

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

(21) **PI0620551-8 A2**

(22) Data de Depósito: 01/11/2006
(43) Data da Publicação: 16/11/2011
(RPI 2132)



(51) *Int.Cl.:*

C12N 1/00
C12N 1/16
C12P 7/46

(54) **Título:** LEVEDURA RECOMBINANTE E MÉTODO PARA PRODUZIR ÁCIDO MÁLICO

(30) **Prioridade Unionista:** 21/11/2005 US 60/738,473

(73) **Titular(es):** Tate & Lyle Ingredients Americas, Inc

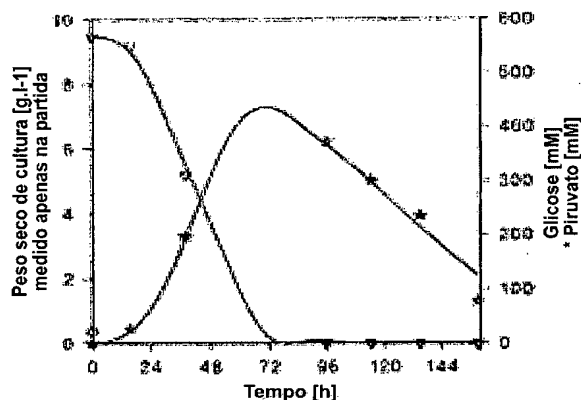
(72) **Inventor(es):** Aaron Adriaan Winkler, Abraham Frederik de Hulster, Jacobus Thomas Pronk, Johannes Pieter Van Dijken

(74) **Procurador(es):** Antonio Mauricio Pedras Arnaud

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2006042754 de 01/11/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/061590de 31/05/2007

(57) **Resumo:** LEVEDURA RECOMBINANTE E MÉTODO PARA PRODUZIR ÁCIDO MÁLICO. Divulgamos uma levedura recombinante onde a levedura é a enzima piruvato decarboxilase (PDC0) de atividade negativa (PDC-negativa) e é funcionalmente transformada com uma região codificadora codificando ou uma enzima piruvato carboxilase (PYC) onde a PYC seja ativa no citossol ou uma fosfoenolpiruvato carboxilase (PEP) onde a PEP carboxilase seja insensível à inibição por malato, aspartato, e oxaloacetato, uma região codificadora codificando uma enzima malato desidrogenase (MDH) onde a MDH seja ativa no citossol e não seja inativada na presença de glicose; e uma região codificadora codificando uma proteína transportadora de ácido málico (MAE). Também divulgamos um método para produzir ácido málico cultivando tal levedura em um meio compreendendo uma fonte de carbono e uma fonte de dióxido de carbono e isolando o ácido málico do meio.





PI0620551-8

"LEVEDURA RECOMBINANTE E MÉTODO PARA PRODUZIR ÁCIDO MÁLICO".

Antecedentes da invenção

5 A presente invenção refere-se geralmente ao uso industrial de microorganismos. Mais particularmente, ela se refere à produção de ácido málico a partir de ácido succínico por levedura.

10 O uso de microorganismos, tais como leveduras, para realizar processos industriais tem ocorrido incidentalmente durante milhares de anos e tem sido submetido a questionamento técnica há décadas. Leveduras, tais como a *S. cerevisiae* têm sido usadas para produzir diferentes pequenas moléculas, incluindo ácidos orgânicos.

15 Entretanto, um ácido orgânico que tem sido difícil de produzir a partir de leveduras, particularmente da *S. cerevisiae*, é o ácido málico. O ácido málico, $C_4H_6O_5$, é um ácido orgânico dicarboxílico que confere um sabor acídulo a muitos alimentos ácidos ou acídulos, tais como
20 maçãs verdes e vinhos. O ácido málico é útil para a indústria de processamento de alimentos como uma fonte de acidulidade para uso em diversos alimentos. Presentemente, não temos ciência de nenhuma produção de ácido málico em grande escala a partir de leveduras.

25 Sumário da invenção

Em uma concretização, a presente invenção refere-se a uma levedura recombinante, onde a levedura é a enzima piruvato decarboxilase (PDC0) de atividade negativa (PDC-negativa) e é funcionalmente transformada com uma região
30 codificadora, codificando ou uma enzima piruvato carboxilase (PYC) onde a PYC seja ativa no citossol ou uma fosfoenolpiruvato carboxilase (PEP) onde a carboxilase PEP seja insensível à inibição por malato, aspartato, e oxaloacetato, uma região codificadora
35 codificando uma enzima malato desidrogenase (MDH) onde a MDH seja ativa no citossol e não seja inativada na presença de glicose, e uma região codificadora

codificando uma proteína transportadora de ácido málico (MAE).

Em uma outra concretização, a presente invenção refere-se a um método para produzir ácido málico ou ácido succínico incluindo cultivar uma levedura recombinante onde a 5 levedura é a enzima piruvato decarboxilase (PDC) de atividade negativa (PDC-negativa) e é funcionalmente transformada com uma região codificadora codificando ou uma enzima piruvato carboxilase (PYC) onde a PYC seja 10 ativa no citossol ou uma fosfoenolpiruvato carboxilase (PEP) onde a carboxilase PEP seja insensível à inibição por malato, aspartato, e oxaloacetato, uma região codificadora codificando uma enzima malato desidrogenase (MDH) onde a MDH seja ativa no citossol e não seja 15 inativada na presença de glicose, e uma região codificadora codificando uma proteína transportadora de ácido málico (MAE), em um meio compreendendo uma fonte de carbono e uma fonte de dióxido de carbono, e isolar ácido málico ou ácido succínico do meio.

20 Breve descrição dos desenhos

Os seguintes desenhos formam parte do presente descritivo, e estão incluídos para adicionalmente demonstrar certos aspectos da presente invenção. A invenção poderá ser melhor entendida com referência a um 25 ou mais destes desenhos, em combinação com a descrição detalhada de concretizações específicas apresentadas aqui.

A figura 1 mostra concentrações de glicose e piruvato como uma função do tempo de cultura conforme descrito no 30 exemplo 1.

A figura 2 mostra concentrações de maleato, glicerol e succinato como uma função do tempo de cultura conforme descrito no exemplo 1.

A figura 3 é um mapa do plasmídeo p426GPDMDH3, conforme 35 descrito no exemplo 1.

A figura 4 é um mapa do plasmídeo pRS2, conforme descrito no exemplo 1.

A figura 5 é um mapa do plasmídeo pRS2ΔMDH3, conforme descrito no exemplo 1.

A figura 6 é um mapa do plasmídeo YEplac112SpMAE1, conforme descrito no exemplo 1.

5 A figura 7 mostra a biomassa de partida, o consumo de glicose, e a produção de piruvato na batelada A, exemplo 2.

A figura 8 mostra a produção de malato, glicerol e succinato na batelada A, exemplo 2.

10 A figura 9 mostra a biomassa de partida, o consumo de glicose, e a produção de piruvato na batelada B, exemplo 2.

A figura 10 mostra a produção de malato, glicerol e succinato na batelada B, exemplo 2.

15 A figura 11 mostra a biomassa de partida, o consumo de glicose, e a produção de piruvato na batelada C, exemplo 2.

A figura 12 mostra a produção de malato, glicerol e succinato na batelada C, exemplo 2.

20 Descrição de concretizações ilustrativas

Em uma concretização, a presente invenção refere-se a uma levedura recombinante, onde a levedura é a enzima piruvato decarboxilase (PDC) de atividade negativa (PDC-negativa) e é funcionalmente transformada com uma região codificadora codificando ou uma enzima piruvato carboxilase (PYC) onde a PYC seja ativa no citossol ou uma fosfoenolpiruvato carboxilase (PEP) onde a carboxilase PEP seja insensível à inibição por malato, aspartato, e oxaloacetato, uma região codificadora codificando uma enzima malato desidrogenase (MDH) onde a MDH seja ativa no citossol e não seja inativada na presença de glicose, e uma região codificadora codificando uma proteína transportadora de ácido málico (MAE).

35 Qualquer levedura conhecida na técnica para uso e processos industriais poderá ser usada no método como uma questão de experimentação rotineira por aquele entendido

no assunto tendo o benefício do presente descritivo. A levedura a ser transformada poderá ser selecionada de qualquer gênero e espécie de levedura. Leveduras são descritas por N. J. W. Kreger-van Rij, "The Yeasts", Vol. 1 de Biology of Yeasts, Cap. 2, A H. Rose e J. S. Harrison, Ee., Academic Press, Londres, 1987. Em uma concretização, o gênero de levedura poderá ser *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Debaromyces*, *Nadsonia*, *Lipomyces*, *Torulopsis*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Trigonopsis*, *Brettanomyces*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Aureobasidium*, *Phaffia*, *Rhodotorula*, *Yarrowia*, ou *Schwanniomyces*, dentre outras. Em uma concretização adicional, a levedura poderá ser *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, ou *Pichia* spp. Em ainda uma outra concretização, a levedura poderá ser *Saccharomyces cerevisiae*. A *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura comumente usada em processos industriais, mas a invenção não está limitada a esta.

Uma levedura "recombinante" é uma levedura que contenha uma seqüência de ácido nucléico não naturalmente ocorrente na levedura ou uma cópia ou copias original(is) de uma seqüência de ácido nucléico endógena, onde a seqüência do ácido nucléico é introduzida na levedura ou numa célula ancestral desta por ação humana. As técnicas de DNA recombinantes são bem conhecidas, tais como de Sambrook et al., *Molecular Genetics: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, que provê informações adicionais com relação a diversas técnicas conhecidas na arte e discutidas aqui. Nesta concretização, uma região codificadora do gene homólogo ou heterólogo é isolada de um organismo, que possua o gene. O organismo poderá ser uma bactéria, um procariote, um eucariote, um microorganismo, um fungo, uma planta, um animal.

O material genético compreendendo a região codificadora poderá ser extraído de células do organismo por qualquer

técnica conhecida. Em seguida, a região codificadora poderá ser isolada por qualquer técnica apropriada. Em uma técnica conhecida, a região codificadora poderá ser isolada primeiramente preparando uma biblioteca de DNA genômica ou uma biblioteca de cDNA genômica e, em segundo lugar, identificando a região na biblioteca genômica de DNA ou de cDNA, tal como sondando a biblioteca com uma sonda de nucleotídeo rotulada selecionada para ser ou presumida ser pelo menos parcialmente homóloga com a região codificadora, determinando se a expressão da região codificadora confere um fenótipo detectável a um microorganismo de biblioteca compreendendo a região codificadora, ou amplificando a desejada sequência por PCR. Outras técnicas conhecidas para isolar a região codificadora também poderão ser usadas.

"PDC-negativa" é usado aqui para descrever uma levedura que tenha uma atividade de piruvato decarboxilase de menos que 0,005 micromol/min mg de proteína⁻¹ quando usando os métodos anteriormente descritos por van Maris, A.J. A, M. Ah. Luttik, A. A. Winkler, J. P. van Dijken, e J. T. Pronk, 20034. Uma tal levedura poderá ser referida como não tendo "nenhuma atividade de PDC". A Superprodução de Treonina Aldolase Engana o Papel Biossintético da Piruvato decarboxilase em *Saccharomyces cerevisiae* Cultivado em Glicose, Appl. Environ. Microbiol. 69:2094-2099. Uma tal levedura poderá ser referida aqui como não tendo "nenhuma atividade de PDC". Uma levedura que seja PDC-negativa poderá ser isolada ou trabalhada por qualquer técnica apropriada. Uma população de partida grande de leveduras geneticamente diversas poderá conter mutantes naturais que sejam PDC-negativos. Uma população de partida poderá ser submetida a mutagênese ou a seleção baseada em quemostáticos. Uma cepa de levedura tipicamente PDC-positiva compreende (A) pelo menos um gene estrutural de PDC que seja capaz de ser expressado na cepa da levedura; (B) pelo menos um gene regulador de PDC que seja capaz de ser expressado na

cepa da levedura; (C) um promotor do gene estrutural de PDC; e (D) um promotor do gene regulador de PDC. Em uma levedura PDC-negativa, uma ou mais dentre (A)-(D) poderá ser (i) mutada, (ii) desmontada, ou (iii) deletada. A
 5 mutação, desmontagem ou deleção de qualquer uma dentre (A)-(D) poderá, em certas concretizações, contribuir para uma falta de atividade de piruvato decarboxilase.

Em uma concretização, a levedura PDC-negativa é *S. cerevisiae* cepa TAM de levedura ("Mata *pdcl(-6,-2)::loxP*
 10 *pdcs(-6,-2)::loxP pdc6(-6,-2)::loxP ura3-52*" não tendo nenhuma atividade de piruvato decarboxilase detectável, fonte de C₂ independente, tolerante a glicose.

A piruvato carboxilase (PYC) poderá ser qualquer enzima capaz de catalisar a conversão de piruvato a oxaloacetato
 15 (EC 6.4.1.1) onde a PYC seja ativa no citossol. Uma enzima não necessita ser identificada na literatura como uma piruvato carboxilase na época do depósito do presente pedido de patente para ser enquadrada na definição de uma PYC. Uma PYC de qualquer organismo fonte poderá ser usada
 20 e a PYC poderá ser do tipo selvagem ou modificada a partir do tipo selvagem. A PYC poderá ser uma piruvato carboxilase de *S. cerevisiae*. Em uma concretização, a PYC poderá ter pelo menos 75% de identidade à sequência de aminoácido dada em SEQ ID NO:1. Em uma concretização, a
 25 PYC terá pelo menos 80% de identidade à sequência de aminoácido dada em SEQ ID NO:1. Em uma concretização, a PYC terá pelo menos 85% de identidade à sequência de aminoácido dada em SEQ ID NO:1. Em uma concretização, a PYC terá pelo menos 90% de identidade à sequência de aminoácido dada em SEQ ID NO:1. Em uma concretização, a
 30 PYC terá pelo menos 95% de identidade à sequência de aminoácido dada em SEQ ID NO:1. Em uma outra concretização, a PYC terá pelo menos 96% de identidade à sequência de aminoácido dada em SEQ ID NO:1. Em uma
 35 concretização adicional, a PYC terá pelo menos 97% de identidade à sequência de aminoácido dada em SEQ ID NO:1. Em ainda uma outra concretização, a PYC terá pelo menos

98% de identidade à sequência de aminoácido dada em SEQ ID NO:1. Em ainda uma outra concretização, a PYC terá pelo menos 99% de identidade à sequência de aminoácido dada em SEQ ID NO:1. Em uma concretização, a PYC terá a

5 sequência de aminoácido dada em SEQ ID NO:1.

A identidade poderá ser determinada por um alinhamento de sequências realizado usando o programa ClustalW e seus valores de default, a saber: Gap Open Penalty de DNA = 15,0, Gap Extension Penalty = 6,66, Matriz de DNA =

10 Identidade, Protein Gap Open Penalty = 10,0, Protein Gap Extension Penalty = 0,2, matriz de Proteína = Gonnet. A identidade poderá ser calculada de acordo com o procedimento descrito pela documentação do ClustalW: "Uma contagem em pares é calculada para cada par de sequências

15 que estejam sendo alinhadas. Estas contagens são apresentadas como uma tabela nos resultados. As contagens em pares são calculadas como o número de identidades no melhor alinhamento dividido pelo número de resíduos comparados (posições de espaço são excluídos). Ambas

20 estas contagens são inicialmente calculadas como contagens de identidade percentuais e são convertidas em distâncias dividindo por 100 e subtraindo de 1,0 para dar o número de diferenças por sítio. Nós não corrigimos para substituições múltiplas nestas distâncias iniciais. Como

25 a contagem em pares é calculada independentemente da matriz e das espaços escolhidas, ela terá sempre o mesmo valor para um par de sequências em particular.

Deverá ser notado que uma região codificadora é considerada como sendo de um organismo se ela codificar

30 uma sequência de proteína substancialmente idêntica àquela da mesma proteína purificada das células do organismo.

Em uma concretização, a levedura poderá ser transformada com uma região codificadora codificando uma

35 fosfoenolpiruvato carboxilase (PEP), ou como uma alternativa ou adicionalmente à PYC (EC 4.1.1.38). A PEP carboxilase poderá ser qualquer enzima que seja capaz de

catalisar a conversão do fosfoenolpiruvato para oxaloacetato. Uma enzima não necessita ser identificada na literatura como uma PEP carboxilase ao tempo em que o presente pedido de patente foi depositado para estar dentro da definição de uma PEP carboxilase. Uma PEP carboxilase de qualquer organismo fonte poderá ser usado e a PEP carboxilase poderá ser do tipo selvagem ou dotipo selvagem modificado. A PEP carboxilase deverá ser insensível à inibição por malato, aspartato, e oxaloacetato. Observou-se que a PEP carboxilase da *E. coli* é inibida por malato.

A enzima de desidrogenase de malato (MDH) poderá ser qualquer enzima capaz de catalisar a conversão do oxaloacetato a malato (EC 1.1.1.37), onde a MDH é ativa no citossol e não é inativada na presença de glicose. (Os termos "malato" e "ácido málico" poderão ser usados intercambiavelmente, aqui exceto em contextos onde for indicada uma espécie iônica em particular). Uma enzima não necessita ser identificada na literatura como uma desidrogenase de malato ao tempo em que o presente pedido de patente foi depositado para estar dentro da definição de uma carboxilase de MDH. "Ativa no citossol" significa que uma forma cataliticamente ativa da enzima está presente no citossol. "Não inativada na presença de glicose" significa que a atividade catalítica da enzima não é reduzida quando exposta à glicose relativamente a quando a glicose está ausente. Uma MDH de qualquer fonte de organismo poderá ser usada e a MDH poderá ser do tipo selvagem ou do tipo selvagem modificado. Em uma concretização, a MDH poderá ser MDH1 de *S. cerevisiae* ou MDH# de *S. cerevisiae*. A MDH2 de *S. cerevisiae* do tipo selvagem é ativa no citossol, mas é inativada na presença de glicose. Em uma concretização, a MDH poderá ser uma MDH2 de *S. cerevisiae* modificada (por engenharia genética, modificação pós-translacional, ou qualquer outra técnica conhecida na arte) para ser ativa no citossol e não inativada na presença de glicose. Em uma

concretização, a MDH contém uma seqüência ou seqüências sinalizadora(s) capaz(es) de direcionar a MDH ao citossol da levedura ou a MDH carece de uma seqüência ou seqüências de sinalização capaz(es) de direcionar a MDH para uma região intracelular da levedura outra que não o citossol. Em uma concretização, a MDH poderá ser *S. cerevisiae* MDH3 Δ SKL, na qual a região codificadora codificando a MDH tenha sido alterada para deletar os resíduos SKL terminados por carbóxi do MDH3 da *S. cerevisiae* do tipo selvagem, que normalmente direcionam a MDH3 para o peroxissoma. Em uma concretização, a MDH poderá ter pelo menos 75% de identidade à seqüência de aminoácido dada em SEQ ID NO:2. Em uma concretização, a MDH terá pelo menos 80% de identidade à seqüência de aminoácido dada em SEQ ID NO:2. Em uma concretização, a MDH terá pelo menos 85% de identidade à seqüência de aminoácido dada em SEQ ID NO:2. Em uma concretização, a MDH terá pelo menos 90% de identidade à seqüência de aminoácido dada em SEQ ID NO:2. Em uma concretização, a MDH terá pelo menos 95% de identidade à seqüência de aminoácido dada em SEQ ID NO:2. Em uma outra concretização, a MDH terá pelo menos 96% de identidade à seqüência de aminoácido dada em SEQ ID NO:2. Em uma concretização adicional, a MDH terá pelo menos 97% de identidade à seqüência de aminoácido dada em SEQ ID NO:2. Em ainda uma outra concretização, a MDH terá pelo menos 98% de identidade à seqüência de aminoácido dada em SEQ ID NO:2. Em ainda uma outra concretização, a MDH terá pelo menos 99% de identidade à seqüência de aminoácido dada em SEQ ID NO:2. Em uma concretização, a PYC terá a seqüência de aminoácido dada em SEQ ID NO:2.

A proteína transportadora de ácido málico poderá ser qualquer proteína capaz de transportar malato do citossol de uma levedura através da membrana celular e para dentro do espaço extracelular. Uma proteína não necessita ser identificada na literatura como uma proteína transportadora de ácido málico na época do depósito do

presente pedido de patente para ser enquadrada na definição de uma MAE. Uma MAE de qualquer organismo fonte poderá ser usada e a MAE poderá ser do tipo selvagem ou modificada a partir do tipo selvagem. A MAE poderá ser

5 uma piruvato carboxilase de *Schizosaccharomyces pombe* SpMAE1. Em uma concretização, a MAE poderá ter pelo menos 75% de identidade à seqüência de aminoácido dada em SEQ ID NO:3. Em uma concretização, a MAE terá pelo menos 80% de identidade à seqüência de aminoácido dada em SEQ ID

10 NO:3. Em uma concretização, a MAE terá pelo menos 85% de identidade à seqüência de aminoácido dada em SEQ ID NO:3. Em uma concretização, a MAE terá pelo menos 90% de identidade à seqüência de aminoácido dada em SEQ ID NO:3. Em uma concretização, a MAE terá pelo menos 95% de

15 identidade à seqüência de aminoácido dada em SEQ ID NO:3. Em uma outra concretização, a MAE terá pelo menos 96% de identidade à seqüência de aminoácido dada em SEQ ID NO:3. Em uma concretização adicional, a MAE terá pelo menos 97% de identidade à seqüência de aminoácido dada em SEQ ID

20 NO:3. Em ainda uma outra concretização, a MAE terá pelo menos 98% de identidade à seqüência de aminoácido dada em SEQ ID NO:3. Em ainda uma outra concretização, a MAE terá pelo menos 99% de identidade à seqüência de aminoácido dada em SEQ ID NO:3. Em uma concretização, a MAE terá a

25 seqüência de aminoácido dada em SEQ ID NO:3. Preferivelmente, uma região codificadora codificando a enzima ou proteína foi extraída de um ácido nucléico de um organismo ou sintetizada por meios químicos, ela poderá ser preparada por transformação em uma expressão

30 na levedura. No mínimo, isto envolve a inserção da região codificadora em um vetor e ligação operável a um promotor encontrado no vetor e ativo na levedura. Qualquer vetor (integrativo, cromossômico, ou epissômico) poderá ser usado.

35 Qualquer promotor ativo no hospedeiro alvo (homólogo ou heterólogo; constitutivo, induzível ou repressível) poderá ser usado. Tal inserção poderá envolver o uso de

endonucleases de restrição para "abrir" o vetor em um ponto desejado onde seja possível a ligação ao promotor, seguida de ligação da região codificadora no ponto desejado. Caso desejado, antes da inserção no vetor, a
5 região codificadora poderá ser preparada para uso no organismo alvo. Isto poderá envolver alterar os códons usados na região codificadora para combinar mais plenamente o uso do códon do organismo alvo; mudar seqüências na região codificadora que poderia prejudicar
10 a transcrição ou tradução da região codificadora ou a estabilidade de um transcrito mRNA da região codificadora; ou adicionar ou remover porções codificando peptídeos sinalizadores (regiões da proteína codificadas pela região codificadora que direcionam a proteína para
15 locais específicos (p. ex., uma organela, a membrana da célula ou uma organela, ou secreções extracelulares)), dentre outras preparações possíveis conhecidas na técnica.

Independentemente de a região codificadora estar
20 modificada, quando a região codificadora é inserida no vetor, ela é operavelmente ligada ao promotor ativo na levedura. Um promotor, como é conhecido, é uma seqüência de DNA que poderá direcionar a transcrição de uma região codificadora vizinha. Conforme já descrito, o promotor
25 poderá ser constitutivo, induzível ou repressível. Promotores constitutivos poderão ser induzidos pela adição ao meio de uma molécula indutora apropriada, que será determinada pela identidade do promotor. Promotores repressíveis poderão ser reprimidos pela adição ao meio
30 de uma molécula repressora apropriada, que será determinada pela identidade do promotor. Em uma concretização, o promotor é constitutivo. Por exemplo, em uma concretização adicional, o promotor constitutivo é o promotor triosefosfateisomerase de *S. cerevisiae* (TPI).
35 Outro exemplo, em uma concretização adicional, o promotor é gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *S. cerevisiae* THD3.

Uma região terminadora poderá ser usada, caso desejado. Uma região terminadora exemplificativa é *S. cerevisiae* *CYC1*.

O vetor compreendendo a região codificadora operavelmente ligada ao promotor poderá ser um plasmídeo, um cosmídeo, um ou cromossomo artificial de levedura, dentre outros conhecidos na técnica como sendo apropriados para uso com leveduras. Adicionalmente à região codificadora operavelmente ligada ao promotor, o vetor também poderá compreender outros elementos genéticos. Por exemplo, se não for esperado que o vetor se integre ao genoma da levedura, o vetor poderá compreender uma origem de replicação, que permita que o vetor seja passado para as células progênie de uma levedura compreendendo o vetor. Caso seja desejada a integração do vetor ao genoma da levedura, o vetor poderá compreender seqüências homólogas a seqüências encontradas no genoma da levedura, e também poderá compreender regiões codificadoras que possam facilitar a integração. Para determinar quais células da levedura serão transformadas, o vetor poderá compreender um marcador selecionável ou um marcador localizável que confira um fenotipo à levedura que a distinga de uma levedura não transformada, p. ex., ela sobreviva em um meio compreendendo um antibiótico fatal a leveduras não transformadas ou que metabolize um componente do meio em um produto que a levedura não transformada não seja capaz, dentre outros fenotipos. Adicionalmente, o vetor poderá compreender outros elementos genéticos, tais como sítios de endonuclease de restrição detectável ou selecionável e outros tipicamente encontrados em vetores. Após o vetor ter sido preparado, com a região codificadora operavelmente ligada ao promotor, a levedura poderá ser transformada com o vetor (i. é, o vetor poderá ser introduzido em pelo menos uma das células de uma população de leveduras). Técnicas para a transformação estão bem estabelecidas, e incluem eletroporação, bombardeio com microprojéteis, e o método de

LiAc/ssDNA/PEG, dentre outros. Células de leveduras, que estejam transformadas, poderão então ser detectadas pelo mesmo marcador detectável ou selecionável no vetor. Deverá ser notado que a frase "levedura transformada" tem

5 essencialmente o mesmo significado de "levedura recombinante", conforme definido acima. A levedura transformada poderá ser uma que tenha recebido o vetor em uma técnica de transformação, ou poderá ser uma progênie de uma tal levedura.

10 Com relação a PYC, MDH e MAE, aquele entendido no assunto tendo o benefício do presente descritivo entenderá, à luz da redundância do código genético, que um grande número de regiões codificadoras potenciais poderão existir que codificarão uma seqüência de PYC, seqüência de MDH, ou

15 seqüência de MAE particular. Uma região exemplificativa de PYC é dada como SEQ ID NO:4; uma região exemplificativa de MDH é dada com SEQ ID NO:5; e uma região exemplificativa de MAE é dada como SEQ ID NO:6. Qualquer região codificadora que codifique uma desejada

20 seqüência de proteína poderá ser usada como uma questão de experimentação de rotina. Aquele entendido no assunto entenderá que códons particulares ("códon polarizados") poderão ter maiores poços de tRNA correspondentes na levedura que códons redundantes diferentes e assim

25 poderão permitir uma tradução de proteína mais rápida na levedura.

Aquele entendido no assunto também entenderá que diversas seqüências reguladoras, dentre outras conhecidas na técnica, poderão ser usadas como uma questão de

30 experimentação de rotina na preparação e no uso da levedura funcionalmente transformada.

A presente invenção não está imitada a enzimas dos trajetos conhecidos para a produção de intermediários de ácido málico ou plantas em ácido málico, leveduras, ou

35 outros organismos.

Em uma outra concretização, a presente invenção refere-se a um método para produzir ácido málico ou ácido succínico

compreendendo cultivar uma levedura recombinante, onde a levedura é uma enzima de piruvato decarboxilase (PDC) de atividade negativa (PDC-negativa) e é funcionalmente transformada com uma região codificadora codificando uma
5 enzima de piruvato carboxilase (PYC) onde a PYC é ativa no citossol, uma região codificadora codificando uma enzima de malato desidrogenase (MDH) onde a MDH é ativa no citossol e não é inativada na presença de glicose, e uma região codificadora codificando uma proteína
10 transportadora de ácido málico (MAE), em um meio compreendendo uma fonte de carbono e uma fonte de dióxido de carbono; e isolar ácido málico ou ácido succínico do meio.

A levedura e as regiões codificadoras desta poderão ser
15 conforme descrito acima.

Após ter sido obtida uma levedura recombinante, a levedura poderá ser cultivada em um meio. O meio no qual a levedura pode ser cultivada poderá ser qualquer meio conhecido na técnica como sendo adequado para este
20 propósito. Técnicas e meios de cultura são bem conhecidos na arte. Em uma concretização, o cultivo poderá ser realizado por fermentação aquosa em um recipiente apropriado. Exemplos de um recipiente típico para a fermentação de leveduras compreendem um frasco de
25 agitação ou um biorreator.

O meio poderá compreender uma fonte de carbono tal como glicose, sacarose, frutose, lactose, galactose, ou hidrolisados de matéria vegetal, dentre outras. Em uma concretização, o meio poderá também compreender uma fonte
30 de nitrogênio tal como uma molécula orgânica ou inorgânica. Em uma concretização adicional, o meio poderá também compreender componentes tais como aminoácidos; purinas; pirimidinas; licor de infusão de milho; extrato de levedo; hidrolisados de proteína; vitaminas solúveis
35 em água, tais como complexos de vitamina B; ou sais inorgânicos tais como cloretos, hidrocloretos, fosfatos, ou sulfatos de Ca, Mg, Na, K, Fe, Ni, Co, Cu, Mn, Mo, ou

Zn, dentre outros. Componentes adicionais conhecidos daqueles entendidos no assunto como sendo úteis no cultivo ou fermentação de leveduras também poderão ser incluídos. O meio também poderá ser tamponado, mas não
5 necessita ser.

A fonte de dióxido de carbono poderá ser dióxido de carbono gasoso (que poderá ser introduzido em um espaço de cabeça sobre o meio ou aspergido através do meio) ou um sal de carbonato (por exemplo, carbonato de cálcio).

10 Durante o decurso da fermentação, a fonte de carbono é internalizada pela levedura e convertida, através de um número de etapas, em ácido málico. A expressão da MAE permite que o ácido málico seja produzido para ser secretado pela levedura para dentro do meio. Tipicamente,
15 alguma quantidade da fonte de carbono é convertida em ácido succínico e alguma quantidade do ácido succínico é secretada pela levedura para dentro do leito.

Um meio exemplificativo é um meio mineral contendo 50 g/L de CaCO_3 , e 1 g/L de uréia.

20 Após a cultura ter progredido durante uma extensão de tempo suficiente para produzir uma concentração de ácido málico ou succínico no meio, o ácido málico ou ácido succínico poderá ser isolado. "Isolado" conforme usado aqui para se referir a um ácido orgânico, significa ser
25 trazido a um estado de maior pureza por separação do ácido orgânico de pelo menos um outro componente (quer outro orgânico, quer um composto não daquela categoria) da levedura no meio. Em uma concretização, o ácido orgânico isolado tem pelo menos cerca de 95% de pureza, tal como pelo menos cerca de 99% de pureza.
30

Para isolar ácido málico acumulado no meio, o isolamento poderá compreender purificar o ácido málico do meio por técnicas conhecidas, tais como o uso de uma resina trocadora de íons, carbono ativado, microfiltração,
35 ultrafiltração, nanofiltração, extração líquido-líquido, cristalização, ou cromatografia, dentre outras.

O isolamento do ácido succínico poderá ser realizado da

mesma maneira.

Observamos que cultivar uma levedura recombinante da presente invenção em meio mineral compreendendo 50 g/L de CaCO_3 e 1 g/L de uréia poderá conduzir a níveis de ácido málico (como ácido) de pelo menos 1 g/L. Em uma concretização, poderá conduzir a níveis de ácido málico (como ácido) no meio de pelo menos 10 g/L. Em uma concretização adicional, poderá conduzir a níveis de ácido málico (como ácido) de pelo menos 30 g/L.

Se a levedura acumular ácido málico no meio durante a etapa de cultura, preferivelmente a concentração de ácido málico é estabilizada ou deixada aumentar.

As seguintes definições são providas para ajudar aqueles entendidos no assunto a entenderem a descrição detalhada da presente invenção.

O termo "acumulação de ácido málico acima de níveis básicos" refere-se à acumulação de ácido málico acima de níveis indetectáveis conforme determinados usando os procedimentos descritos aqui.

"Amplificação" refere-se a aumentar o número de cópias de uma desejada molécula de ácido nucléico ou para aumentar a atividade de uma enzima, por qualquer meio.

"Códon" refere-se a uma seqüência de três nucleotídeos que especifiquem um aminoácido em particular.

"DNA Ligase" refere-se a uma enzima que une covalentemente duas peças de DNA de cordões duplos.

"Eletroporação" refere-se a um método para introduzir células externas de DNA, que usa uma breve carga de CC de alta tensão para permeabilizar células hospedeiras, causando que elas captem DNA extra-cromossômico.

"Endonuclease" refere-se a uma enzima que hidrolisa um DNA de cordão duplo em locais internos.

O termo "expressão" refere-se à transcrição de um gene para produzir o correspondente mRNA e tradução deste mRNA para produzir o correspondente produto de gene, i. é, um peptídeo, polipeptídeo, ou proteína.

A frase "funcionalmente ligado" ou "operavelmente ligado"

refere-se a um promotor ou uma região promotora e uma codificação ou seqüência estrutural em uma orientação e distância tais que a transcrição da codificação ou seqüência estrutural possa ser direcionada ao promotor ou à região promotora.

O termo "gene" refere-se a DNA cromossômico, DNA de plasmídeo, cDNA, DNA sintético, ou outros DNAs que codifiquem um peptídeo, polipeptídeo, proteína, ou molécula de RNA, e regiões flanqueando a seqüência de codificação envolvida na regulação da expressão.

O termo "genoma" abrange tanto os cromossomos quanto as plasmídeos em uma célula hospedeira. DNAs codificadores da presente invenção introduzidos em células hospedeiras podem daí ser cromossomicamente integrados ou plasmídeo-localizadas.

"DNA heterólogo" refere-se ao DNA de uma fonte diferente daquela da célula recipiente.

"DNA homólogo" refere-se ao DNA da mesma fonte daquela da célula recipiente.

"Hibridização" refere-se à habilidade de uma cadeia de ácido nucléico de se unir a uma cadeia complementar via emparelhamento básico. A hibridização ocorre quando seqüências complementares em duas cadeias de ácidos nucléicos ligam-se uma à outra.

O termo "meio" refere-se ao ambiente químico da levedura compreendendo qualquer componente requerido para o crescimento da levedura ou da levedura recombinante e um ou mais precursores para a produção de ácido ascórbico. Os componentes para o crescimento da levedura e os precursores para a produção de ácido ascórbico poderão ou não ser idênticos.

"Janela de leitura aberta" ("Open Reading Frame" (ORF)) refere-se a uma região do DNA ou RNA que codifica um peptídeo, polipeptídeo, ou proteína.

"Plasmídeo" refere-se a uma peça replicável, extra cromossômica, circular de DNA.

"Reação de cadeia de polimerase (PCR)" refere-se a uma

técnica enzimática para criar múltiplas cópias de uma sequência de ácido nucléico. Cópias se seqüências de ácido nucléico são preparadas transladando uma DNA polimerase entre dois amplímeros. A base deste método de amplificação são múltiplos ciclos de mudanças de temperatura para desnaturar, então re-temperar amplímeros, seguido de extensão para sintetizar novos cordões de DNA na região localizada entre os amplímeros de flanqueamento.

10 O termo "promotor" ou "região promotora" refere-se a uma sequência de DNA, geralmente encontrada a montante (5") de uma sequência codificadora, que controle a expressão da sequência codificadora controlando a produção de RNA mensageiro (mRNA) provendo o sítio de reconhecimento no

15 sítio correto.

Uma "célula recombinante" ou "célula transformada" é uma célula que contenha uma sequência de ácido nucléico não naturalmente ocorrente na célula ou uma cópia ou cópias adicional(is) de uma sequência de ácido nucléico

20 endógena, onde a sequência de ácido nucléico é introduzida na célula ou um ancestral desta por ação humana.

O termo "vetor recombinante" ou "construto de DNA ou RNA recombinante" refere-se a qualquer agente tal como um

25 plasmídeo, cosmídeo, vírus, sequência autonomamente replicante, fago, sequência de nucleotídeo de DNA ou RNA de cordão único ou cordão duplo linear ou circular, derivado de qualquer fonte capaz de integração genômica ou replicação autônoma, compreendendo uma molécula de

30 ácido nucléico na qual uma ou mais seqüências foram ligadas de uma maneira funcionalmente operativa. Tais construtos ou vetores recombinantes são capazes de introduzir uma sequência ou região promotora reguladora 5' e uma sequência de DNA para um produto de gene

35 selecionado em uma célula de uma maneira tal que a sequência de DNA seja transcrita para um mRNA funcional, que poderá ou não ser traduzido e daí expressado.

"Enzima de restrição" refere-se a uma enzima que reconheça uma seqüência específica de nucleotídeos em um DNA de cordões duplos e clive ambos os cordões; também chamada de uma endonuclease de restrição. A clivagem
5 ocorre tipicamente dentro do sítio de restrição ou próximo a este.

"Marcador selecionável" refere-se a uma seqüência de ácido nucléico cuja expressão confira um fenotipo facilitando a identificação de células contendo a
10 seqüência de ácido nucléico. Marcadores selecionáveis incluem aqueles que confirmam resistência a químicos tóxicos (p. ex., ampicilina, canamicina) ou complementam uma deficiência nutricional (p. ex., uracila, histidina, leucina).

15 "Marcador localizável" refere-se a uma seqüência de ácido nucléico cuja expressão confere uma característica visualmente distinguível (p. ex., mudanças de cor, fluroescência).

"Transcrição" refere-se ao processo para produzir uma
20 cópia de RNA a partir de um gabarito de DNA.

"Transformação" refere-se a um processo para introduzir uma seqüência de ácido nucléico exógeno (p. ex., um vetor, plasmídeo, ou molécula de ácido nucléico recombinante) em uma célula na qual aquele ácido nucléico
25 exógeno é incorporado a um cromossomo ou é capaz de replicação autônoma. Uma célula que sofreu transformação, ou uma descendente de tal célula, é "transformada" ou "recombinante". Se o ácido nucléico exógeno compreender uma região codificadora codificando uma proteína
30 desejada, e a proteína desejada for transformada em levedura e for substancialmente funcional, uma tal levedura transformada é "funcionalmente transformada".

"Tradução" refere-se à produção de proteína a partir de um RNA mensageiro.

35 O termo "Rendimento" refere-se à quantidade de ácido málico produzida (molar ou peso/volume) dividida pela quantidade de fonte de carbono consumida (molar ou

peso/volume) multiplicada por 100.

"Unidade" de enzima refere-se à atividade enzimática e indica a quantidade de micromoles de substrato convertida por mg de proteínas celulares totais por minuto.

5 "Vetor" refere-se a uma molécula de DNA ou RNA (tal como um plasmídeo, cosmídeo, bacteriófago, cromossomo artificial de levedura, ou vírus, dentre outros) que carregue seqüências de ácido nucléico para dentro de uma célula hospedeira. O vetor ou uma porção deste poderá ser
10 inserido(a) no genoma da célula hospedeira.

Os seguintes exemplos estão incluídos para demonstrar concretizações preferidas da invenção. Deverá ser apreciado por aqueles entendidos no assunto que as técnicas divulgadas nos exemplos a seguir representam
15 técnicas descobertas pelo inventor para funcionar bem na prática da invenção, e assim deverão ser considerados como constituindo modos preferidos para sua prática. Entretanto, aqueles entendidos no assunto deverão, à luz do presente descritivo, apreciar que muitas modificações
20 poderão ser feitas nas concretizações específicas que são divulgadas e ainda assim obter um resultado igual ou semelhante sem partir do espírito e da abrangência da invenção.

Exemplo 1

25 Duas cepas de leveduras foram construídas partindo da cepa de *S. cerevisiae* TAM(MATapdc1(-6,-2)::loxP pdc5(-6,-2)::loxP pdc(-6,-2)::loxP ura3-52(PDC-negativa), que foi transformada com genes codificando uma piruvato carboxilase (PYC), uma malato desidrogenase (MDH), e uma
30 proteína transportadora de malato (MAE).

Uma vez que a cepa de TAM tem apenas um marcador auxotrófico, desmontamos o local TRP1 de maneira a possibilitar a introdução de mais que um plasmídeo com um marcador auxotrófico, resultando em R WB961 (MATa pdc1(-
35 6,-2)::loxP pdc5(-6,-2)::loxP pdc6(-6,-2)::loxP mutx ura3-52 trp::Kanlox).

Os genes MDH e PYC que usamos tinham sido clonados

anteriormente a plasmidas p426GPDMDH3 (plasmida 2 μ com marcador *URA3*, contendo o gene *MDH3 Δ SKL* entre o promotor *THD3* de *S. cerevisiae* e o terminador *CYC1* de *S. cerevisiae*, figura 3) e pRS2 (plasmida 2 μ com marcador

5 *URA3*, contendo o gene *PYC2*, figura 4).

Um cassete P_{TDH3} -SpMAE1 carregando a *MAE* *S. pombe* foi reclonado a YE_{plac112}(2 μ , *TRP1* e Y_{plac204}(integração, *TRP1*), resultando em YE_{plac112}SpMAE1 (figura 6) e YI_{plac204}SpMAE1 (não mostrado).

10 Um vetor de *PYC* e *MDH* foi preparado: pRS2MDH3 Δ SKL (2 μ , *URA3*, *PYC2*, *MDH3 Δ SKL*) (figura 5).

RWB961 foi transformado com pRS2MDH3 Δ SKL e YE_{plac112}SpMAE1 (cepa 1) ou pRS52MDH3 Δ SKL e YI_{plac204}SpMAE1 (cepa 2). Ambas a cepa 1 e a cepa 2

15 sobreexpressaram *PYC2* e *MDH3 Δ SKL*, mas tinham diferentes níveis de expressão para a *MAE11*, assumindo níveis de expressão eram proporcionais ao número de cópias de plasmídeo, cerca de 10-40 por célula para YE_{plac112}SpMAE1 (baseado em 2 μ) e cerca de 1-2 por célula para

20 YI_{plac204}SpMAE1 (integrado).

Após isolamento da cepa 1 e da cepa 2, 0,04 g/L ou 0,4 g/L de cada cepa foi introduzido em um frasco de agitação contendo 100 mL de meio mineral, 50 g/L de CaCO₃, e 1 g/L de uréia. Os frascos foram agitados a 200 rpm durante o

25 tempo de cada experimento. Amostras de cada cultura foram isoladas a diversos tempos e a concentrações de glicose, piruvato, glicerol, succinato, e malato foram determinadas. Foram observadas concentrações de malato extracelular de cerca de 250mM após cerca de 90-160 h. Os

30 resultados são mostrados nas figuras 1-2.

Os resultados indicam que as seguintes modificações nos trajetos metabólicos da levedura permitem a acumulação de altos níveis de malato extracelular por leveduras recombinantes;

35 1. Direcionar o fluxo de piruvato para piruvato carboxilase (reduzindo a atividade de PDC).

2. Aumentar o fluxo através da piruvato carboxilase

sobreexpressando a PYC>

3. Introduzir altas atividades de malato desidrogenase no citossol para capturar oxaloacetato formado pela PYC.

4. Introduzir um transportador de ácido málico heterólogo
5 para facilitar a exportação de malato.

A figura 2 também mostra que concentrações de succinato extracelular de cerca de 50 mM poderiam ser produzidas simultaneamente com a produção de malato descrita acima.

Exemplo 2

10 O efeito de dióxido de carbono na produção de malato em um sistema fermentador foi estudado usando uma cepa TAM sobreexpressando PYC2, MDH3 citossólico, e um transportador *S. pombe* MAE1 (YEplac112SpMAE1), conforme descrito no exemplo 1. Foram realizados três experimentos
15 em fermentador:

A: Cultivos em batelada sob condições plenamente aeróbicas.

B: Cultivos em batelada sob condições plenamente aeróbicas com uma mistura de N₂/O₂/CO₂ de 70%/20%/10%.

20 C: Cultivos em batelada sob condições plenamente aeróbicas com uma mistura de N₂/O₂/CO₂ de 65%/20%/15%.

Protocolo

Meios

O meio mineral continha 100 g de glicose, 3 g de KH₂PO₄,
25 0,5 g de MgSO₂.7H₂O e 1 mL de solução de elementos traço de acordo com Verduyn et al. (Yeast 8: 501-517, 1992) por litro de água desmineralizada. Após esterilização térmica do meio durante 20 min a 110°C, 1 mL vitaminas esterilizadas em filtro de acordo com Verduyn et al.
30 (Yeast 8: 501-517, 1992) e uma solução contendo 1 g de uréia adicionado por litro. Foi também realizada a adição de 0,2 mL por litro de antiespumante (BDH). Nenhum CaCO₃ foi adicionado.

Cultivos em fermentador

35 Os cultivos em fermentador foram realizados em biorreatores com um volume de trabalho de 1 litro (Applikon Dependable Instruments, Schiedam, Países

Baixos). O pH foi automaticamente controlado em pH 5,0 por titulação com hidróxido de potássio 2 M. A temperatura, mantida a 30°C, foi medida com um sensor Pt100 e controlada por meio de água circulante através de um ponteiro de aquecimento. A velocidade do agitador, usando dois impulsores rushton, foi mantida constante a 800 rpm. Para condições aeróbicas, foi mantido um fluxo de ar de 0,5 L.min⁻¹, usando um controlador de fluxo de massa Brooks 5876 (Brooks BV, Veenendaal, Países Baixos), para manter a concentração de oxigênio dissolvido de 60% acima da saturação no ar à pressão atmosférica.

Nas bateladas B e C, foi alcançada uma concentração de dióxido de carbono aumentada de 10% ou 15% enquanto que mantendo uma boa oxigenação misturando ar pressurizado 79% de N₂ + 21% de O₂ e uma mistura gasosa contendo 79% de CO₂ + 21% de O₂ (Hoekloos, Schiedam, Países Baixos). A percentagem desejada de 10% ou 15% de CO₂ suprida pelo controlador de fluxo de massa Brooks foi encimada por ar comprimido até uma taxa de fluxo total de 0,5 L/min.

O pH, DOT e alimentações de KOH/H₂SO₄ foram monitorados continuamente usando um sistema de aquisição de dados & controle em-linha (MFCS/Win, Sartorius BBI Systems).

Análise dos gases de escape

Os gases de escape dos cultivos em fermentador foram resfriados em um condensador (2°C) e secados com um secador Perma Pure (tipo PD-625-12P). As concentrações de oxigênio de dióxido de carbono foram determinadas com um analisador de gás Rosemount NGA 2000. A taxa de fluxo de gás de escape foi medida com um fluxômetro Saga Digital Flow Meter (Ion Science, Cambridge). Taxas específicas de produção de dióxido de carbono e consumo de oxigênio foram calculados conforme descrito por van Urk et al., (1988, Yeast: 501-517).

Preparação de amostras

Amostras para análises de biomassa, substrato e produto foram coletadas sobre gelo. Amostras de caldo de fermentação e amostras livres de células (preparadas por

centrifugação a 10,000 x g durante 10 minutos) foram armazenadas a -20°C para análise posterior.

Determinação de metabólitos

Determinações por HPLC

- 5 Determinação de açúcares, ácidos orgânicos e polióis foram determinados simultaneamente usando um sistema Waters HPLC 2690 com uma coluna de exclusão de íons Aminex HPX-87H (300 X 7,8 mm, BioRad) (60°C, 0,6 mL/mini H₂SO₄ 5 mM) acoplada a um detector de UV Waters 2487 e um
10 detector de índice de refração Waters 2410.

Determinação de metabólitos enzimáticos

- Para verificar as medições de HPLC e/ou excluir erros de separação, ácido L-málico foi determinado com um kit enzimático (Boehringer-Mannheim, n° de Catálogo 0 139
15 068).

Determinação de peso seco

- O peso seco de levedura nas culturas foi determinado filtrando 5 mL de uma cultura em um papel de filtro de 0,45 µm (Gelman Sciences). Quando necessário, a amostra
20 foi diluída a uma concentração final entre 5 e 10 g.L⁻¹. Os filtros foram mantidos em uma incubadora a 80°C durante pelo menos 24 horas antes do uso de maneira a determinar seu peso seco antes do uso. As células de levedura na amostra foram retidas no filtro no filtro e
25 lavadas com 10 mL de água desmineralizada. O filtro com as células foi então secado em um forno de microondas (Amana Raderrange, 1500 Watts) durante 20 minutos a uma capacidade de 50%. O filtro secado, com as células, foram pesados após resfriar durante 2 minutos. O peso seco foi
30 calculado subtraindo o peso do filtro do peso do filtro com células.

Determinação de densidade ótica (OD₆₆₀)

- A densidade ótica das culturas de levedura foi determinada a 660 nm com um espectrofotômetro; Novaspec
35 II (Amersham Pharmasia Biotech, Buckinghamshire, Reino Unido) em cuvetas de 4 mL. Quando necessário, as amostras foram diluídas para produzir uma densidade ótica entre

0,1 e 0,3.

Batelada A: plenamente aerado 21% de O_2 (+79% de N_2)

As figuras 7 e 8 mostram a formação de metabólitos contra o tempo. É mostrado o resultado de um experimento de
 5 batelada representativa por cepa. Experimentos replicados produziram essencialmente os mesmos resultados. A figura 7 denota a biomassa de partida (retângulos), o consumo de glicose (triângulos) e a produção de piruvato (estrelas). A figura 8 denota a produção de malato (quadrados),
 10 glicerol (semi-círculos superiores), e succinato (octógonos). Conforme mostrado na figura 8, a levedura produziu cerca de 25 mM de malato após 24 h e cerca de 20 mM de succinato após 48 h.

Batelada B: 10% de CO_2 + 21% de O_2 (+69% de N_2)

15 As figuras 9 e 10 mostram a formação de metabólitos contra o tempo. A figura 9 denota a biomassa de partida (retângulos), o consumo de glicose (triângulos) e a produção de piruvato (estrelas). A figura 10 denota a produção de malato (quadrados), glicerol (semi-círculos
 20 superiores), e succinato (octógonos). Conforme mostrado na figura 10, a levedura produziu cerca de 100 mM de malato após 24 h e cerca de 150 mM após 96 h, bem como cerca de 60 mM de succinato após 96 h.

Batelada C: 15% de CO_2 + 21% de O_2 (+64% de N_2)

25 As figuras 11 e 12 mostram a formação de metabólitos contra o tempo. A figura 11 denota a biomassa de partida (retângulos), o consumo de glicose (triângulos) e a produção de piruvato (estrelas). A figura 12 denota a produção de malato (quadrados), glicerol (semi-círculos
 30 superiores), e succinato (octógonos). Conforme mostrado na figura 10, a levedura produziu cerca de 45 mM de malato após 24 h e cerca de 100 mM após 96 h, bem como cerca de 60 mM de succinato após 96 h.

Todas as composições e os métodos divulgados aqui e
 35 reivindicados aqui poderão ser feitos e executados sem experimentação indevida à luz do presente descritivo. Conquanto as composições e os métodos desta invenção

tenham sido descritos em termos de concretizações preferidas, tornar-se-á aparente àqueles entendidos no assunto que variações poderão ser aplicadas às composições e métodos e nas etapas e na seqüência das

5 etapas do método descrito aqui sem partir do conceito, espírito e abrangência da invenção. Mais especificamente, ficará aparente que certos agentes que sejam tanto quimicamente quanto fisiologicamente relacionados poderão ser substituídos pelos agentes descritos aqui enquanto

10 resultados iguais ou semelhantes poderão ser alcançados. Todos os tais substitutos e modificações aparentes àqueles entendidos no assunto deverão ser considerados como estando dentro do espírito, da abrangência e do conceito da invenção conforme definido pelas

15 reivindicações apensas.

Listagem de Sequências

```

<110> Tate & Lyle Ingredients Americas, INC
Winkler, Aaron A.
de Hulster, Erik
van Dijken, Johannes Pieter
Pronk, Jacobus T.

<120> "LEVEDURA RECOMBINANTE E MÉTODO PARA PRODUIR ÁCIDO
MÁLICO".

<130> 2027.709000, 2007090

<160> 6

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 1180
<212> PRT
<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 1

Met Ser Ser Ser Lys Lys Leu Ala Gly Leu Arg Asp Asn Phe Ser Leu
1 5 10 15
Leu Gly Glu Lys Asn Lys Ile Leu Val Ala Asn Arg Gly Glu Ile Pro
20 25 30
Ile Arg Ile Phe Arg Ser Ala His Glu Leu Ser Met Arg Thr Ile Ala
35 40 45
Ile Tyr Ser His Glu Asp Arg Leu Ser Met His Arg Leu Lys Ala Asp
50 55 60
Glu Ala Tyr Val Ile Gly Glu Glu Gly Gln Tyr Thr Pro Val Gly Ala
65 70 75 80
Tyr Leu Ala Met Asp Glu Ile Ile Glu Ile Ala Lys Lys His Lys Val
85 90 95
Asp Phe Ile His Pro Gly Tyr Gly Phe Leu Ser Glu Asn Ser Glu Phe
100 105 110
Ala Asp Lys Val Val Lys Ala Gly Ile Thr Trp Ile Gly Pro Pro Ala
115 120 125
Glu Val Ile Asp Ser Val Gly Asp Lys Val Ser Ala Arg His Leu Ala
130 135 140
Ala Arg Ala Asn Val Pro Thr Val Pro Gly Thr Pro Gly Pro Ile Glu
145 150 155 160
Thr Val Gln Glu Ala Leu Asp Phe Val Asn Glu Tyr Gly Tyr Pro Val
165 170 175
Ile Ile Lys Ala Ala Phe Gly Gly Gly Gly Arg Gly Met Arg Val Val
180 185 190
Arg Glu Gly Asp Asp Val Ala Asp Ala Phe Gln Arg Ala Thr Ser Glu
195 200 205

```

Ala	Arg	Thr	Ala	Phe	Gly	Asn	Gly	Thr	Cys	Phe	Val	Glu	Arg	Phe	Leu
	210					215					220				
Asp	Lys	Pro	Lys	His	Ile	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Ala	Asp	Asn	His	Gly
225					230					235					240
Asn	Val	Val	His	Leu	Phe	Glu	Arg	Asp	Cys	Ser	Val	Gln	Arg	Arg	His
				245					250					255	
Gln	Lys	Val	Val	Glu	Val	Ala	Pro	Ala	Lys	Thr	Leu	Pro	Arg	Glu	Val
			260					265					270		
Arg	Asp	Ala	Ile	Leu	Thr	Asp	Ala	Val	Lys	Leu	Ala	Lys	Val	Cys	Gly
		275					280					285			
Tyr	Arg	Asn	Ala	Gly	Thr	Ala	Glu	Phe	Leu	Val	Asp	Asn	Gln	Asn	Arg
	290					295					300				
His	Tyr	Phe	Ile	Glu	Ile	Asn	Pro	Arg	Ile	Gln	Val	Glu	His	Thr	Ile
305					310					315					320
Thr	Glu	Glu	Ile	Thr	Gly	Ile	Asp	Ile	Val	Ser	Ala	Gln	Ile	Gln	Ile
				325					330					335	
Ala	Ala	Gly	Ala	Thr	Leu	Thr	Gln	Leu	Gly	Leu	Leu	Gln	Asp	Lys	Ile
			340					345					350		
Thr	Thr	Arg	Gly	Phe	Ser	Ile	Gln	Cys	Arg	Ile	Thr	Thr	Glu	Asp	Pro
		355					360					365			
Ser	Lys	Asn	Phe	Gln	Pro	Asp	Thr	Gly	Arg	Leu	Glu	Val	Tyr	Arg	Ser
	370					375					380				
Ala	Gly	Gly	Asn	Gly	Val	Arg	Leu	Asp	Gly	Gly	Asn	Ala	Tyr	Ala	Gly
385					390					395					400
Ala	Thr	Ile	Ser	Pro	His	Tyr	Asp	Ser	Met	Leu	Val	Lys	Cys	Ser	Cys
				405					410					415	
Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Glu	Ile	Val	Arg	Arg	Lys	Met	Ile	Arg	Ala	Leu
			420					425					430		
Ile	Glu	Phe	Arg	Ile	Arg	Gly	Val	Lys	Thr	Asn	Ile	Pro	Phe	Leu	Leu
		435					440					445			
Thr	Leu	Leu	Thr	Asn	Pro	Val	Phe	Ile	Glu	Gly	Thr	Tyr	Trp	Thr	Thr
	450					455					460				
Phe	Ile	Asp	Asp	Thr	Pro	Gln	Leu	Phe	Gln	Met	Val	Ser	Ser	Gln	Asn
465					470					475					480
Arg	Ala	Gln	Lys	Leu	Leu	His	Tyr	Leu	Ala	Asp	Leu	Ala	Val	Asn	Gly
				485					490					495	
Ser	Ser	Ile	Lys	Gly	Gln	Ile	Gly	Leu	Pro	Lys	Leu	Lys	Ser	Asn	Pro
			500					505					510		
Ser	Val	Pro	His	Leu	His	Asp	Ala	Gln	Gly	Asn	Val	Ile	Asn	Val	Thr
		515					520					525			
Lys	Ser	Ala	Pro	Pro	Ser	Gly	Trp	Arg	Gln	Val	Leu	Leu	Glu	Lys	Gly
	530					535					540				
Pro	Ser	Glu	Phe	Ala	Lys	Gln	Val	Arg	Gln	Phe	Asn	Gly	Thr	Leu	Leu
545					550					555					560
Met	Asp	Thr	Thr	Trp	Arg	Asp	Ala	His	Gln	Ser	Leu	Leu	Ala	Thr	Arg
				565					570					575	
Val	Arg	Thr	His	Asp	Leu	Ala	Thr	Ile	Ala	Pro	Thr	Thr	Ala	His	Ala
			580					585					590		
Leu	Ala	Gly	Ala	Phe	Ala	Leu	Glu	Cys	Trp	Gly	Gly	Ala	Thr	Phe	Asp
		595					600					605			
Val	Ala	Met	Arg	Phe	Leu	His	Glu	Asp	Pro	Trp	Glu	Arg	Leu	Arg	Lys
	610					615					620				

Leu	Arg	Ser	Leu	Val	Pro	Asn	Ile	Pro	Phe	Gln	Met	Leu	Leu	Arg	Gly	625	630	635	640
Ala	Asn	Gly	Val	Ala	Tyr	Ser	Ser	Leu	Pro	Asp	Asn	Ala	Ile	Asp	His	645	650	655	
Phe	Val	Lys	Gln	Ala	Lys	Asp	Asn	Gly	Val	Asp	Ile	Phe	Arg	Val	Phe	660	665	670	
Asp	Ala	Leu	Asn	Asp	Leu	Glu	Gln	Leu	Lys	Val	Gly	Val	Asn	Ala	Val	675	680	685	
Lys	Lys	Ala	Gly	Gly	Val	Val	Glu	Ala	Thr	Val	Cys	Tyr	Ser	Gly	Asp	690	695	700	
Met	Leu	Gln	Pro	Gly	Lys	Lys	Tyr	Asn	Leu	Asp	Tyr	Tyr	Leu	Glu	Val	705	710	715	720
Val	Glu	Lys	Ile	Val	Gln	Met	Gly	Thr	His	Ile	Leu	Gly	Ile	Lys	Asp	725	730	735	
Met	Ala	Gly	Thr	Met	Lys	Pro	Ala	Ala	Ala	Lys	Leu	Leu	Ile	Gly	Ser	740	745	750	
Leu	Arg	Thr	Arg	Tyr	Pro	Asp	Leu	Pro	Ile	His	Val	His	Ser	His	Asp	755	760	765	
Ser	Ala	Gly	Thr	Ala	Val	Ala	Ser	Met	Thr	Ala	Cys	Ala	Leu	Ala	Gly	770	775	780	
Ala	Asp	Val	Val	Asp	Val	Ala	Ile	Asn	Ser	Met	Ser	Gly	Leu	Thr	Ser	785	790	795	800
Gln	Pro	Ser	Ile	Asn	Ala	Leu	Leu	Ala	Ser	Leu	Glu	Gly	Asn	Ile	Asp	805	810	815	
Thr	Gly	Ile	Asn	Val	Glu	His	Val	Arg	Glu	Leu	Asp	Ala	Tyr	Trp	Ala	820	825	830	
Glu	Met	Arg	Leu	Leu	Tyr	Ser	Cys	Phe	Glu	Ala	Asp	Leu	Lys	Gly	Pro	835	840	845	
Asp	Pro	Glu	Val	Tyr	Gln	His	Glu	Ile	Pro	Gly	Gly	Gln	Leu	Thr	Asn	850	855	860	
Leu	Leu	Phe	Gln	Ala	Gln	Gln	Leu	Gly	Leu	Gly	Glu	Gln	Trp	Ala	Glu	865	870	875	880
Thr	Lys	Arg	Ala	Tyr	Arg	Glu	Ala	Asn	Tyr	Leu	Leu	Gly	Asp	Ile	Val	885	890	895	
Lys	Val	Thr	Pro	Thr	Ser	Lys	Val	Val	Gly	Asp	Leu	Ala	Gln	Phe	Met	900	905	910	
Val	Ser	Asn	Lys	Leu	Thr	Ser	Asp	Asp	Ile	Arg	Arg	Leu	Ala	Asn	Ser	915	920	925	
Leu	Asp	Phe	Pro	Asp	Ser	Val	Met	Asp	Phe	Phe	Glu	Gly	Leu	Ile	Gly	930	935	940	
Gln	Pro	Tyr	Gly	Gly	Phe	Pro	Glu	Pro	Leu	Arg	Ser	Asp	Val	Leu	Arg	945	950	955	960
Asn	Lys	Arg	Arg	Lys	Leu	Thr	Cys	Arg	Pro	Gly	Leu	Glu	Leu	Glu	Pro	965	970	975	
Phe	Asp	Leu	Glu	Lys	Ile	Arg	Glu	Asp	Leu	Gln	Asn	Arg	Phe	Gly	Asp	980	985	990	
Ile	Asp	Glu	Cys	Asp	Val	Ala	Ser	Tyr	Asn	Met	Tyr	Pro	Arg	Val	Tyr	995	1000	1005	
Glu	Asp	Phe	Gln	Lys	Ile	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Asp	Leu	Ser	Val		1010	1015	1020	
Leu	Pro	Thr	Lys	Asn	Phe	Leu	Ala	Pro	Ala	Glu	Pro	Asp	Glu	Glu		1025	1030	1035	

Ile	Glu	Val	Thr	Ile	Glu	Gln	Gly	Lys	Thr	Leu	Ile	Ile	Lys	Leu
1040						1045					1050			
Gln	Ala	Val	Gly	Asp	Leu	Asn	Lys	Lys	Thr	Gly	Gln	Arg	Glu	Val
1055						1060					1065			
Tyr	Phe	Glu	Leu	Asn	Gly	Glu	Leu	Arg	Lys	Ile	Arg	Val	Ala	Asp
1070						1075					1080			
Lys	Ser	Gln	Asn	Ile	Gln	Ser	Val	Ala	Lys	Pro	Lys	Ala	Asp	Val
1085						1090					1095			
His	Asp	Thr	His	Gln	Ile	Gly	Ala	Pro	Met	Ala	Gly	Val	Ile	Ile
1100						1105					1110			
Glu	Val	Lys	Val	His	Lys	Gly	Ser	Leu	Val	Lys	Lys	Gly	Glu	Ser
1115						1120					1125			
Ile	Ala	Val	Leu	Ser	Ala	Met	Lys	Met	Glu	Met	Val	Val	Ser	Ser
1130						1135					1140			
Pro	Ala	Asp	Gly	Gln	Val	Lys	Asp	Val	Phe	Ile	Lys	Asp	Gly	Glu
1145						1150					1155			
Ser	Val	Asp	Ala	Ser	Asp	Leu	Leu	Val	Val	Leu	Glu	Glu	Glu	Thr
1160						1165					1170			
Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Lys	Lys								
1175						1180								

<210> 2
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> S. cerevisiae

<400> 2

Met	Val	Lys	Val	Ala	Ile	Leu	Gly	Ala	Ser	Gly	Gly	Val	Gly	Gln	Pro
1				5					10					15	
Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Lys	Leu	Ser	Pro	Tyr	Val	Ser	Glu	Leu	Ala	Leu
		20						25					30		
Tyr	Asp	Ile	Arg	Ala	Ala	Glu	Gly	Ile	Gly	Lys	Asp	Leu	Ser	His	Ile
	35					40						45			
Asn	Thr	Asn	Ser	Ser	Cys	Val	Gly	Tyr	Asp	Lys	Asp	Ser	Ile	Glu	Asn
50					55						60				
Thr	Leu	Ser	Asn	Ala	Gln	Val	Val	Leu	Ile	Pro	Ala	Gly	Val	Pro	Arg
65				70						75				80	
Lys	Pro	Gly	Leu	Thr	Arg	Asp	Asp	Leu	Phe	Lys	Met	Asn	Ala	Gly	Ile
			85					90						95	
Val	Lys	Ser	Leu	Val	Thr	Ala	Val	Gly	Lys	Phe	Ala	Pro	Asn	Ala	Arg
		100						105					110		
Ile	Leu	Val	Ile	Ser	Asn	Pro	Val	Asn	Ser	Leu	Val	Pro	Ile	Ala	Val
	115					120						125			
Glu	Thr	Leu	Lys	Lys	Met	Gly	Lys	Phe	Lys	Pro	Gly	Asn	Val	Met	Gly
130						135					140				
Val	Thr	Asn	Leu	Asp	Leu	Val	Arg	Ala	Glu	Thr	Phe	Leu	Val	Asp	Tyr
145				150						155				160	
Leu	Met	Leu	Lys	Asn	Pro	Lys	Ile	Gly	Gln	Glu	Gln	Asp	Lys	Thr	Thr
			165					170						175	
Met	His	Arg	Lys	Val	Thr	Val	Ile	Gly	Gly	His	Ser	Gly	Glu	Thr	Ile
			180					185					190		

Ile	Pro	Ile	Ile	Thr	Asp	Lys	Ser	Leu	Val	Phe	Gln	Leu	Asp	Lys	Gln
		195					200					205			
Tyr	Glu	His	Phe	Ile	His	Arg	Val	Gln	Phe	Gly	Gly	Asp	Glu	Ile	Val
	210					215					220				
Lys	Ala	Lys	Gln	Gly	Ala	Gly	Ser	Ala	Thr	Leu	Ser	Met	Ala	Phe	Ala
225					230					235					240
Gly	Ala	Lys	Phe	Ala	Glu	Glu	Val	Leu	Arg	Ser	Phe	His	Asn	Glu	Lys
				245					250					255	
Pro	Glu	Thr	Glu	Ser	Leu	Ser	Ala	Phe	Val	Tyr	Leu	Pro	Gly	Leu	Lys
			260					265					270		
Asn	Gly	Lys	Lys	Ala	Gln	Gln	Leu	Val	Gly	Asp	Asn	Ser	Ile	Glu	Tyr
		275					280					285			
Phe	Ser	Leu	Pro	Ile	Val	Leu	Arg	Asn	Gly	Ser	Val	Val	Ser	Ile	Asp
	290					295					300				
Thr	Ser	Val	Leu	Glu	Lys	Leu	Ser	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Leu	Val	Asn
305					310					315					320
Thr	Ala	Val	Lys	Glu	Leu	Arg	Lys	Asn	Ile	Glu	Lys	Gly	Lys	Ser	Phe
				325					330					335	
Ile	Leu	Asp	Ser												
			340												

<210> 3
 <211> 438
 <212> PRT
 <213> Schizosaccharomyces pombe

<400> 3

Met	Gly	Glu	Leu	Lys	Glu	Ile	Leu	Lys	Gln	Arg	Tyr	His	Glu	Leu	Leu
1				5					10					15	
Asp	Trp	Asn	Val	Lys	Ala	Pro	His	Val	Pro	Leu	Ser	Gln	Arg	Leu	Lys
			20					25					30		
His	Phe	Thr	Trp	Ser	Trp	Phe	Ala	Cys	Thr	Met	Ala	Thr	Gly	Gly	Val
		35				40						45			
Gly	Leu	Ile	Ile	Gly	Ser	Phe	Pro	Phe	Arg	Phe	Tyr	Gly	Leu	Asn	Thr
	50					55					60				
Ile	Gly	Lys	Ile	Val	Tyr	Ile	Leu	Gln	Ile	Phe	Leu	Phe	Ser	Leu	Phe
65					70					75					80
Gly	Ser	Cys	Met	Leu	Phe	Arg	Phe	Ile	Lys	Tyr	Pro	Ser	Thr	Ile	Lys
			85						90					95	
Asp	Ser	Trp	Asn	His	His	Leu	Glu	Lys	Leu	Phe	Ile	Ala	Thr	Cys	Leu
			100					105					110		
Leu	Ser	Ile	Ser	Thr	Phe	Ile	Asp	Met	Leu	Ala	Ile	Tyr	Ala	Tyr	Pro
		115					120					125			
Asp	Thr	Gly	Glu	Trp	Met	Val	Trp	Val	Ile	Arg	Ile	Leu	Tyr	Tyr	Ile
	130					135					140				
Tyr	Val	Ala	Val	Ser	Phe	Ile	Tyr	Cys	Val	Met	Ala	Phe	Phe	Thr	Ile
145					150					155					160
Phe	Asn	Asn	His	Val	Tyr	Thr	Ile	Glu	Thr	Ala	Ser	Pro	Ala	Trp	Ile
				165					170					175	
Leu	Pro	Ile	Phe	Pro	Pro	Met	Ile	Cys	Gly	Val	Ile	Ala	Gly	Ala	Val
			180					185						190	

Asn	Ser	Thr	Gln	Pro	Ala	His	Gln	Leu	Lys	Asn	Met	Val	Ile	Phe	Gly	
		195					200					205				
Ile	Leu	Phe	Gln	Gly	Leu	Gly	Phe	Trp	Val	Tyr	Leu	Leu	Leu	Phe	Ala	
	210					215					220					
Val	Asn	Val	Leu	Arg	Phe	Phe	Thr	Val	Gly	Leu	Ala	Lys	Pro	Gln	Asp	
225					230					235					240	
Arg	Pro	Gly	Met	Phe	Met	Phe	Val	Gly	Pro	Pro	Ala	Phe	Ser	Gly	Leu	
				245					250					255		
Ala	Leu	Ile	Asn	Ile	Ala	Arg	Gly	Ala	Met	Gly	Ser	Arg	Pro	Tyr	Ile	
			260					265					270			
Phe	Val	Gly	Ala	Asn	Ser	Ser	Glu	Tyr	Leu	Gly	Phe	Val	Ser	Thr	Phe	
		275					280					285				
Met	Ala	Ile	Phe	Ile	Trp	Gly	Leu	Ala	Ala	Trp	Cys	Tyr	Cys	Leu	Ala	
	290					295					300					
Met	Val	Ser	Phe	Leu	Ala	Gly	Phe	Phe	Thr	Arg	Ala	Pro	Leu	Lys	Phe	
305					310					315					320	
Ala	Cys	Gly	Trp	Phe	Ala	Phe	Ile	Phe	Pro	Asn	Val	Gly	Phe	Val	Asn	
				325					330					335		
Cys	Thr	Ile	Glu	Ile	Gly	Lys	Met	Ile	Asp	Ser	Lys	Ala	Phe	Gln	Met	
			340					345					350			
Phe	Gly	His	Ile	Ile	Gly	Val	Ile	Leu	Cys	Ile	Gln	Trp	Ile	Leu	Leu	
		355					360					365				
Met	Tyr	Leu	Met	Val	Arg	Ala	Phe	Leu	Val	Asn	Asp	Leu	Cys	Tyr	Pro	
	370					375					380					
Gly	Lys	Asp	Glu	Asp	Ala	His	Pro	Pro	Pro	Lys	Pro	Asn	Thr	Gly	Val	
385					390					395					400	
Leu	Asn	Pro	Thr	Phe	Pro	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Ala	Ser	Leu	Glu	Lys	
				405					410					415		
Val	Asp	Thr	His	Val	Thr	Ser	Thr	Gly	Gly	Glu	Ser	Asp	Pro	Pro	Ser	
			420					425					430			
Ser	Glu	His	Glu	Ser	Val											
			435													

<210> 4

<211> 4144

<212> DNA

<213> S. cerevisiae

<400> 4

tgcagctatt	tattataaga	gtcagaattg	ggcagggag	tgtaaagtaa	gaagtactcc	60
ccatcggata	tttcttattg	tgtttctgtg	atttttagtc	cttttttctt	ttctcttact	120
ttcggatatcc	ttacttgatt	acatacataa	acaagccct	cttttcttcc	aaactcttgt	180
agcttactat	ctgtggcccg	tcatttgagt	ttgatttttt	tgccaattac	tatattgcaa	240
aataaaggac	agttactagg	agagaaaata	agggacatag	agaacaaaat	aaaatatgag	300
cagtagcaag	aaattggccg	gtcttaggga	caatttcagt	ttgctcggcg	aaaagaataa	360
gatcttggtc	gccaatagag	gtgaaattcc	gattagaatt	tttagatctg	ctcatgagct	420
gtctatgaga	accatcgcca	tatactccca	tgaggaccgt	ctttcaatgc	acaggttgaa	480
ggcggacgaa	gcgtatgtta	tcggggagga	gggccagtat	acacctgtgg	gtgcttactt	540
ggcaatggac	gagatcatcg	aaattgcaaa	gaagcataag	gtggatttca	tccatccagg	600
ttatgggttc	ttgtctgaaa	attcgggaatt	tgccgacaaa	gtagtgaagg	ccggtatcac	660
ttggatcggc	cctccagctg	aagttattga	ctctgtgggt	gacaaagtct	ctgccagaca	720
cttggcagca	agagctaacg	ttcctaccgt	tcccgttact	ccaggacctt	tcgaaactgt	780

gcaagaggca	cttgacttcg	ttaatgaata	eggctacccg	gtgatcatta	aggccgcctt	840
tgggtgggt	ggtagaggta	tgagagtcgt	tagagaagg	gacgacgtgg	cagatgcctt	900
tcaacgtgct	acctccgaag	cccgtactgc	cttcggtaat	ggtacctgct	ttgtggaaag	960
attcttggac	aagccaaagc	atattgaagt	tcaattgttg	gctgataacc	acggaaacgt	1020
ggttcacctt	ttcgaaagag	actgttctgt	gcaaagaaga	cacaaaaaag	ttgtcgaagt	1080
cgctccagca	aagactttgc	cccgtgaagt	tcgtgacgct	attttgacag	atgctgttaa	1140
attagctaag	gtatgtgggt	acagaaacgc	aggtaccgcc	gaattcttgg	ttgacaacca	1200
aaacagacac	tatttcattg	aaattaatcc	aagaattcaa	gtggagcata	ccatcactga	1260
agaaatcacc	ggtattgaca	ttgtttctgc	ccaaatccag	attgccgcag	gtgccacttt	1320
gactcaacta	ggtctattac	aggataaaat	caccaccgcg	gggttttcca	tccaatgtcg	1380
tattaccact	gaagatccct	ctaagaatth	ccaaccggat	accggtcgcc	tggagggtcta	1440
tcgttctgcc	ggtggtaatg	gtgtgagatt	ggacgggtgg	aacgcttatg	caggtgctac	1500
tatctcgctt	cactacgact	caatgctggt	caaatgttca	tgctctgggt	ctacttatga	1560
aatcgctcgt	aggaagatga	ttcgtgccct	gatcgaattc	agaatcagag	gtgttaagac	1620
caacattccc	ttcctattga	ctcttttgac	caatccagtt	tttattgagg	gtacatactg	1680
gacgactttt	attgacgaca	ccccacaact	gttccaaatg	gtatcgtcac	aaaacagagc	1740
gcaaaaactg	ttacactatt	tggcagactt	ggcagttaac	ggttcttcta	ttaaggggtca	1800
aattggcttg	ccaaaactaa	aatcaaattc	aagtgtcccc	catttgcacg	atgctcaggg	1860
caatgtcatc	aacgttacaa	agtctgcacc	accatccgga	tggagacaag	tgctactgga	1920
aaagggacca	tctgaatttg	ccaagcaagt	cagacagttc	aatggtaact	tactgatgga	1980
caccacctgg	agagacgctc	atcaatctct	acttgcaaca	agagtcagaa	cccacgattt	2040
ggctacaatc	gctccaacaa	ccgcacatgc	ccttgccagg	gctttcgctt	tagaatgttg	2100
gggtgggtgct	acattcgacg	ttgcaatgag	attcttgcac	gaggatccat	gggaacgtct	2160
gagaaaatta	agatctctgg	tgccataatat	tccattccaa	atgttattac	gtgggtgccaa	2220
cggtgtggct	tactcttcat	tacctgacaa	tgctattgac	cattttgtca	agcaagccaa	2280
ggataatggt	gttgatatat	ttagagttht	tgatgccttg	aatgatttag	aacaattaaa	2340
agttgggtgtg	aatgctgtca	agaaggccgg	tggtgtgtgc	gaagctactg	tttgttactc	2400
tggtgacatg	cttcagccag	gtaagaaata	caacttagac	tactacctag	aagttgttga	2460
aaaaatagtt	caaatgggta	cacatatctt	gggtattaag	gatatggcag	gtactatgaa	2520
accggccgct	gccaaattat	taattggctc	cctaagaacc	agatatccgg	atthaccaat	2580
tcatgttcac	agtcacgact	ccgcagggtac	tgctgttgcg	tctatgactg	catgtgccct	2640
agcagggtgct	gatgttgctg	atgtagctat	caattcaatg	tcgggcttaa	cttcccaacc	2700
atcaattaat	gcactgttgg	cttcattaga	aggtaacatt	gatactggga	ttaacgttga	2760
gcatgttcgt	gaattagatg	catactgggc	cgaaatgaga	ctgttgattt	cttgtttcga	2820
ggccgacttg	aagggaccag	atccagaagt	ttaccaacat	gaaatcccag	gtgggtcaatt	2880
gactaacttg	ttattccaag	ctcaacaact	gggtcttggg	gaacaatggg	ctgaaactaa	2940
aagagcttac	agagaagcca	attacctact	gggagatatt	gttaaagtta	ccccacttc	3000
taaggttgct	ggtgatttag	ctcaattcat	ggtttctaac	aaactgactt	ccgacgatat	3060
tagacgttta	gctaattctt	tggactttcc	tgactctggt	atggactttt	ttgaagggtt	3120
aattgggtcaa	ccatacgggtg	ggttcccaga	accattaaga	tctgatgtat	tgagaaacaa	3180
gagaagaaag	ttgacgtgcc	gtccagggtt	agaattagaa	ccatttgatc	tcgaaaaaat	3240
tagagaagac	ttgcagaaca	gattcgggtga	tattgatgaa	tgcatgtttg	cttcttacaa	3300
tatgtatcca	aggggtctatg	aagatttcca	aaagatcaga	gaaacatacg	gtgattttatc	3360
agttctacca	acaaaaaatt	tctagcacc	agcagaacct	gatgaagaaa	tcgaagtcac	3420
catcgaacaa	ggtaagactt	tgattatcaa	attgcaagct	gttgggtgact	taaataagaa	3480
aactgggcaa	agagaagtgt	atthttgaatt	gaacgggtgaa	ttaagaaaga	tcagagtgtc	3540
agacaagtca	caaaacatac	aatctgttgc	taaaccaaaag	gctgatgtcc	acgatactca	3600
ccaaatcggt	gcaccaatgg	ctgggtgttat	catagaagtt	aaagtacata	aagggctctt	3660
ggtgaaaaag	ggcgaatcga	ttgctgtttt	gagtgccatg	aaaatggaaa	tgggtgtctc	3720
ttcaccagca	gatgggtcaag	ttaaagacgt	tttcattaag	gatgggtgaaa	gtgttgacgc	3780
atcagatttg	ttgggtgtcc	tagaagaaga	aacctaccc	ccatcccaaa	aaaagtaatt	3840
tttactcggt	aatttatatt	tatgacatct	gaaaatacta	gctgtactat	atatggcgta	3900
tatttttatct	agttatgttc	ccatgtatat	ttaaatgcca	aatagaaagt	aatcaaacac	3960

```

tttcgatgaa atacgtgcta actgtgtttc ttccttaatg ctttcaactta ccatgtctcc 4020
attctccatt ttcttcttga gtgaaaatgt gagtttataa cgctcaagta cgttaactac 4080
tctatttaat atcgtacggg atttttgac gactgtaggt tttcttctta gaccattcca 4140
gcgc 4144

```

```

<210> 5
<211> 1044
<212> DNA
<213> S. cerevisiae

```

```

<400> 5
gctctagaaa catggtcaaa gtcgcaattc ttggcgcttc tgggtggcgtg ggacaaccgc 60
tatcattact gctaaaatta agcccttacg tttccgagct ggcgttgtac gatatccgag 120
ctgcggaagg cattggtaag gatttatctc acatcaacac caactcaagt tgtgtcgggt 180
atgataagga tagtattgag aacacctgtt caaatgctca ggtggtgcta ataccggctg 240
gtgttcccag aaagcccggg ttaactagag atgatttggt caagatgaac gccggtattg 300
tcaaaagcct ggtaaccgct gttggaaagt tgcacccaaa tgcgaggatt ttagtcattt 360
caaaccctgt aaacagtttg gtccttattg ctgtggaaac tttgaagaaa atgggtaagt 420
tcaaaccctg aaacgttatg ggtgtgacga accttgacct ggtacgtgca gaaacctttt 480
tggtagatta tttgatgcta aaaaacccca aaattggaca agaacaagac aaaactacaa 540
tgcacagaaa gggtcactgtt attggggggtc attcagggga aaccattatc ccaataatca 600
ccgacaaatc gctggtatct caacttgata agcagtacga gcacttcatt catagggtcc 660
agttcggagg tgatgaaatt gtcaaagcta aacagggcgc cggttccgcc acgttgtcca 720
tggcgttcgc gggggccaag tttgctgaag aagttttgag gagcttccat aatgagaaac 780
cagaaacgga gtcactttcc gcattcgttt atttaccagg cttaaaaaac ggtaagaaag 840
cgcagcaatt agttggcgac aactctattg agtatttttc cttgccattt gttttgagaa 900
atggtagcgt agtatccatc gataccagtg ttctggaaaa actgtctccg agagaggaaac 960
aactcgtaa tactgcggtc aaagagctac gcaagaatat tgaaaaaggc aagagtttca 1020
tcctagaactc ttgagtcgac agct 1044

```

```

<210> 6
<211> 1336
<212> DNA
<213> Schizosaccharomyces pombe

```

```

<400> 6
gctctagaca tgggtgaact caaggaaatc ttgaaacaga ggtatcatga gttgcttgac 60
tggaatgtca aagcccctca tgtccctctc agtcaacgac tgaagcattt tacatgggtc 120
tgggttgcat gtactatggc aactggtggt gttgggttga ttattgggtc tttccccttt 180
cgattttatg gtcttaatac aattggcaaa attgtttata ttcttcaaat ctttttggtt 240
tctctctttg gatcatgcat gctttttcgc tttattaaat atccttcaac tatcaaggat 300
tcctggaacc atcatttgga aaagcttttc attgctactt gtcttctttc aatatccacg 360
ttcatcgaca tgcttgccat atacgcctat cctgataccg gcgagtggat ggtgtgggtc 420
attcgaatcc tttattacat ttacgttgca gtatccttta tatactgcgt aatggctttt 480
tttacaattt tcaacaacca tgtatatacc attgaaaccg catctcctgc ttggattctt 540
cctatttttc ctcctatgat ttgtggtgtc attgctggcg ccgtcaattc tacacaacc 600
gctcatcaat taaaaaatat ggttatcttt ggtatcctct ttcaaggact tgggtttttg 660
gtttatcttt tactgtttgc cgtcaatgtc ttacggtttt ttactgtagg cctggcaaaa 720
ccccagatc gacctggtat gtttatgttt gtcgggtccac cagctttctc aggtttggcc 780
ttaattaata ttgcgcgtgg tgctatgggc agtcgccctt atatttttgt tggcgccaac 840

```

tcacccgagt	atccttggttt	tgtttctacc	tttatggcta	tttttatttg	gggtcttgct	900
gcttggtgtt	actgtctcgc	catgggttagc	tttttagcgg	gctttttcac	tcgagccccct	960
ctcaagtttg	cttgtggatg	gtttgcattc	attttcccca	acgtggggttt	tgtaatttgt	1020
accattgaga	taggtaaaat	gatagattcc	aaagctttcc	aaatgtttgg	acatatcatt	1080
ggggtcattc	tttgtattca	gtggatcctc	ctaattgtatt	taatgggtccg	tgcgtttctc	1140
gtcaatgatc	tttgctatcc	tggcaaagac	gaagatgcc	atcctccacc	aaaaccaa	1200
acaggtgtcc	ttaaccctac	cttcccacct	gaaaaagcac	ctgcattctt	ggaaaaagtc	1260
gatacacatg	tcacatctac	tggtggtgaa	tcggatcctc	ctagtagtga	acatgaaagc	1320
gtttaagtcg	acgcgt					1336

REVINDICAÇÕES

1. Levedura recombinante, caracterizada pelo fato de a levedura ser a enzima piruvato decarboxilase (PDC0) de atividade negativa (PDC-negativa) e ser funcionalmente transformada com uma região codificadora codificando ou uma enzima piruvato carboxilase (PYC) onde a PYC seja ativa no citossol ou uma carboxilase de fosfoenolpiruvato (PEP) onde a carboxilase PEP seja insensível à inibição por malato, aspartato, e oxaloacetato, uma região codificadora codificando uma enzima malato desidrogenase (MDH) onde a MDH seja ativa no citossol e não seja inativada na presença de glicose; e uma região codificadora codificando uma proteína transportadora de ácido málico (MAE).
2. Levedura recombinante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de a levedura ser da espécie *Saccharomyces cerevisiae*.
3. Levedura recombinante, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de a levedura ser *S. cerevisiae* cepa TAM.
4. Levedura recombinante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de a PYC ser piruvato carboxilase de *S. cerevisiae*, a MDH ser MDH1 de *S. cerevisiae* ou MDH3 de *S. cerevisiae*, e a MAE ser SpMAE1 de *Schizosaccharomyces pombe*.
5. Levedura recombinante, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de a MDH ser direcionada ao citossol da levedura por modificação da região codificadora codificando a MDH relativamente à região codificadora codificando a MDH tipo selvagem.
6. Levedura recombinante, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de a PYC ter pelo menos 75% de identidade com a SEQ ID NO:1, a MDH tendo pelo menos 75% de identidade com a SEQ ID NO:2, e a MAE tendo pelo menos 75% de identidade com a SEQ ID NO:3.
7. Levedura recombinante, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de a PYC ter pelo menos 95% de

identidade com a SEQ ID NO:1, a MDH tendo pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO:2, e a MAE tendo pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO:3.

8. Levedura recombinante, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de a PYC ter a sequência mostrada em SEQ ID NO:1, a MDH tendo a sequência mostrada em SEQ ID NO:2, e a MAE tendo a sequência mostrada em SEQ ID NO:3.

9. Método para produzir ácido málico, caracterizado pelo fato de compreender:

cultivar uma levedura recombinante onde a levedura seja a enzima piruvato decarboxilase (PDC) de atividade negativa (PDC-negativa) e seja funcionalmente transformada com uma região codificadora codificando ou uma enzima piruvato carboxilase (PYC) onde a PYC seja ativa no citossol ou uma carboxilase de fosfoenolpiruvato (PEP) onde a carboxilase PEP seja insensível à inibição por malato, aspartato, e oxaloacetato, uma região codificadora codificando uma enzima malato desidrogenase (MDH) onde a MDH seja ativa no citossol e não seja inativada na presença de glicose, e uma região codificadora codificando uma proteína transportadora de ácido málico (MAE), em um meio compreendendo uma fonte de carbono e uma fonte de dióxido de carbono; e
isolar ácido málico ou ácido succínico do meio.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de a fonte de carbono ser glicose.

11. Método, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de a levedura ser da espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de a levedura ser *S. cerevisiae* cepa TAM.

13. Método, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de a levedura ser funcionalmente transformada com uma região codificadora codificando

piruvato carboxilase de *S. cerevisiae*, uma região codificadora codificando MDH1 de *S. cerevisiae* ou MDH3 de *S. cerevisiae*, e uma região codificadora codificando SpMAE1 de *Schizosaccharomyces pombe*.

- 5 14. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de a MDH ser direcionada para o citossol da levedura.
15. Método, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de ser funcionalmente
- 10 transformada com uma região codificadora codificando uma PYC tendo pelo menos 75% de identidade com a SEQ ID NO:1, uma região codificadora codificando uma MDH tendo pelo menos 75% de identidade com a SEQ ID NO:2, e uma região codificadora codificando uma MAE tendo pelo menos 75% de
- 15 identidade com a SEQ ID NO:3.
16. Método, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de ser funcionalmente transformada com uma região codificadora codificando uma PYC tendo pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO:1,
- 20 uma região codificadora codificando uma MDH tendo pelo menos 95% de identidade com a SEQ ID NO:2, e uma região codificadora codificando uma MAE tendo pelo menos 75% de identidade com a SEQ ID NO:3.
17. Levedura recombinante, de acordo com a reivindicação
- 25 16, caracterizado pelo fato de a PYC ter a sequência mostrada em SEQ ID NO:1, a MDH tendo a sequência mostrada em SEQ ID NO:2, e a MAE tendo a sequência mostrada em SEQ ID NO:3.
18. Método, de acordo com a reivindicação 9,
- 30 caracterizado pelo fato de compreender ainda isolar ácido succínico do meio.

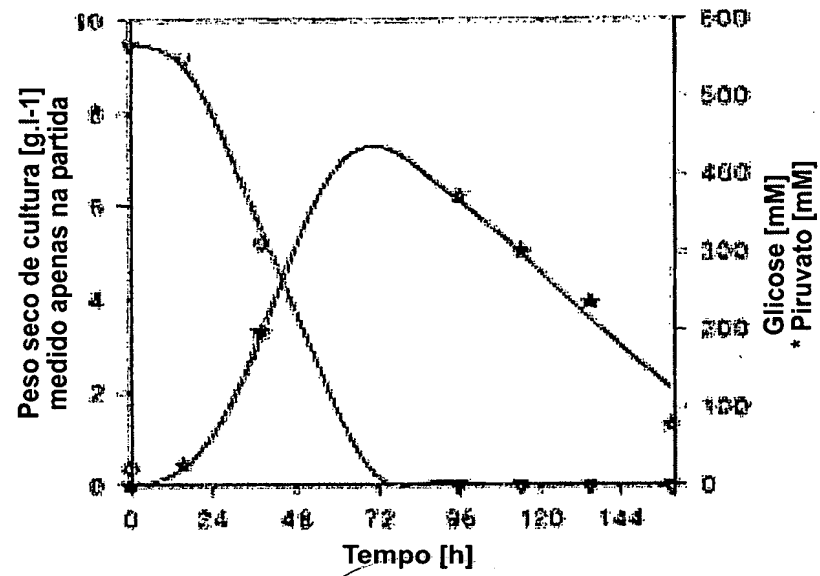


FIG.1

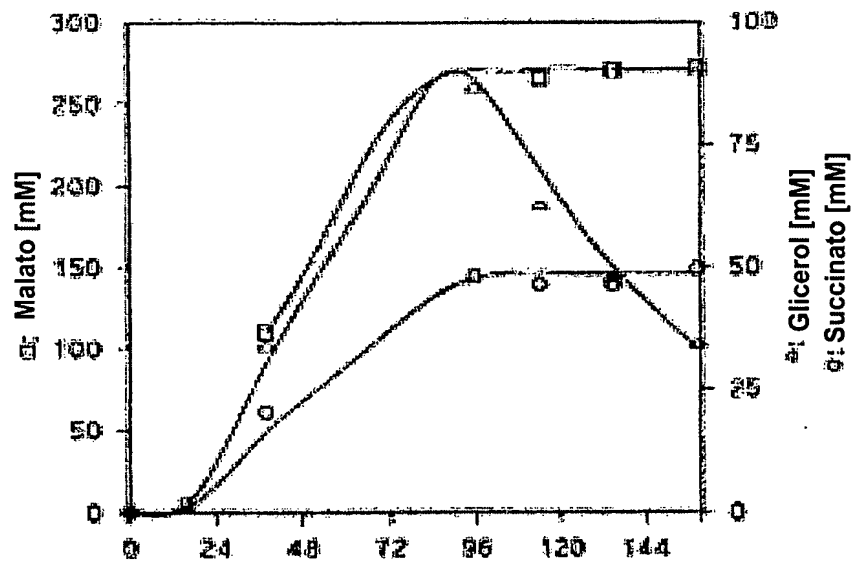


FIG.2

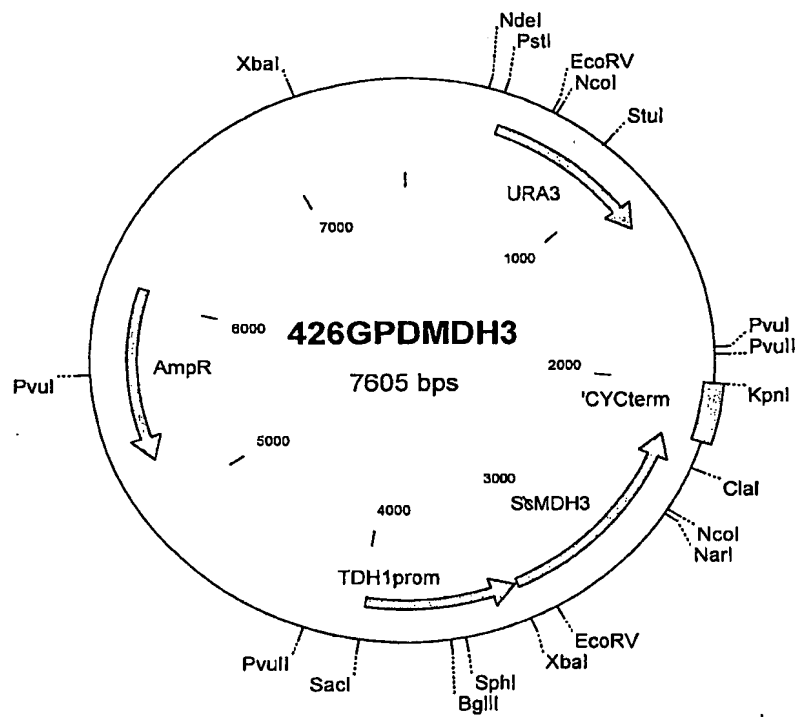


FIG.3

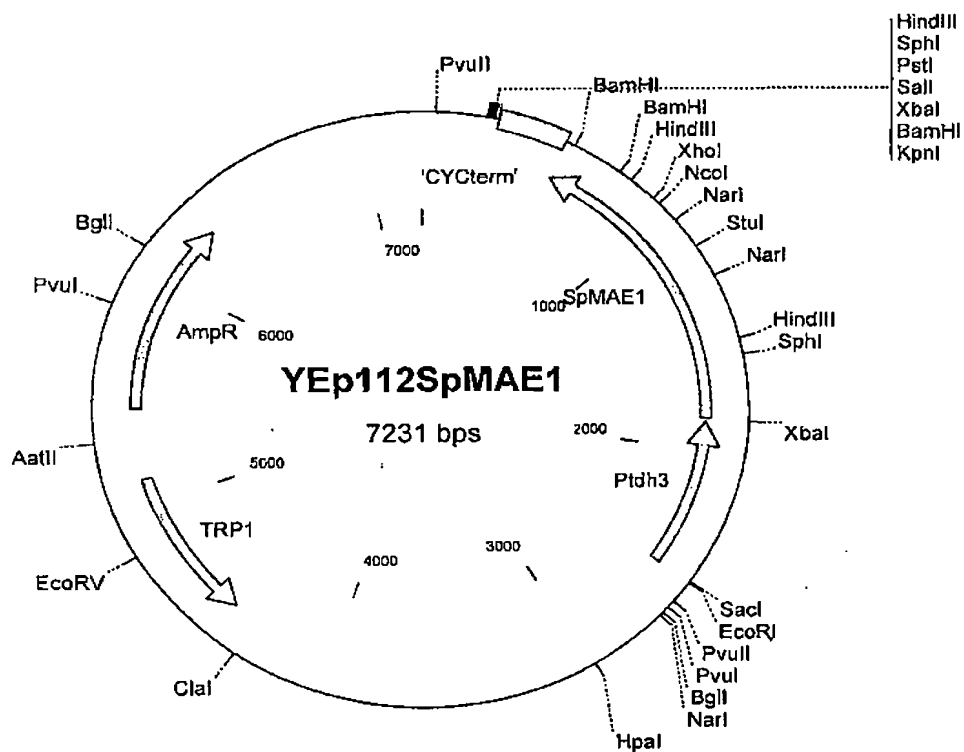


FIG.6

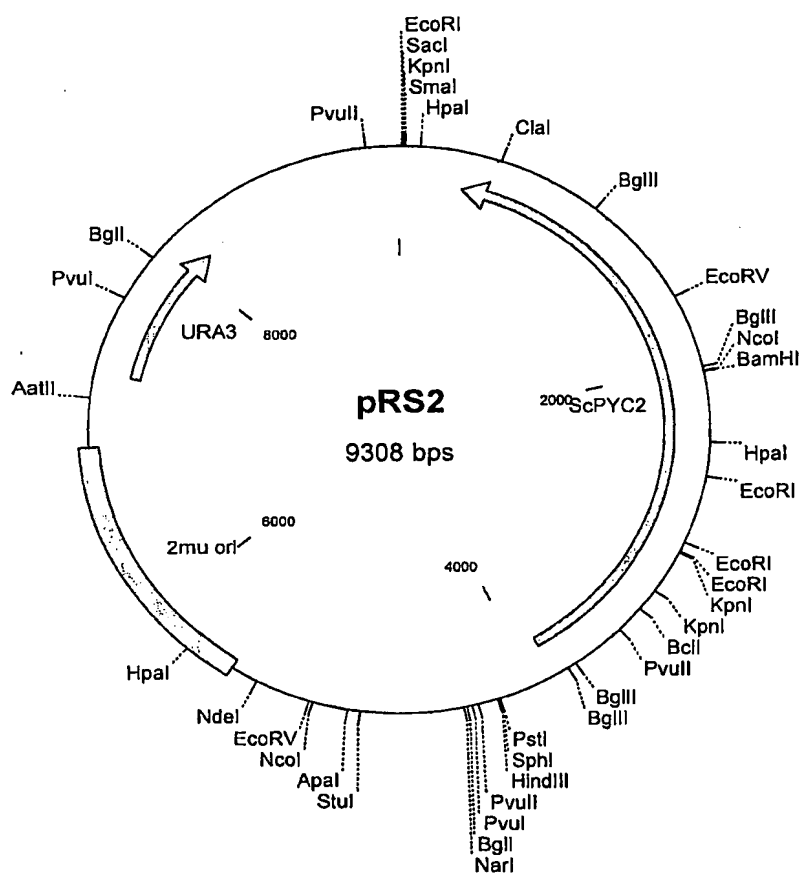


FIG.4

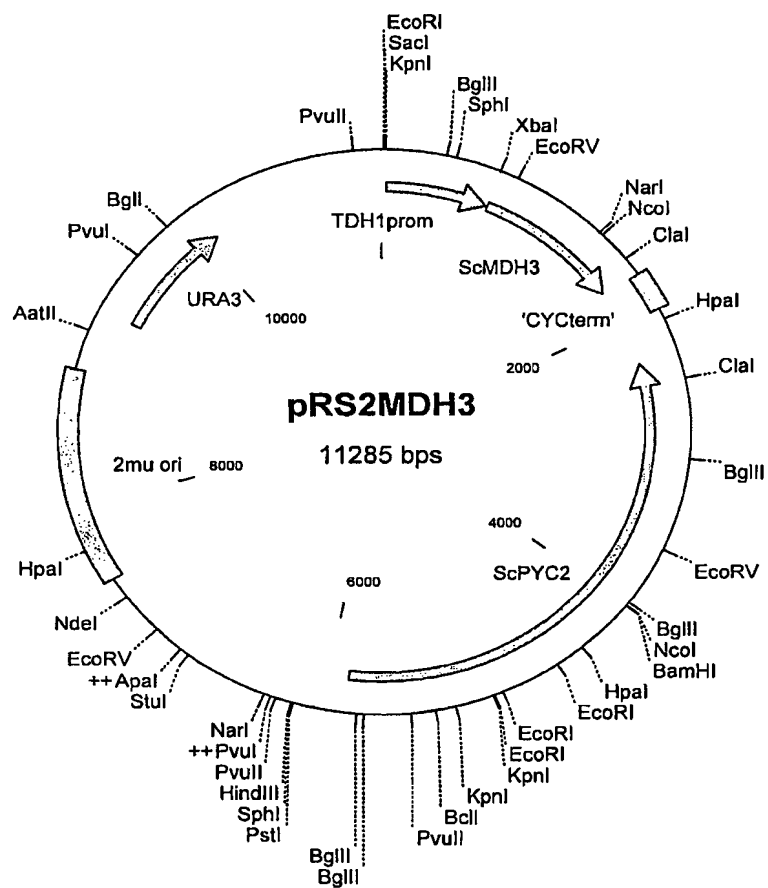


FIG.5

5/7

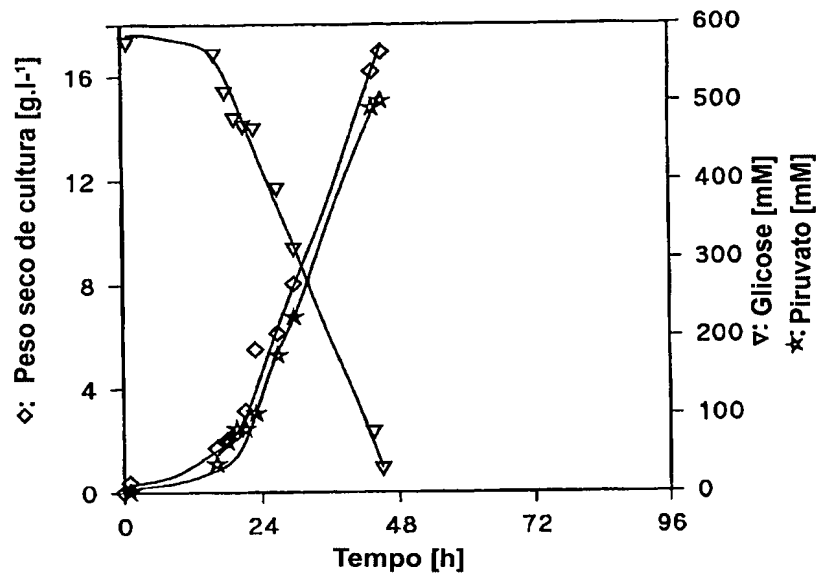


FIG.7

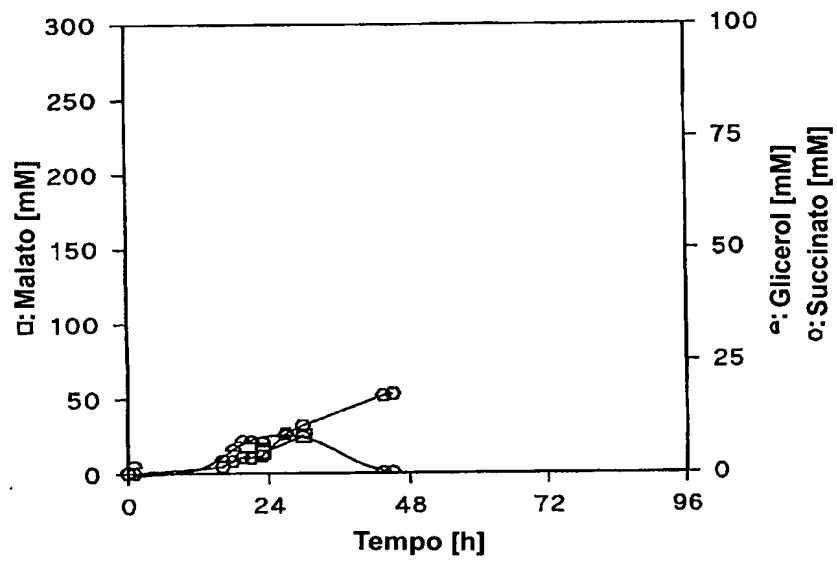


FIG.8

6/7

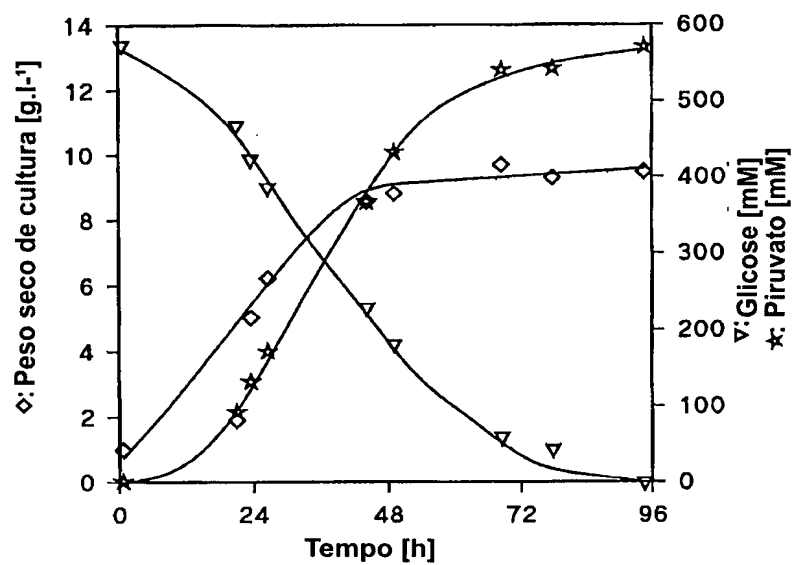


FIG.9

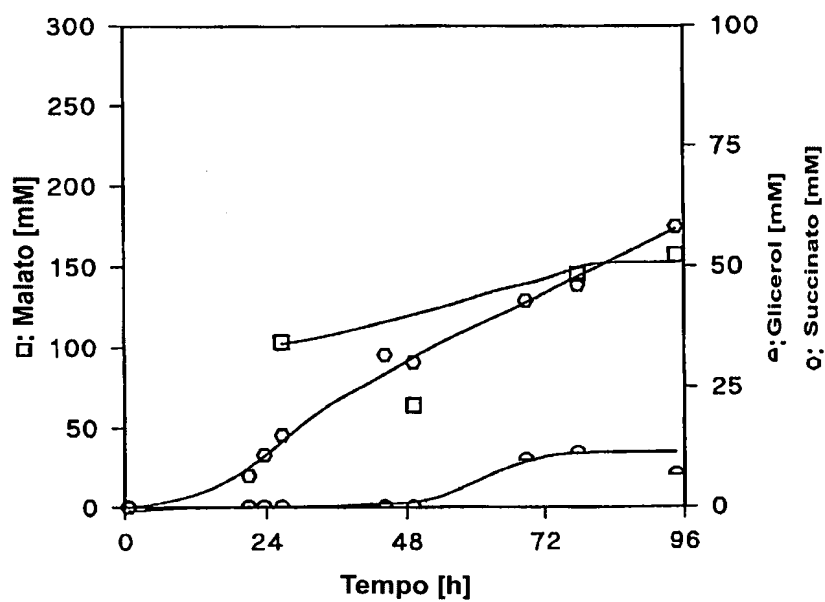


FIG.10

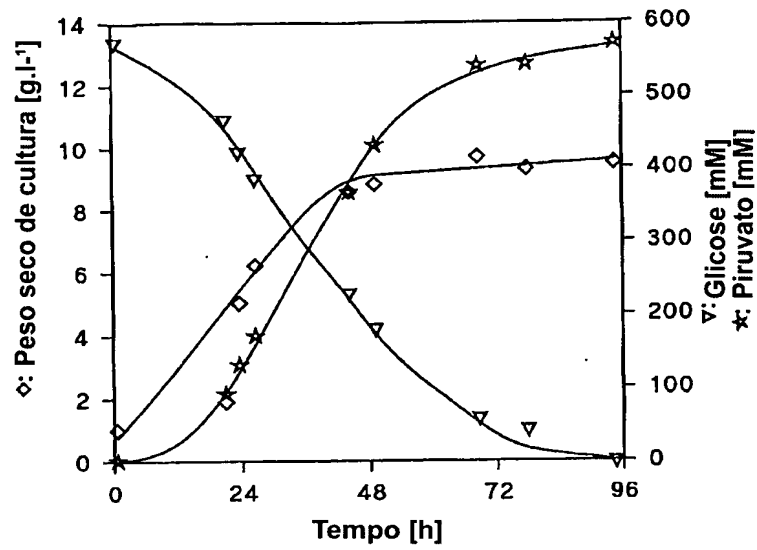


FIG.11

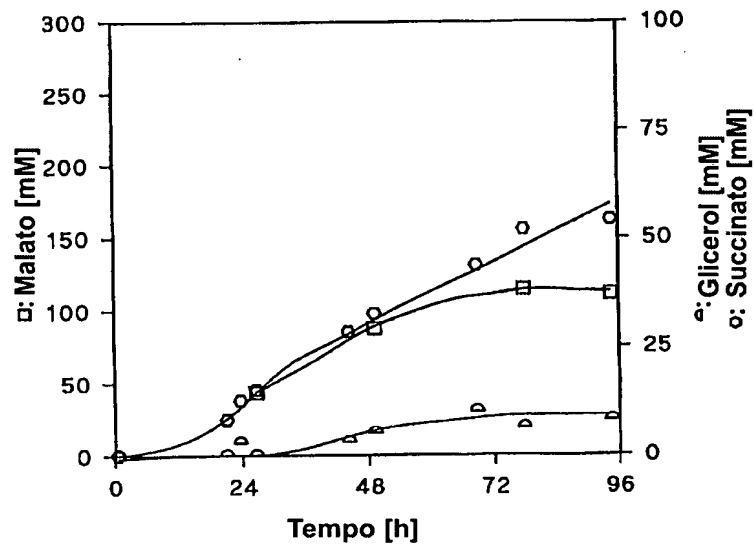


FIG.12

P1062051-2

RESUMO

"LEVEDURA RECOMBINANTE E MÉTODO PARA PRODUZIR ÁCIDO MÁLICO".

Divulgamos uma levedura recombinante onde a levedura é a
5 enzima piruvato decarboxilase (PDC0) de atividade
negativa (PDC-negativa) e é funcionalmente transformada
com uma região codificadora codificando ou uma enzima
piruvato carboxilase (PYC) onde a PYC seja ativa no
citossol ou uma fosfoenolpiruvato carboxilase (PEP) onde
10 a PEP carboxilase seja insensível à inibição por malato,
aspartato, e oxaloacetato, uma região codificadora
codificando uma enzima malato desidrogenase (MDH) onde a
MDH seja ativa no citossol e não seja inativada na
presença de glicose; e uma região codificadora
15 codificando uma proteína transportadora de ácido málico
(MAE). Também divulgamos um método para produzir ácido
málico cultivando tal levedura em um meio compreendendo
uma fonte de carbono e uma fonte de dióxido de carbono e
isolando o ácido málico do meio.