentemente de um hospedeiro, em uma célula do hospedeiro; ou a introdução de um vetor, ao qual o polinucleotídeo está operativamente ligado, inserindo o polinucleotídeo no cromossomo da célula hospedeira, na célula hospedeira, aumentando assim o número de cópias do

gene dentro do cromossomo da célula hospedeira.

[045] O vetor é uma construção de ADN incluindo a sequência do polinucleotídeo do polinucleotídeo que codifica a proteína alvo, o qual está operativamente ligado a uma sequência de regulação adequada de modo a que a proteína alvo possa ser expressa em um hospedeiro adequado, em que a sequência de regulação inclui um promotor de iniciação da transcrição, uma sequência operadora aleatória para a regulação da transcrição, uma sequência que codifica um domínio adequado de ligação do ARNm ao ribossomo, e uma sequência de regulação da transcrição e da tradução. O vetor, depois de ser transformado em uma célula hospedeira adequada, pode ser replicado ou funcionar independentemente do genoma do hospedeiro, ou pode ser integrado ao genoma do hospedeiro por si próprio.

[046] O vetor usado na presente invenção não pode ser especificamente limitado uma vez que o vetor é replicado na célula hospedeira, e qualquer vetor conhecido na arte pode ser usado. Exemplos do vetor podem incluir plasmídeos naturais ou recombinantes, cosmídeos, vírus e bacteriófagos. Por exemplo, como um vetor de fago ou vetores cosmídeo, *pWE15*, *M13*, *λMBL3*, *λMBL4*, *λIXII*, *λASHII*, *λAPII*, *λt10*, *λt11*, *Charon4A*, *Charon21A*, etc, podem ser usados; e como um vetor plasmidial, com base no *pBR*, com base no *pUC*, com base no *pBluescriptII*, com base no *pGEM*, com base no *pTZ*, com base no *pCL*, com base no *pET*, etc., podem ser usados. Especificamente, os vetores *pDZ*, *pACYC177*, *pACYC184*, *pCL*, *pECCG117*, *pUC19*, *pBR322*, *pMW118*, *pCC1BAC*, etc., podem ser usados.

[047] Além disso, um polinucleotídeo que codifica uma proteína alvo endógena pode ser substituído por um polinucleotídeo modificado usando um vetor para a inserção no cromossomo de um micro-organismo. A inserção do polinucleotídeo no cromossomo pode ser realizada usando um método conhecido na arte, por exemplo, por recombinação homóloga. Uma vez que o vetor da presente invenção pode ser inserido no cromossomo por recombinação homóloga, um marcador de seleção para confirmar a inserção

no cromossomo pode ser adicionalmente incluído. O marcador de seleção é usado para a seleção de uma célula transformada, por exemplo, a fim de confirmar se o polinucleotídeo alvo foi inserido, e marcadores fornecendo fenótipos selecionáveis, tais como resistência a drogas, exigência de nutrientes, resistência a agentes citotóxicos, e expressão de proteínas da superfície podem ser usados, mas não se limitam a estes. Sob as circunstâncias em que os agentes de seleção são tratados, apenas as células que expressam os marcadores de seleção podem sobreviver ou expressar outras características fenotípicas, e assim as células transformadas podem ser facilmente selecionadas.

[048] Tal como aqui usado, o termo “transformação” se refere a um processo de introdução de um vetor incluindo um polinucleotídeo que codifica uma proteína alvo em uma célula hospedeira permitindo assim a expressão do polinucleotídeo codificado pela proteína na célula hospedeira. Para o polinucleotídeo transformado, não importa se é inserido no cromossomo de uma célula hospedeira e aí localizado e situado fora do cromossomo, desde que possa ser expresso na célula hospedeira. Além disso, o polinucleotídeo inclui ADN e ARN que codificam a proteína alvo. O polinucleotídeo pode ser inserido em qualquer forma na medida em que pode ser introduzido em uma célula hospedeira e aí expresso. Por exemplo, o polinucleotídeo pode ser introduzido em uma célula hospedeira sob a forma de um cassete de expressão, que é uma construção genética incluindo todos os elementos essenciais necessários para o auto expressão. O cassete de expressão pode convencionalmente incluir um promotor operativamente ligado ao polinucleotídeo, um sinal de terminação da transcrição, um domínio de ligação ao ribossomo, e um sinal de terminação da tradução, e pode estar na forma de um vetor de expressão capaz de auto replicação. Além disso, o polinucleotídeo pode ser introduzido em uma célula hospedeira tal como está, e operativamente ligado a uma sequência essencial para a sua expressão na célula hospedeira. Além disso, tal como aqui usado, o termo “operativamente

ligado" se refere a uma ligação funcional entre uma sequência do promotor, que inicia e medeia a transcrição do polinucleotídeo que codifica a proteína alvo, e a sequência do gene.

[049] Em seguida, a modificação da sequência de regulação da expressão para o aumento da expressão do polinucleotídeo, apesar de não ser particularmente limitada à mesma, pode ser realizada através da indução de uma variação na sequência do polinucleotídeo através de exclusão, inserção, substituição conservativa, substituição não conservativa, ou uma combinação destas, de modo a aumentar ainda mais a atividade da sequência de regulação da expressão; ou através da substituição da sequência do polinucleotídeo por uma sequência do polinucleotídeo com uma atividade mais forte. A sequência de regulação da expressão, embora não seja particularmente limitado a estes, podem incluir um promotor, uma sequência de operador, uma sequência que codifica um domínio de ligação ao ribossomo, e uma sequência de regulação da terminação da transcrição e da tradução, etc. Além disso, um promotor exógeno forte, em vez do promotor original, pode ser ligado à extremidade superior da unidade de expressão do polinucleotídeo.

[050] Além disso, a modificação da sequência do polinucleotídeo no cromossomo, apesar de não ser particularmente limitada à mesma, pode ser realizada através da indução de uma variação na sequência de regulação da expressão da sequência do polinucleotídeo através de exclusão, inserção, substituição conservativa, substituição não conservativa, ou uma combinação destas, de modo a aumentar ainda mais a atividade da sequência do polinucleotídeo; ou através da substituição da sequência do polinucleotídeo por uma sequência do polinucleotídeo melhorada com uma atividade mais forte.

[051] Geralmente, a introdução e o aumento da atividade de proteína pode aumentar a atividade ou concentração de proteína correspondente em relação à atividade ou concentração de uma proteína do tipo selvagem ou em um microrganismo a partir de pelo menos, 1%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, ou 500%, com um máximo de 1000% ou 2000%.

[052] Além disso, o microrganismo pode ser um em que a atividade da homoserina *O*-succinil transferase endógena foi atenuada ou inativada em comparação com a atividade endógena, a fim de melhorar a via de biossíntese da *O*-acetil homoserina, bloqueando a via de biossíntese da *O*-succinil homoserina a partir da homoserina.

[053] A atenuação e a inativação da atividade da *O*-succinil homoserinatransferase pode ser realizada de acordo com o método explicado acima.

[054] Em uma modalidade exemplificativa da presente invenção, o microrganismo produtor da *O*-acetil homoserina pode ser um em que a atividade de uma enzima envolvida na via de biossíntese do fosfoenol piruvato a homoserina é adicionalmente introduzida ou aumentada, a fim de aumentar ainda mais a quantidade de homoserina, um substrato para a biossíntese de *O*-acetil homoserina.

[055] Especificamente, o microrganismo acima pode ser um, em que a atividade de pelo menos uma proteína selecionada a partir do grupo consistindo de fosfoenol piruvato carboxilase (ppc, EC 4.1.1.31), aspartato aminotransferase (aspC, EC 2.6.1.1), e aspartato semialdeído desidrogenase (asd, EC 1.2.1.11) é ainda introduzida ou aumentada.

[056] Por exemplo, o gene *ppc* que codifica fosfoenol piruvato carboxilas incluindo uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID Nº: 20, gene *aspC* que codifica aspartato amino transferase incluindo uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID Nº: 21, e o gene *asd* que codifica aspartato semialdeído desidrogenase incluindo um aminoácido representado pela SEQ ID Nº: 22 podem ser introduzidos em um micro-organismo. Por exemplo, as atividades das três diferentes enzimas podem ser introduzidos e aumentada fazendo todos os genes que codificam as três enzimas diferentes presentes no cromossomo de uma célula hospedeira com um número de cópias de pelo menos 2, mas não está limitado a estes. A introdução e o aumento das atividades podem ser realizadas de acordo com o método

descrito acima.

[057] Em uma modalidade exemplar da presente invenção, a atividade da proteína citrato sintase foi atenuada ou inativada por vários métodos, que incluem a exclusão do gene da citrato sintase em um microrganismo *E. coli* produtor da *O*-acetil homoserina; introdução do gene que codifica a proteína citrato sintase modificada, cuja atividade foi atenuada em comparação com a de um tipo selvagem, na posição do gene da citrato sintase; e introdução de um vetor de expressão de um gene ARN antissentido da citrato sintase. Como resultado, o microrganismo produtor da *O*-acetil homoserina assim construído, no qual a atividade da proteína citrato sintase foi atenuado ou inativado, mostrou uma capacidade de produção da *O*-acetil homoserina melhorada, em comparação com a do microrganismo parental (Exemplos 1 a 4).

[058] Em um outro aspecto, a presente invenção proporciona um método para produzir *O*-acetil homoserina usando um microrganismo produtor *O*-acetil homoserina com uma capacidade de produção melhorada da *O*-acetil homoserina. Especificamente, a presente invenção proporciona um método para a produção de *O*-acetil homoserina incluindo (a) a cultura do micro-organismo; e (b) recuperar *O*-acetil homoserina produzida durante o cultivo do micro-organismo.

[059] O método de cultura da *E. coli* tendo uma capacidade de produção de *O*-acetil homoserina de acordo com a presente invenção pode ser realizado de acordo com os meios e condições de cultura adequados conhecidos na arte. O processo de cultivo pode ser facilmente ajustado por um perito na arte, dependendo do microrganismo a ser selecionado. Em particular, uma vez que o microrganismo da presente invenção é um micro-organismo, onde a atividade da citrato sintase, que é uma enzima que medeia à primeira etapa do ciclo do TCA, é atenuado ou inativado, o meio de cultura pode incluir glutamato, mas não é especificamente limitado a este.

[060] Os exemplos dos métodos de cultura podem incluir uma cultura em lotes, uma cultura contínua, e uma cultura em lotes com alimentação, mas não

estão limitados a estes. Estes vários métodos são, por exemplo, divulgados em “Biochemical Engineering” por James M. Lee, Edições Prentice-Hall International, pp 138-176.

[061] O meio usado na cultura pode apropriadamente satisfazer a exigência de um microrganismo específico. Especificamente, exemplos de meios de cultura para micro-organismos são divulgados em “Manual of Methods for General Bacteriology” pela American Society for Bacteriology, Washington, DC, 1981. Os meios de cultura podem ser aqueles que incluem uma fonte de carbono adequada, a fonte de fósforo, composto inorgânico, aminoácidos, e/ou vitaminas, etc., e o cultivo pode ser realizado em condições aeróbicas, enquanto se ajusta a temperatura, pH, etc.

[062] Exemplos da fonte de carbono podem incluir carboidratos tais como glicose, lactose, sacarose, ácido láctico, frutose, maltose, amido, e celulose; gorduras, tais como óleo de soja, óleo de girassol, óleo de rícino, óleo de berbere, e óleo de coco; ácidos graxos tais como ácido palmítico, ácido esteárico e ácido linoleico; álcoois, tais como glicerol e etanol; e ácidos orgânicos tais como ácido acético. Estas fontes de carbono podem ser usadas sozinhas ou em combinação, mas não estão limitados a estas.

[063] Exemplos da fonte de nitrogênio podem incluir fontes de nitrogênio orgânico tal como a peptona, extrato de levedura, molho de carne, extrato de malte, licor de infusão de milho (CSL), e farinha de feijão; e fontes de nitrogênio inorgânicas, tais como ureia, sulfato de amônia, cloreto de amônia, fosfato de amônia, carbonato de amônia e nitrato de amônia. Estas fontes de nitrogênio podem ser usadas isoladamente ou em combinação, mas não estão limitadas a estas. O meio de cultura pode ainda incluir, como fonte de fósforo, dihidrogenofosfato de potássio, hidrogenofosfato dipotássico, e sais correspondentes contendo sódio. Os meios de cultura podem incluir metais, tais como sulfato de magnésio e sulfato de ferro. Adicionalmente, aminoácidos, vitaminas e precursores adequados podem ser incluídos. Estes meios de cultura ou precursores podem ser adicionados à cultura sob a forma de uma

cultura em lotes ou cultura contínua, mas não estão limitadas a estas.

[064] Além disso, o pH da cultura pode ser ajustado pela adição de um composto, tal como hidróxido de amônia, hidróxido de potássio, amônia, ácido fosfórico, e ácido sulfúrico durante a cultura de um modo adequado. Além disso, a formação de bolhas pode ser evitada durante a cultura usando um agente anti-espuma tal como o éster poliglicólico de ácido graxo. Além disso, a fim de manter as condições aeróbicas no líquido da cultura, um gás oxigênio ou um gás (por exemplo, ar) que contém um gás oxigênio pode ser adicionado a uma cultura. A temperatura da cultura pode ser de 20 ℃ a 45 ℃, e especialmente de 25 ℃ a 40 ℃, mas não está limitado a estas. O cultivo pode ser continuado até que a produção da *O*-acetil homoserina atinja o nível pretendido, e especificamente durante 10 horas a 160 horas, mas não está limitado a este.

[065] O método de produção de *O*-acetil homoserina da presente invenção pode ainda incluir a recuperação da *O*-acetil homoserina do microrganismo cultivado ou um produto cultivado do mesmo. A recuperação da *O*-acetil homoserina pretendida, pode ser realizada por um método de cultivo de micro-organismos de acordo com a presente invenção, por exemplo, um método adequado conhecido na arte, tais como uma cultura em lotes, uma cultura contínua, e uma cultura em lotes com alimentação.

[066] A recuperação pode incluir uma etapa de purificação.

[067] A *O*-acetil homoserina assim recuperada pode produzir metionina por um processo de duas etapas (Patente Coreana N° 10-0.905.381).

[068] O processo em duas etapas inclui um processo de produção de L-metionina e de um ácido orgânico por uma reação enzimática usando uma enzima possuindo atividade da *O*-acetil homoserina sulfidrilase ou um microrganismo possuindo a enzima, durante a utilização da *O*-acetil homoserina, que foi produzida pelo microrganismo produtor do precursor da L-metionina, e metil mercaptano como substratos.

[069] Mais especificamente, a presente invenção proporciona um método

para a produção de L-metionina por uma reação enzimática da *O*-acetil homoserina sulfidrilase, etc, usando *O*-acetil homoserina, que foi acumulada pelo método acima descrito, como um substrato.

[070] Na segunda etapa, quando a *O*-acetil homoserina é usada como um precursor de L-metionina, *O*-acetil homoserina sulfidrilase derivada de um micro-organismo, especificamente pertencentes a *Leptospira sp.*, *Chromobacterium sp.*, e *Hyphomonas sp.*, e mais especificamente pertencente a *Leptospira meyeri, Pseudomonas aurogenosa, Hyphomonas Neptunium,* e *Chromobacterium violaceum* pode ser usado.

[071] A reação é a mesma, como mostrado abaixo.

[072] CH_3SH + L-homossrina *O*-acetil <=> acetato + metionina

[073] O processo adicional para a produção de metionina é revelado na patente Coreana N° 10-0905381, e toda a descrição da patente pode ser incluída como referência na presente invenção.

MODO DA INVENÇÃO

[074] Daqui em diante, a presente invenção será descrita em mais detalhes com referência aos Exemplos seguintes. No entanto, estes exemplos são apenas para fins ilustrativos, e a invenção não se destina a ser limitada por estes Exemplos.

Exemplo de Referência: Construção do microrganismo produtor de *O*-acetil homoserina

<1-1> exclusão do gene *metB* derivado da *E. coli* tipo selvagem (Publicação Internacional N° WO 2008/013432)

[075] Um microrganismo produtor de *O*-acetil homoserina foi construído usando *E. coli*, um microrganismo representativo dentre a *Escherichia sp*. Para este fim, a *E. coli* K12 W3110 (ATCC27325) de tipo selvagem obtida da American Type Culture Collection (ATCC) foi usada. Em primeiro lugar, a fim de bloquear a via de síntese da L-*O*-succinil homoserina em cistationina, o gene que codifica a *metB* cistationina sintase (SEQ ID Nº: 10) foi excluído. Especificamente, o gene que codifica a *metB* cistationina sintase foi excluído

através de um método de PCR de exclusão FTR de uma etapa (PNAS (2000) vol 97: P6640-6645).

[076] Especificamente, o cassete de exclusão *metB* foi construído através de uma reação de PCR com base no vetor *pKD3* (PNAS (2000) vol 97: P6640-6645) como um molde usando os iniciadores da SEQ ID Nºs: 30 e 31 como se segue: 30 ciclos de desnaturação a 94 ℃ durante 30 segundos, anelamento a 55 ℃ durante 30 segundos, e extensão a 72 ℃ durante 1 minuto. O produto de PCR resultante foi submetido a eletroforese em um gel de agarose 1,0%, e uma banda de ADN de 1,2 kb dele obtida foi purificada. O fragmento de ADN recuperado foi eletroporado em *E. coli* (K12) *W3110*, que foi previamente transformada com o vetor *pKD46* (PNAS (2000) vol 97: P6640-6645). Para a eletroporação, a cepa *W3110* transformada com o *pKD46* foi cultivada em meio LB contendo 100 μg/L de ampicilina e 5 mM de arabinose (L-arabinose) a 30 ℃ até DO_{600} = 0,6, e usada após a lavagem duas vezes com água destilada estéril e uma vez com 10% de glicerol. A eletroporação foi realizada a 2500 V. A cepa recuperada foi riscada sobre uma placa de LB contendo 25 μg/L de cloranfenicol, cultivada a 37 ℃ overnight, e a cepa mostrando resistência foi selecionada. A cepa selecionada foi submetida a uma reação de PCR sob as mesmas condições com base na cepa molde usando os mesmos iniciadores, e a supressão do gene *metB* foi confirmada através da observação do gene com tamanho de 1,2 kb em um gel de agarose 1,0%. A cepa assim confirmada foi cultivada em meio LB após ser transformada novamente com o vetor *pCP20* (PNAS (2000) vol 97: P6640-6645), e a cepa final contendo o gene *metB* excluído, na qual o tamanho do gene foi reduzido para 150 pb, em um gel de agarose a 1,0% através de PCR efetuado nas mesmas condições, foi construído e a remoção do marcador de cloranfenicol foi confirmada. A cepa assim construída foi designada como "*W3-B*".

<1-2> Exclusão do gene *thrB* (Publicação Internacional N° WO 2008/013432)

[077] Em um esforço para aumentar a quantidade de síntese de *O*-succinil

homoserina a partir da homoserina, o gene *thrB*, que é um gene que codifica homoserina quinase, foi excluído. Para a exclusão do gene *thrB* a partir da cepa *W3-B* construída no Exemplo 1, foi usado o método de PCR de exclusão por FRT de uma etapa usado na exclusão do gene *metB*.

[078] Uma cassete de exclusão *thrB* foi construído através de PCR com base no vetor *pKD4* (PNAS (2000) vol 97: P6640-6645) como um molde usando os iniciadores das SEQ ID Nºs: 32 e 33 como se segue: 30 ciclos de desnaturação a 94 ℃ durante 30 segundos, anelamento a 55 ℃ durante 30 segundos, e extensão a 72 ℃ durante 1 minuto.

[079] O produto do PCR resultante foi submetido à eletroforese em um gel de agarose 1,0%, e uma banda de DNA de 1,6 kb dela obtida foi purificada. O fragmento de DNA recuperado foi eletroporado na cepa *W3-B*, que já foi transformada com o vetor *pKD46*. A cepa recuperada foi riscada sobre uma placa de LB contendo 50 μg/L de canamicina, cultivada a 37 ℃ overnight, e foi selecionada a cepa mostrando resistência.

[080] A cepa selecionada foi submetida a uma reação de PCR nas mesmas condições diretamente com base na cepa molde usando os mesmos iniciadores das SEQ ID Nºs: 32 e 33, e a exclusão do gene da *thrB* foi confirmada pela seleção da cepa com o gene tendo um tamanho de 1,6 kb em um gel de agarose 1,0%. A cepa assim confirmada foi cultivada em um meio LB após novamente transformada com o vetor *pCP20*, e a cepa final com o gene *thrB* excluído, o qual o tamanho do gene foi reduzido a 150 pb em um gel de agarose a 1,0% através de PCR efetuada sob as mesmas condições, foi construído e a remoção do marcador de canamicina foi confirmada. A cepa assim construída foi designada como "*W3-BT*".

<1-3> Uma variante *metA* com atividade homoserina acetil transferase (Publicação Internacional Nº WO 2012/087039)

[081] A fim de reforçar a atividade da homoserina acetil transferase na cepa obtida no Exemplo de Referência <1-2>, que se destina a introduzir o gene *metA* tipo mutante (SEQ ID Nºs: 24 e 26) que codifica a homoserina acetil

transferase.

[082] Em primeiro lugar, a fim de construir a variante do gene *metA* com uma atividade reforçada, foi realizada uma reação de PCR com base no cromossomo de uma cepa *W3110* tipo selvagem como modelo, usando os iniciadores da SEQ ID Nºs: 34 e 35, e o gene *metA* que codifica a homoserina *O*-succinil transferase foi amplificado.

[083] Os iniciadores usados na reação de PCR foram preparados com base na sequência de polinucleotídeo do cromossomo *de E. coli*, NC_000913, registado no NIH Gene Bank, e os iniciadores da SEQ ID Nºs: 34 e 35 têm os sítios de restrição *EcoR*V e *Hind*III, respectivamente. O produto de PCR assim obtido e o plasmídeo *pLC1920* incluindo *Pcj*1 foram tratados respectivamente com *EcoR*V e *Hind*III, e o produto de PCR foi clonado no plasmídeo *pLC1920*. *E. Coli* DH5α foi transformada usando o plasmídeo clonado, e a *E. coli* DH5α transformada foi selecionada em placas de LB contendo 50 μg/ml de espectinomicina, e o plasmídeo foi obtido a partir deste. O plasmídeo assim obtido foi designado como "*pCL_Pcj1_metA*".

[084] Em seguida, o 111º aminoácido, glicina (Gly), da *O*-succinil transferase foi substituído por ácido glutâmico (Glu) (G111E) baseado no plasmídeo *pCL_Pcj1_metA* construído acima como um molde usando um kit de mutagênese sítio dirigida (Stratagene, EUA). O plasmídeo assim construído, incluindo a variante do gene G111E *metA* foi designado como "*pCL_Pcj1_metA* (EL)".

[085] Adicionalmente, a fim de substituir o 111º aminoácido da *O*-succinil transferase de glicina para ácido glutâmico, e o 112º aminoácido de leucina para histidina, os iniciadores da SEQ ID Nºs: 38 e 39 foram usados. O plasmídeo incluindo o gene *metA*, no qual o 111º aminoácido foi substituído de glicina para ácido glutâmico, e o aminoácido 112º foi substituído de leucina para histidina foi designado como "*pCL_Pcj1_metA* (EH)".

[086] Então, um cassete de substituição, para a substituição com *metA* (EH) em uma cepa, foi construído por meio de PCR usando vetor *pKD3* como

molde, juntamente com os iniciadores da SEQ ID Nºs: 40 e 41 como se segue: 30 ciclos de desnaturação a 94 ℃ durante 30 segundos, anelamento a 55 ℃ durante 30 segundos, e extensão a 72 ℃ durante 2 minutos. O respectivo produto de PCR foi obtido usando *pCL-pcj1-metA* (EH) como um molde para a parte *metA* (EH) do cassete de substituição juntamente com iniciadores da SEQ ID Nºs: 42 e 43, e os iniciadores da SEQ ID Nºs: 42 e 45 para a parte *metA* tipo selvagem. Cassetes de substituição *metA* (EH), incluindo a parte marcadora de cloranfenicol foram construídos usando os três produtos diferentes de PCR, juntamente com os iniciadores da SEQ ID Nºs: 42 e 45, e a eletroporação na cepa *W3-BT*, que já foi transformada com o vetor *pKD46*, construído no Exemplo de Referência <1-2>. A cepa assim confirmada foi cultivadas em um meio LB após ser transformada novamente com o vetor *pCP20*, e a cepa, em que o marcador cloranfenicol foi removido, e o gene *metA* foi substituído por *metA* (EH) foi designado como "*W3-BTA*".

<1-4> Construção de uma cepa com 2 cópias dos genes *ppc*, *aspC*, e de *asd* (Pedido de Patente Europeu Publicado sob N° EP 2290051)

[087] A fim de aumentar a capacidade de produção da *O*-acetil-serina da cepa *W3-BTA* construída no Exemplo de Referência <1-3>, a via biossintética foi aumentada conforme citando no pedido de patente antecedente EP 2290051. Do mesmo modo como na patente EP acima, uma cepa com 2 cópias amplificadas de cada um dos genes, ou seja, o gene *ppc* que codifica a fosfoenol piruvato carboxilase usando os iniciadores da SEQ ID Nºs: 46, 47, 48 e 49; o gene *aspC* que codifica a aspartato aminotransferase usando os iniciadores da SEQ ID Nºs: 50 e 51; e o gene *asd* que codifica a aspartato semialdeído desidrogenase usando os iniciadores da SEQ ID Nºs: 52, 53, 54, e 55, foi construído. Em particular, a cepa acima com uma via biossintética aumentada enquanto produz *O*-acetil homoserina, foi designada como "*W3-BTA2PCD*" (também chamada de "*WCJM*").

<1-5> Experimentos em frasco de cultura

[088] A quantidade de produção de *O*-acetil homoserina pela cepa

construída nos Exemplos de Referência <1-3> e <1-4> foi testada através de um frasco Erlenmeyer de cultura.

[089] Especificamente, as cepas *W3110, W3-BTA*, e *WCJM* foram inoculadas em meio LB, e cultivadas a 33 ℃ overnight. Em seguida, uma única colônia desta foi inoculada em 3 mL de meio LB, cultivada a 33 ℃ durante 5 horas, diluída 200 vezes em um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL de um meio de produção de *O*-acetil homoserina, cultivada a 33 ℃ a uma velocidade de 200 rpm durante 30 horas, e a quantidade de produção de *O*-acetil homoserina foi examinada através de análise por HPLC. As composições dos meios usados são mostradas na Tabela 1 abaixo, e a quantidade de produção de *O*-acetil homoserina examinado é mostrada na Tabela 2 abaixo.

[090] [Tabela 1] Composição do frasco de cultura produzindo *O*-acetil homoserina

Composição	**Conc. (por litro)**
glicose	40 g
$(NH_4)_2SO_4$	17 g
KH_2PO_4	1,0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5 mg
$MnSO_4 \cdot 8H_2O$	5 mg
$ZnSO_4$	5 mg
$CaCO_3$	30 g
Extrato de levedura	2 g
metionina	0,15 g
treonina	0,15 g

[Tabela 2]

	OD (562nm)	**Consumo de Glicose (g/L)**	***O*-Acetil homoserine (g/L)**

W3110	14,2	40	0
W3-BTA	8,4	36	0,9
WCJM	9,6	35	1,2

[091] O resultado revelou que o de tipo selvagem *W3110* não produziu *O*-acetil homoserina como um todo, a etapa que a cepa *W3-BTA* produziu 0,9 g/L de *O*-acetil homoserina e a cepa *WCJM*, que foi reforçada com a via de biossíntese, produziu 1,2 g/L de *O*-acetil homoserina.

Exemplo 1: Exclusão da atividade da citrato sintase

<1-1> Construção de um microrganismo com o gene da citrato sintase excluído em um microrganismo produtor da *O*-acetil-homoserina

[092] Citrato sintase (*GltA*) é a enzima na primeira etapa do ciclo do TCA, e começa com a reação entre o oxaloacetato e acetil-CoA. A inibição do crescimento por redução no ciclo do TCA é bem conhecida (MedEd Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet. 2001; 66 (3):. 333-6). No entanto, a fim de aumentar a quantidade de acetil-CoA utilizada como um substrato para a *O*-acetil homoserina, as cepas *W3-BTA* e *WCJM* onde a atividade da citrato sintase é excluída foram produzidas.

[093] Especificamente, o gene de citrato sintase em cepas *W3-BTA* e *WCJM* foi excluída através de PCR com base no vetor *pKD4* como um molde usando os iniciadores de SEQ ID Nºs: 56 e 57 como se segue: 30 ciclos de desnaturação a 94 ℃ durante 30 segundos, anelamento a 55 ℃ durante 30 segundos, e extensão a 72 ℃ durante 2 minutos. O produto de PCR resultante foi submetido a eletroforese em um gel de agarose 1,0%, e o tamanho do gene foi confirmado como sendo de 1,6 kb, e o seu ADN foi purificado. Os fragmentos de ADN recuperados foram eletroporados em cepas *W3-BTA* e *WCJM*, que já foram transformados com o vetor *pKD46*. Para a eletroporação, as cepas *W3-BTA* e *WCJM*, transformada com o vetor *pKD46*, foram cultivadas em meio LB contendo 100 μg/L de ampicilina e 5 mM de arabinose a 30 ℃ até DO_{600} = 0,6, e lavadas duas vezes com água destilada e uma vez com glicerol a 10% para ser usado. A eletroporação foi realizada a 2500 V. As cepas assim

recuperadas foram riscadas em placas de LB contendo 50 μg/L de canamicina, cultivadas a 37 ℃, e as cepas que mostram resistência foram selecionadas.

[094] As cepas selecionadas foram submetidas a PCR usando os iniciadores de SEQ ID Nºs: 58 e 59 sob as mesmas condições, a eletroforese em um gel de agarose a 1,0%, e o tamanho do gene foi observado como sendo 2,5 kb, confirmando assim que um cassete de exclusão foi inserido na porção do gene da citrato sintase no cromossomo. As cepas assim confirmadas foram transformadas novamente com o vetor *pCP20*, cultivadas em meio LB, e as cepas possuindo uma exclusão do gene de citrato sintase, cujo tamanho foi reduzido para 1,1 kb em um gel de agarose a 1,0%, foram construídas por PCR, e isso confirmou que os marcadores de canamicina foram removidas. As cepas assim construídas foram designadas como "*W3-BTA-AD*" e "*WCJM-AD*", respectivamente.

<1-2> Avaliação de um microrganismo com o gene da citrato sintase excluído em um microrganismo produtor de *O*-acetil homoserina

[095] Cepas *W3-BTA-AD* e *AD-WCJM* pode crescer em um meio LB, mas devido à exclusão do gene da citrato sintase, que não pode crescer em um meio contendo *O*-acetil homoserina. A fim de testar a quantidade de produção de *O*-acetil homoserina, em um frasco Erlenmeyer a cultura foi realizada sob uma condição (Tabela 3 - uma composição com adição de glutamato no meio) da adição de 3 g/L de glutamato na composição existente do meio de cultura.

[096] Especificamente, as cepas *W3-BTA-AD* e *AD-WCJM* foram inoculadas em meio LB e cultivadas a 33 ℃ overnight. Em seguida, uma única colônia desta foi inoculada em 3 mL de meio LB, cultivada a 33 ℃ durante 5 horas, diluída 200 vezes em um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL de um meio de produção de *O*-acetil homoserina (com adição de glutamato), cultivadas a 33 ℃ a uma velocidade de 200 rpm durante 30 horas, e a quantidade de *O*-acetil homoserina produzida foi examinada através de análise por HPLC. A quantidade de produção de *O*-acetil homoserina examinada é mostrada na Tabela 4 abaixo.

[097] [Tabela 3] Composição de um meio com glutamato adicionado ao meio basal

Composição	**Conc. (por litro)**
glicose	40 g
$(NH_4)_2SO_4$	17 g
KH_2PO_4	1,0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5 mg
$MnSO_4 \cdot 8H_2O$	5 mg
$ZnSO_4$	5 mg
$CaCO_3$	30 g
Extrato de levedura	2 g
metionina	0,15 g
treonina	0,15 g
glutamato	3 g

[Tabela 4] Produção de *O*-acetil homoserina via frasco de cultura

	OD (562 nm)	**Consumo de Glicose (g/L)**	***O*-acetil homoserina (g/L)**	**Glutamato (g/L)**
W3-BTA	9,9	38	0,9	3,2
W3-BTA-AD	6,1	34	1,4	2,3
WCJM	9,2	37	1,3	3,5
WCJM-AD	5,6	33	2,1	1,7

[098] O resultado da produção da *O*-acetil homoserina via frasco de cultura revelou que a cepa *W3-BTA* produziu 0,9 g/L de *O*-acetil homoserina, e *W3-BTA-AD* produziu 1,4 g/L de *O*-acetil homoserina, que é um aumento de 55,6%, embora tenha mostrado uma diminuição no seu consumo de glicose. A cepa *WCJM* produziu 1,3 g/L de *O*-acetil homoserina, enquanto a cepa *WCJM*-

AD produziu 2,1 g/L de *O*-acetil homoserina, confirmando assim que a capacidade de produção da *O*-acetil homoserina foi melhorada em 61,5% devido à exclusão do gene da citrato sintase.

Exemplo 2: A atenuação da atividade da proteína citrato sintase

<2-1> Tipos de modificações do gene da citrato sintase

[099] A cepa *WCJM-AD* construída no Exemplo <1-1> mostrou uma baixa taxa de cultura, e três tipos diferentes de variantes, que mostraram uma atividade atenuada e uma capacidade reduzida de ligação a acetil-CoA de acordo com as várias modificações da citrato sintase conhecida em numerosas referências (The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278, 35435-35443), foram selecionadas. A informação sobre os três tipos diferentes de variantes é mostrado na Tabela 5, que mostra os genes modificados em que o 145º aminoácido, tirosina (Y), foi substituído por alanina (A), e o 167º aminoácido lisina (K), foi substituído por alanina (A), e o 204º aminoácido treonina (T), foi substituída por alanina (A).

[100] [Tabela 5] Evolução sobre as variantes da citrato sintase (gltA)

	VALOR KM [mM]	
	AcetII-CoA	OAA
WT	0,12	0,026
Y145A	0,23	0,051
K167A	0,22	0,037
T204A	0,21	0,004

<2-2> Construção de um microrganismo com atividade dA proteína citrato sintase atenuada em um microrganismo produtor de *O*-acetil-homoserina

[101] Os inventores da presente invenção têm a intensão de aumentar a capacidade de produção através da introdução das variantes, nas quais a atividade da proteína citrato sintase foi atenuada, tal como explicado no Exemplo <2-1>, em um microrganismo produtor de *O*-acetil homoserina.

[102] A fim de introduzir os três tipos diferentes de variantes do gene da citrato sintase na cepa *WCJM-AD*, um cassete de modificação por substituição

foi desenvolvido como mostrado na FIG. 1. Cada variante foi sintetizada por substituição de um iniciador com um nucleotídeo, e cada um dos cassetes foi construído através de 3 produtos de PCR. Para a porção do gene da citrato sintase, a cepa *W3110* foi utilizada como um molde, e as reações de PCR produzindo alterações no 145º aminoácido foram realizadas usando os iniciadores da SEQ ID Nºs: 60 e 63 e SEQ ID Nºs: 62 e 61, respectivamente e os produtos de PCR obtidos com um tamanho de 514 pb e 1112 pb.

[103] Do mesmo modo, a alteração no 167º aminoácido produziu produtos de PCR com um tamanho de 580 pb e 1046 pb, usando os iniciadores da SEQ ID Nºs: 60 e 65, e os iniciadores da SEQ ID Nºs: 64 e 61, e a modificação no 204º aminoácido produziu produtos de PCR com um tamanho de 688 pb e 936 pb, usando os iniciadores da SEQ ID Nºs: 60 e 67 e SEQ ID Nºs: 66 e 61. Para a parte comum da canamicina, foram realizadas reações de PCR com base no vetor *pKD4* como um modelo, usando os iniciadores da SEQ ID Nºs: 68 e 69. Em particular, para a inserção na posição do gene da citrato sintase, o cassete foi construído de modo a incluir a sequência de polinucleotídeos a jusante do gene da citrato sintase na SEQ ID Nº: 69, e um produto de PCR com um tamanho de 1571 pb foi obtido por meio de eletroforese. Uma reação de PCR de costura foi realizada com base no fragmento de ADN da canamicina, que é a parte comum a cada um dos dois fragmentos de ADN coletados de acordo com as modificações, respectivamente, usando os iniciadores da SEQ ID Nº: 60 e 69, como se segue: 30 ciclos de desnaturação a 94 ℃ durante 30 segundos, anelamento a 55 ℃ durante 30 segundos, e extensão a 72 ℃ durante 4 minutos. Cada um dos produtos finais de PCR foi confirmado em um gel de agarose 1,0%, e os fragmentos de DNA com um tamanho de 3115 pb para os três tipos diferentes de cassetes de modificações do gene citrato sintase. Os fragmentos de DNA coletados foram eletroporados na cepa *WCJM-AD*, que já foi transformada com o vetor *pKD46*. Para a eletroporação, a cepa *W3110* transformada com o *pKD46* foi cultivada em meio LB contendo 100 μg/L de ampicilina e 5 mM de arabinose a 30 ℃ até DO_{600} = 0,6 e usada após a

lavagem duas vezes com água estéril destilada e uma vez com 10% de glicerol. A eletroporação foi realizada a 2500 V. A cepa recuperada foi riscada sobre uma placa de LB contendo 25 μg/L de canamicina, cultivadas a 37 ℃ overnight, e a cepa foi selecionada mostrando resistência. A cepa selecionada foi submetida a uma reação de PCR sob as mesmas condições com base na cepa como um molde usando os mesmos iniciadores da SEQ ID Nºs: 58 e 59, e a exclusão do gene da *metB* foi confirmada observando o tamanho do gene de 3,7 kb em um gel de agarose 1,0%, confirmando assim que um cassete de modificação, no qual o aminoácido do gene da citrato sintase foi substituído, foi inserido. A cepa assim confirmada foi cultivada em meio LB após transformação novamente com o vetor *pCP20*, e as três cepas variantes em relação à atividade da citrato sintase, na qual o tamanho do gene foi reduzido para 2,5 kb em um gel de agarose a 1,0% através de PCR efetuada sob a mesmas condições, foram construídas e a remoção do marcador de canamicina foi confirmada. As cepas assim construídas foram designadas como "*WCJM-A145*", "*WCJM-A167*", e "*WCJM-A204*", e a informação da sequência do gene da citrato sintase introduzida com modificações são mostradas nas SEQ ID Nºs: 1 a 3 (sequências de aminoácidos) e SEQ ID Nºs: 5 a 7 (sequências de nucleotídeos), respectivamente.

<2-3> Avaliação de micro-organismos com atividade da citrato sintase atenuada em micro-organismos produtores de *O*-acetil homoserina

[104] Uma cultura em frasco Erlenmeyer foi realizada a fim de examinar a quantidade de produção da *O*-acetil homoserina em três cepas diferentes de *WCJM-A145, WCJM-A167,* e *WCJM-A204*, em que a atividade do gene da citrato sintase foi atenuada. Quatro tipos de cepas, por exemplo, cepas *WCJM-A145, A167-WCJM*, e *WCJM-A204*, incluindo a cepa *WCJM*, foram inoculadas em meio LB, e cultivadas a 33 ℃ overnight. Em seguida, uma única colônia destas foi inoculada em 3 mL de meio LB, cultivadas a 33 ℃ durante 5 horas, diluída 200 vezes em um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL de um meio de produção de *O*-acetil homoserina, cultivada a 33 ℃ a uma velocidade

de 200 rpm durante 30 horas, e a quantidade de produção de *O*-acetil homoserina foi examinada através de análise por HPLC. Os resultados são mostrados na Tabela 6 abaixo.

[Tabela 6] Produção de *O*-acetil homoserina via cultura em frasco.

	OD (562 nm)	**Consumo de Glicose (g/L)**	***O*-acetil homoserina (g/L)**	**Glutamato (g/L)**
WCJM	8,9	35	1,3	1,3
WCJM-A145	7,4	35	2,0	0
WCJM-A167	6,3	29	1,9	0
WCJM-A204	9,1	40	1,1	1,8

[105] O resultado da produção da *O*-acetil homoserina via frasco de cultura revelou que a cepa *WCJM* produziu 1,3 g/L de *O*-acetil homoserina, e as duas cepas, *WCJM-A145* e *WCJM-A167*, produziram 2,0 g/L e 1,9 g/L de *O*-acetil homoserina, respectivamente, enquanto que a quantidade do consumo de glicose destas diminuiu com a diminuição da sua absorvância (OD). Considerando a diminuição específica do glutamato de 1,3 g/L a 0 g/L, foi confirmado que o resultado é devido à diminuição do fluxo do ciclo da TCA causado pela atenuação na atividade da citrato sintase. No entanto, a cepa *WCJM-A204* apresenta um aumento no glutamato, enquanto que mostra uma diminuição na quantidade de produção da *O*-acetil homoserina a 0,2 g/L, confirmando, assim, a modificação é um com uma com a atividade aumentada.

Exemplo 3: A atenuação da expressão da proteína citrato sintase

<3-1> Construção do vetor de expressão do gene antissenso RNA (asRNA) da citrato sintase

[106] Os presentes inventores fizeram um esforço para aplicar a tecnologia de um ARN antissentido (asRNA), a fim de atenuar a expressão da proteína citrato sintase. A tecnologia de ARN antissentido é um método para reduzir a expressão da proteína pela neutralização da ligação entre o ARNm da citrato sintase ao ribossoma, por meio da sobre expressão da porção de

ligação complementar com o ARNm da citrato sintase do gene alvo. Este método tem a vantagem na medida em que pode regular o nível de inibição pelo controle da força de ligação com o ARNm do gene de citrato sintase, e este método também é útil para a construção de um microrganismo recombinante, porque este método pode efetivamente construir e reduzir a expressão do gene através do controle da expressão do gene por ARN antissentido, não necessitando o processo convencional de exclusão do gene.

[107] A construção do vetor foi realizada se referindo a uma referência (Methods Mol Biol 2012; 815: 307-19 doi: 10.1007/978-1-61779-424-7_23.), e pela sobre-expressão da região do ARN antissentido do gene do sintase foi introduzida no plasmídeo *pBAD24* susceptível de indução. O mapa do vetor *pBAD24*-citrato sintase asRNA é mostrado na FIG. 2. A região em que o ARN antissentido do gene de citrato sintase foi expresso tem um tamanho de 100 pb incluindo a região de 52 pb da região do promotor e a região de 48 pb do códon de iniciação da citrato sintase, e uma estrutura de 38 pb emparelhada terminal (PT), o que reduz a instabilidade do ARN antissentido (asRNA), está ligada a ambas as regiões flanqueadoras. A região de ARN antissentido do gene de citrato sintase foi obtida utilizando os iniciadores da SEQ ID Nºs: 70 e 71, e os sítios de restrição *Nco*I e *Hind*III foram incluídos para serem clonados em um vetor.

[108] O produto de PCR assim obtido tinha um tamanho de 194 pb, e o produto de PCR foi clonado no plasmídeo *pBAD24* depois tratados com *EcoR*V e *Hind*III, respectivamente. O plasmídeo assim clonado foi usado para transformar a *E. coli* DH5α, e a *E. coli* DH5α transformada foi selecionada de entre as placas de LB contendo 100 μg/mL de ampicilina, e o plasmídeo foi daí obtido. O plasmídeo assim obtido foi designado como "*pBAD24-gltA* asRNA".

<3-2> Introdução de um vetor de expressão de ARN antissentido do gene da citrato sintase em um microrganismo produtor da *O*-acetil homoserina e a sua avaliação

[109] O *pBAD24-gltA*-asRNA, um vetor de ARN antissentido do gene de

expressão da citrato sintase, foi transformado na cepa *WCJM*, que é um microrganismo produtor da *O*-acetil homoserina. Aqui, a cepa transformada foi designada como "*WCJM/A-asRNA*". Em particular, foi tentado controlar a quantidade de expressão da proteína citrato sintase através do controle da quantidade do ARN antissentido da citrato sintase de expressão, e aqui, a quantidade de expressão da ARN antissentido pode ser controlada de acordo com a concentração de arabinose.

[110] Como resultado, foi confirmado que a quantidade de produção da *O*-acetil homoserina aumenta quando a atividade da citrato sintase foi atenuada tal como no Exemplo 2.

[111] Além disso, em uma cultura em frasco Erlenmeyer foi realizada para examinar se a quantidade de produção da *O*-acetil-homoserina aumenta à medida que a quantidade de expressão da citrato da sintase diminui.

[112] Especificamente, as cepas *WCJM* e *WCJM/A*-asRNA foram inoculadas em meio LB, e cultivadas a 33 ℃ overnight. Em seguida, uma única colônia desta foi inoculada em 3 mL de meio LB, cultivadas a 33 ℃ durante 5 horas, diluída 200 vezes em um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL de um meio de produção de *O*-acetil homoserina. Em particular, a fim de controlar a quantidade de expressão do ARN antissentido da citrato sintase, arabinose foi adicionada em concentrações de 0 mM, 2 mM e 5 mM, e cultivadas a 33 ℃ a uma velocidade de 200 rpm durante 15 horas e 30 horas. A quantidade de produção de *O*-acetil-homoserina foi examinada através da análise por HPLC, e os resultados são mostrados nas Tabelas 7 e 8 abaixo.

[Tabela 7]

15 horas	**Arabinose**	**OD (562nm)**	**Consumo de Glicose (g/L)**	***O*-acetil homoserina (g/L)**
WCJM	0 mM	4,2	9,7	0,5
WCJM	2 mM	4,5	8,9	0,6
WCJM	5 mM	4,7	8,9	0,5

WCJM/ A-asRNA	0 mM	4,5	10,1	0,6
WCJM/ A-asRNA	2 mM	4,2	8,8	0,6
WCJM/ A-asRNA	5 mM	3,4	6,9	0,5

[Tabela 8]

30 Horas	**Arabinose**	**OD (562nm)**	**Consumo de Glicose (g/L)**	***O*-acetil homoserina (g/L)**
WCJM	0 mM	8,9	32	1,4
WCJM	2 mM	9,1	34	1,3
WCJM	5 mM	8,9	33	1,3
WCJM/ A-asRNA	0 mM	9,2	33	1,3
WCJM/ A-asRNA	2 mM	8,8	32	1,6
WCJM/ A-asRNA	5 mM	7,1	29	1,7

[113] Como resultado, foi confirmado que, quando cultivadas durante 15 horas, a cepa *WCJM/A*-asRNA mostrou uma diminuição na OD de cerca de 1 de acordo com a concentração de arabinose, enquanto que a concentração de *O*-acetil homoserina foi semelhante. No entanto, quando cultivadas durante 30 horas, a cepa *WCJM*, que é uma cepa controle, mostrou a mesma OD e concentração de *O*-acetil homoserina mesmo quando a concentração da arabinose aumentou, enquanto que a cepa *WCJM/A*-asRNA, que é uma cepa introduzida com o vetor de expressão do ARN antissentido da citrato sintase, mostrou uma diferença acentuada como a concentração da arabinose aumentada. A OD foi de 9,2, quando a concentração de arabinose foi 0 mM, ao passo que a OD foi de 7,1 a 5 mM de concentração de arabinose, um

decréscimo de 5,1, e a quantidade de *O*-acetil homoserina aumentou de 30,8%, embora o consumo de glicose foi pequeno. A partir destes resultados, foi confirmado que não só a atenuação na atividade da citrato sintase, mas também na atenuação da expressão da proteína apresentam os mesmos resultados.

Exemplo 4: A atenuação e a inativação da atividade da citrato sintase em um microrganismo com alto rendimento de produção de *O*-acetil homoserina

<4-1> Construção de um microrganismo com alto rendimento de produção *O*-acetil homoserina com atividade da citrato sintase inativada e respectiva avaliação

[114] Publicação Internacional N° WO 2012/087039 descreve em detalhes um método para a construção de um microrganismo produtor de *O*-acetil homoserina a partir de um microrganismo produtor de treonina derivada de uma cepa *W3110* tipo selvagem, devido a mutação NTG. Em particular, a cepa construída produzindo *O*-acetil homoserina com elevado rendimento foi depositada no Centro de Cultura Coreano de Micro-organismos (KCCM), sob o nº de *Adesão KCCM11146P*.

[115] A cepa *KCCM11146P* pode consumir 40 g/L de glicose durante uma cultura em frasco e produz cerca de 15 g/L a 16 g/L de *O*-acetil homoserina e é assim considerada como tendo uma capacidade elevada de produção de *O*-acetil homoserina. Consequentemente, a fim de verificar se a cepa produz um maior rendimento de *O*-acetil homoserina quando a atividade da citrato sintase é excluída, o mesmo foi aplicado para a cepa *KCCM11146P*. O método de construção foi o mesmo do Exemplo <1-1>, e por este método, a cepa *KCCM11146P*, em que a atividade de citrato sintase foi excluída, foi construída e designado como "*KCCM11146P-AD*".

[116] A quantidade de produção de *O*-acetil homoserina pela cepa *KCCM11146P*, em que a atividade da citrato sintase foi excluída, foi testada através de um uma cultura em frasco Erlenmeyer. A cepa *KCCM11146P* ou

KCCM11146P-AD foi inoculada em um meio LB e cultivada a 33 ℃ overnight. Em seguida, uma única colônia desta foi inoculada em 3 mL de meio LB, cultivada a 33 ℃ durante 5 horas, diluída 200 vezes em um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL de um meio de produção de *O*-acetil homoserina (com glutamato adicionado), e cultivado a 33 ℃ a uma velocidade de 200 rpm durante 30 horas. A quantidade de produção de *O*-acetil homoserina foi examinada através de análise por HPLC, e os resultados estão apresentados na Tabela 9 abaixo.

[Tabela 9] Produção de *O*-acetil homoserina via frasco de cultura

	OD (562nm)	**Consumo de Glicose (g/L)**	***O*-acetil homoserina (g/L)**	**Glutamato (g/L)**
KCCM11146P	18,3	60	14,2	4,6
KCCM11146P-AD	14,6	60	16,7	1,8

[117] O resultado da produção de *O*-acetil homoserina via frasco de cultura revelou que a cepa *KCCM11146P* produziu 14,2 g/L de *O*-acetil homoserina, e a cepa *KCCM11146P*-AD produziu 16,7 g/L de *O*-acetil homoserina, um aumento de 17,6%, embora mostrem uma diminuição na absorvância (OD).

<4-2> Construção de um microrganismo com alto rendimento de produção *O*-acetil homoserina com atividade da citrato sintase atenuada e respectiva avaliação

[118] De modo a examinar se a cepa *KCCM11146P*, que é uma cepa com alto rendimento de produção de *O*-acetil homoserina, produz um maior rendimento de *O*-acetil homoserina mesmo quando a atividade da citrato sintase é atenuada, a alteração no 145º aminoácido (de tirosina (Y) para alanina (A)) e a modificação no 167º aminoácido (de lisina (K) para alanina (A)), mostrou as maiores capacidades de produção da *O*-acetil homoserina entre os três tipos de variantes atenuados da atividades da proteína explicada

no exemplo <2-1>, foram aplicadas à cepa *KCCM11146P*.

[119] O método de construção foi o mesmo que no Exemplo <2-2>, e pelo método, duas cepas *KCCM11146P*, em que a atividade da citrato sintase foi atenuada, foram construídas e designadas respectivamente como "*KCCM11146P*-A145" e "*KCCM11146P*-A167".

[120] A quantidade de produção da *O*-acetil homoserina pelas duas linhagens de *KCCM11146P*-A145 e *KCCM11146P*-A167, onde a atividade da citrato sintase foi atenuada, foi testada por uma cultura em frasco Erlenmeyer. As três cepas, isto é, cepas *KCCM11146P*-A145 e *KCCM11146P*-A167 e a cepa *KCCM11146P*, foram inoculados em meio LB, e cultivadas a 33 ℃ overnight. Em seguida, uma única colônia destas foi inoculada em 3 mL de meio LB, cultivadas a 33 ℃ durante 5 horas, diluída 200 vezes em um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL de um meio de produção de *O*-acetil homoserina, e cultivados a 33 ℃ a uma velocidade de 200 rpm durante 30 horas. A quantidade de produção de *O*-acetil homoserina foi examinada através de análise por HPLC, e os resultados são apresentados na Tabela 10 abaixo.

[Tabela 10] A produção de *O*-acetil homoserina via frasco de cultura.

	OD (562nm)	**Consumo de Glicose (g/L)**	***O*-acetil homoserina (g/L)**	**Glutamato (g/L)**
KCCM11146P	16,3	60	15,0	1,6
KCCM11146P-A145	14,6	60	17,5	0
KCCM11146P-A167	14,2	60	17,3	0

[121] O resultado da produção de *O*-acetil homoserina através de cultura em frascos revelou que a cepa *KCCM11146P* produziu 15,0 g/L de *O*-acetil homoserina, e as duas cepas *KCCM11146P-A145* e *KCCM11146P-A167* mostraram resultados semelhantes aos do Exemplo <2-3>. As duas cepas

respectivamente produziram 17,5 g/L e 17,3 g/L de *O*-acetil homoserina, um aumento de cerca de 16,7%, embora ambos mostraram uma diminuição na absorvância (OD).

[122] A cepa com alto rendimento de produção de *O*-acetil homoserina também mostrou um decréscimo no glutamato de 1,6 g/L a 0 g/L, de acordo com a diminuição no fluxo do ciclo do TCA causado pela atenuação na atividade da citrato sintase.

[123] Estes resultados demonstram que a atividade da citrato sintase permite a produção de *O*-acetil homoserina, pela aplicação da modificação atenuada. Além disso, eles também indicam que quando uma reação de conversão é realizada com base na *O*-acetil homoserina, que foi produzida de acordo com a Publicação Internacional Nº. WO2008/013432, como um modelo, e usando uma enzima de conversão, a qual tem adicionalmente as atividades de gama cistationina sintase, *O*-succinil homoserina sulfidrilase, e *O*-acetil homoserina sulfidrilase, é possível sintetizar, simultaneamente, L-metionina e acetato.

[124] Os presentes inventores confirmaram que a cepa *KCCM11146P*, a variante em que o 167º aminoácido da citrato sintase, tem uma melhor produção de *O*-acetil homoserina, cepa *KCCM11146P*-A167 designada como "*CA05-4007*", e depositada no Centro Coreano de Cultura de Micro-organismos (KCCM), uma autoridade internacional de depósito sob o Tratado de Budapeste, em 22 de novembro de 2013 (Nº de Adesão: *KCCM 11483P*).

[125] A partir do acima exposto, um perito na arte à qual pertence a presente invenção será capaz de compreender que a presente invenção pode ser concretizada em outras formas específicas sem modificar os conceitos técnicos ou características essenciais da presente invenção. A este respeito, as concretizações exemplares aqui descritas são apenas para fins ilustrativos e não devem ser interpretadas como limitando o âmbito da presente invenção. Pelo contrário, a presente invenção se destina a abranger não só as concretizações exemplificativas, mas também várias alternativas, modificações,

equivalentes e outras concretizações que podem ser incluídas dentro do espírito e âmbito da presente invenção tal como definido pelas reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Microrganismo modificado da *Escherichia sp*. produtor de *O*-acetil homoserina, com maior capacidade de produção de *O-acetil* homoserina em comparação com o microrganismo progenitor que produz *O-acetil* homoserina, **caracterizado por** a atividade endógena da citrato sintase, tendo uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 4, ser modificada para ser atenuada ou inativada, em comparação com o microrganismo progenitor que produz *O-acetil* homoserina.

2. Microrganismo modificado da *Escherichia sp*. de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** o microrganismo com a atividade endógena da citrato sintase modificada para ser atenuada possuir uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 2.

3. Microrganismo modificado da *Escherichia sp*. de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a atividade da gama cistationina sintase, homoserina quinase, ou ambas é ainda modificada para ser ainda atenuada ou inativada em comparação com as suas atividades endógenas.

4. Microrganismo modificado da *Escherichia sp*. de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a atividade da homoserina *O*-acetil transferase é ainda modificada para ser ainda introduzida ou aumentada, ou a homoserina *O*-succinil transferase endógena ser ainda modificada para ter a atividade de homoserina *O*-acetil transferase.

5. Microrganismo modificado da *Escherichia sp*. de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a atividade de pelo menos uma proteína selecionada a partir do grupo consistindo de fosfoenol piruvato carboxilase, aspartato amino transferase, e aspartato semialdeído desidrogenase é ainda modificada para ser ainda introduzida ou aumentada.

6. Microrganismo modificado da *Escherichia sp*. de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** o microrganismo ser *Escherichia coli*.

7. Método para a produção de *O*-acetil homoserina, **caracterizado por** compreender:

(a) cultivar o microrganismo modificado de qualquer das reivindicações 1 a 6; e

(b) recuperar a *O*-acetil homoserina produzida durante o cultivo do micro-organismo.

FIG. 1

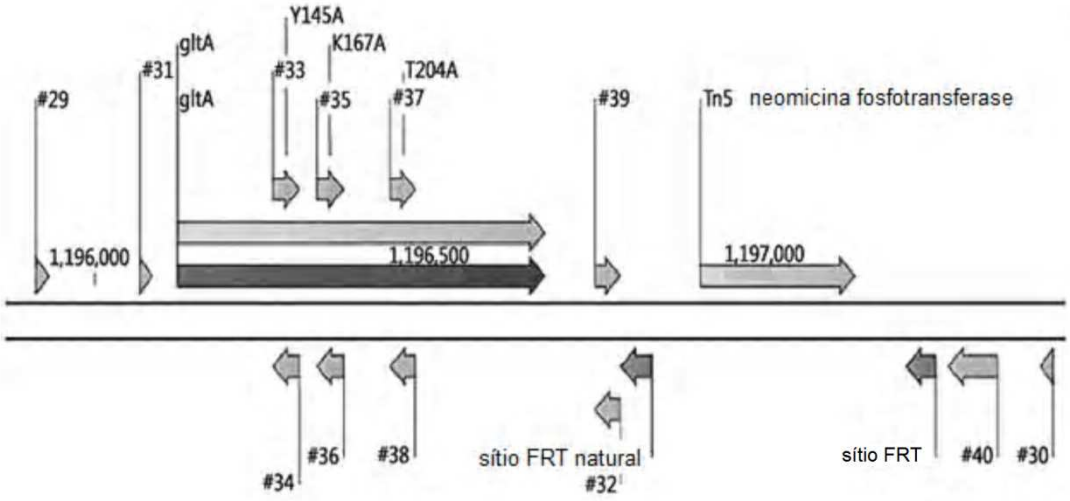

Y145A
gltA
K167A
#31
#33
T204A
#29
gltA
#35
#37
#39
Tn5 neomicina fosfotransferase
1,196,000
1,196,500
1,197,000
#34
#36
#38
sítio FRT natural
#32
sítio FRT
#40
#30

FIG. 2

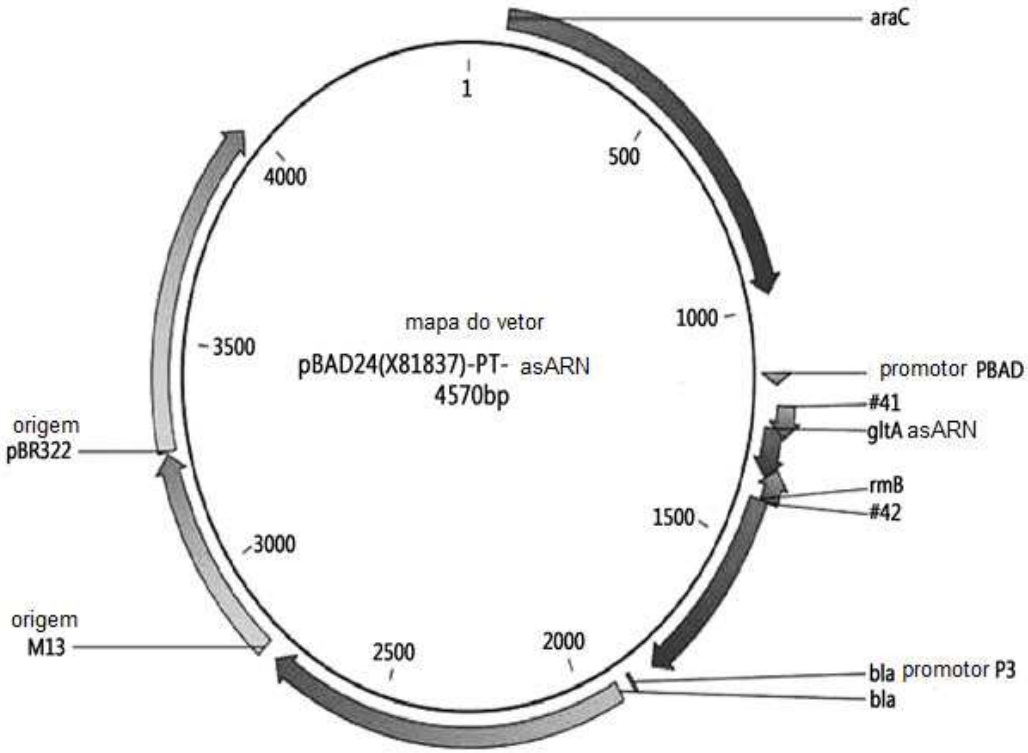


FIGURA 2