

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

(21) **PI0619091-0 A2**

(22) Data de Depósito: 01/12/2006
(43) Data da Publicação: 13/09/2011
(RPI 2123)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/38
C12P 7/48

(54) Título: NOVOS GENES ÚTEIS PARA A PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE ÁCIDO CÍTRICO

(30) Prioridade Unionista: 01/12/2005 EP 05026213.8, 01/12/2005 EP 05026219.5, 01/12/2005 EP 05026229.4, 01/12/2005 EP 05026230.2

(73) Titular(es): DSM IP Assests B.V.

(72) Inventor(es): Dominique Robert Groeseneken, Hugo Marc Karel Bauweleers, Noël Nicolaas Maria Elisabeth Van Peij

(74) Procurador(es): Orlando de Souza

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006069218 de 01/12/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/063133de 07/06/2007

(57) Resumo: NOVOS GENES ÚTEIS PARA A PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE ÁCIDO CÍTRICO. A presente invenção relaciona-se a genes recém identificados que codificam proteínas que são envolvidas na biossíntese de ácido cítrico. A invenção também apresenta polinucleotídeos que compreendem as seqüências de polinucleotídeos de comprimento total dos novos genes e fragmentos destas, os novos polipeptídeos codificados pelos polinucleotídeos e fragmentos destes, bem como seus equivalentes funcionais. A presente invenção também se relaciona ao uso dos referidos polinucleotídeos e polipeptídeos como ferramentas biotecnológicas na produção de ácido cítrico a partir de microorganismos, em que uma modificação dos referidos polinucleotídeos e/ou polipeptídeos codificados tem um impacto direto ou indireto sobre o rendimento, produção e/ou eficiência de produção do produto de fermentação no referido microorganismo. Também são iricluidos métodos/processos de uso dos polinucleotídeos e seqüências de polinucleotídeos modificadas para transformar microorganismos hospedeiros. A invenção também se relaciona a microorganismos geneticamente construídos e a seu uso para a produção de ácido cítrico.

NOVOS GENES ÚTEIS PARA A PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE ÁCIDO
CÍTRICO

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção relaciona-se a genes recém
5 identificados que codificam proteínas que são envolvidas na
biossíntese de ácido cítrico. A invenção também apresenta
polinucleotídeos que compreendem as seqüências de
polinucleotídeos de comprimento total dos novos genes e
fragmentos destas, os novos polipeptídeos codificados pelos
10 polinucleotídeos e fragmentos destes, bem como seus
equivalentes funcionais. A presente invenção também se
relaciona ao uso dos referidos polinucleotídeos e
polipeptídeos como ferramentas biotecnológicas na produção
de ácido cítrico a partir de microorganismos, em que uma
15 modificação dos referidos polinucleotídeos e/ou
polipeptídeos codificados tem um impacto direto ou indireto
sobre o rendimento, produção e/ou eficiência de produção do
produto de fermentação no referido microorganismo. Também
são incluídos métodos/processos de uso dos polinucleotídeos
20 e seqüências de polinucleotídeos modificadas para
transformar microorganismos hospedeiros. A invenção também
se relaciona a microorganismos geneticamente construídos e
a seu uso para a produção de ácido cítrico.

FUNDAMENTO DA INVENÇÃO

25 Ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-propano-1,2,3-
tricarboxílico) é conhecido como um ácido orgânico
industrialmente importante que é usado, por exemplo, como
aditivo alimentar, conservante ou como estabilizante de
óleos e gorduras devido à sua capacidade de formar complexo
30 de íons de metal pesado como cobre e ferro. Originalmente,

ele tem sido isolado de plantas cítricas. A síntese química de ácido cítrico é também possível, no entanto, não totalmente adequada para produção industrial devido aos materiais brutos caros e a um processo complicado com baixo rendimento.

Portanto, nas últimas décadas, outras abordagens para manufaturar ácido cítrico foram investigadas com o uso de conversões microbianas, que podem ser mais econômicas, bem como ecológicas.

A produção de ácido cítrico a partir de vários substratos que incluem glicose ou sacarose foi relatada em vários microorganismos, como fungos, incluindo leveduras, com o uso de diferentes métodos de cultivo. Exemplos de fungos conhecidos capazes de produzir diretamente ácido cítrico incluem, por exemplo, cepas do gênero de *Aspergillus*, em particular *A. niger*, ou leveduras como *Yarrowia*, em particular *Yarrowia lipolytica*.

A conversão de um substrato, por exemplo, carboidratos, em ácido cítrico pode envolver várias e diferentes vias metabólicas, e envolve várias etapas enzimáticas para gerar ácido cítrico. Além disso, transportadores também podem ter um importante papel na eficiente conversão de um substrato em ácido cítrico.

Proteínas, em particular transportadores, que são ativas no transporte de substâncias como carboidratos como, por exemplo, glicose ou álcoois de açúcar, carboxilatos, minerais, compostos tóxicos como oxigênio reativo, e compostos relacionados sobre uma membrana, são aqui referidas como estando envolvidas no Sistema de Transporte. Esse transporte pode ser no citosol, no interior/exterior

de uma mitocôndria, vacúolo, retículo endoplasmático, peroxissomo, ou por toda uma outra barreira de membrana. Tais proteínas são aqui abreviadas como proteínas TS e trabalham na síntese de ácido cítrico ou têm uma função no processo celular de síntese de ácido cítrico.

Proteínas TS são em geral ligadas à membrana ou são associadas a estruturas ligadas a membrana e são funcionais como proteínas únicas ou como subunidades em complexos de proteína como permeases ou transportadores ativos. Proteínas TS são conhecidas por serem responsáveis pela facilitação seletiva, ajudando ou permitindo o transporte de compostos como açúcares, álcoois de açúcar, carboxilatos, minerais, compostos tóxicos por todas as membranas celulares, periplasmática ou vacuolar mitocondrial, do retículo endoplasmático ou peroxissomal.

Proteínas TS podem ser divididas em vários tipos com base em seus mecanismos. A primeira classe de transportadores, também chamada canais de íon, usa energia da força de motora de próton para transportar moléculas contra um gradiente de concentração. Esses sistemas de *symport* e *antiport* ligam o movimento de duas diferentes moléculas por todas as membranas (via permeases que têm dois sítios de ligação separados para as duas diferentes moléculas); em *symport*, ambas moléculas são transportadas na mesma direção, enquanto, em *antiport*, uma molécula é importada enquanto a outra é exportada.

Uma classe adicional de transportadores, também chamada "transportadores secundários", o sistema de fosfotransferase (PTS), é energizada pela transferência de um grupo fosfato de alta energia de fosfoenolpiruvato,

através de vários componentes de proteína, para o substrato que é fosforilado após *import* como sua forma de fosfoéster. Transportadores de íon desse grupo facilitam a difusão pela membrana, como, por exemplo, a família de facilitador de difusão de cátion (CDF) ou ânions de troca como, por exemplo, a família de troca de ânions (AE). O grupo da superfamília principal de facilitador (MFS) contém vários transportadores de açúcar importantes.

Uma classe adicional de transportadores liga a hidrólise de ATP à translocação de substrato. Esses sistemas são denominados os transportadores de tipo de cassete de ligação de ATP (ABC). O sistema de transporte de ABC consiste em uma proteína de ligação específica a substrato que está localizada no periplasma em bactérias gram-negativas ou que é associada à membrana em bactérias gram-positivas, um domínio de membrana integral e um domínio de hidrólise de ATP de face citoplasmática.

Uma descrição mais detalhada de sistemas de transporte de membrana pode ser encontrada em: Bamberg, E. e cols. (1993) "Charge transport of ion pumps on lipid bilayer membranes", Q. Rev. Biophys. 26:1-25; Findlay, J.B.C. (1991) "Structure and função de membrane transport systems", Curr. Opin. Struct. Biol. 1:804-810; Higgins, C.F. (1992) "ABC transporters from microorganism to man" Ann. Rev. Cell Biol. 8:67-113; Gennis, R.B. (1989) "Pores, channels and transporters" em: Biomembranes, Molecular Structure and Function, Springer, Heidelberg, p. 270-322; Nikaido, H. & Saier H. (1992) "Transport proteins in bacteria: common themes in their design" Science 258:936-942.

Preferivelmente, as proteínas TS ou subunidades de tais proteínas que têm atividade ou que estão envolvidas na síntese de ácido cítrico a partir de um carboidrato são selecionadas do grupo que consiste em transportadores de hexose, transportadores de íon, quinases, permeases, *symporters*, *antiporters*, carreadores de mitocôndria como proteínas de transporte de citrato ou carreadores de tricarboxilato, supressores para histonas mitocondriais e transportadores de metal como transportadores de manganês ou proteína de resistência a manganês ou transportadores de ferro.

Proteínas, em particular enzimas, que estão envolvidas na síntese de citrato como enzimas que fazem parte na TCA, como, por exemplo, enzimas que catalisam a condensação de acetil-CoA com oxaloacetato para formar ácido cítrico, são aqui referidas como estando envolvidas no sistema de síntese de citrato e abreviadas como proteínas CS que trabalham na síntese de ácido cítrico.

Preferivelmente, as proteínas CS ou subunidades de tais proteínas que têm atividade ou que estão envolvidas na síntese de citrato são selecionadas do grupo que consiste em sintases de citrato, sintases de citrato glioissomais, aconitases, aconitato hidratases ou hidrolilases, e 6-fosfofrutoquinases.

Proteínas, em particular, enzimas que estão envolvidas em reações laterais como, por exemplo, superóxido dismutase mitocondrial Mn-dependente (MnSOD), genes que estão envolvidos nas chamadas "vias de by-pass" da via de síntese de ácido cítrico como, por exemplo, oxaloacetato hidrolases, glicose oxidase e/ou ácido glicolato (oxido-

)redutases, podem ter influência no processo celular de síntese de ácido cítrico. Tais enzimas são aqui abreviadas como proteínas BS ou enzimas BS.

A produção de ácido cítrico com o uso de cepas de *Aspergillus* foi relatada previamente (veja, por exemplo, Karaffa e Kubicek, Appl Microbiol Biotechnol, 61:169-196, 2003). No entanto, os rendimentos e/ou produtividade da produção de ácido cítrico como conhecida na técnica prévia ainda podem ser melhorados, o que é um objetivo da presente invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1: mapa de plasmídeo do vetor de substituição de gene BS08 pGB DEL-SODA.

Esse plasmídeo é usado para o rompimento do gene BS08. Indicadas são as regiões de flanqueamento 5' BS08 (mostrada como 5' *sodA*) e as regiões de flanqueamento 3' BS08 (mostrada como 3' *sodA*) em relação ao marcador *amdS*. As seqüências dos fragmentos BS08 3' sobrepõem pelo menos umas centenas em seqüência. O DNA de *E. coli* foi removido por digestão com enzimas de restrição BstBI e XmaI, antes da transformação das cepas de *A. niger*.

Figura 2: representação esquemática de deleção do gene BS08.

Uma construção de DNA linear de pGBDEL-SODA, que compreende o marcador de seleção *amdS* flanqueada por regiões homólogas (5' e 3') do gene BS08 (1), se integra através de recombinação homóloga dupla (X) no locus genômico BS08 (2) e substitui a cópia de gene genômico BS08 (3). Subseqüentemente, a recombinação nas repetições diretas (U) remove o marcador *amdS*, resultando em excisão

precisa do gene BS08 (4).

Figura 3: mapa de plasmídeo de vetor de expressão pGBFIN-23.

Esse é um exemplo de um vetor de expressão com base em pGBFIN, como pGBFIN-23. São indicadas as regiões de flaqueamento glaA em relação ao promotor glaA e sítio de clonagem HindIII-XhoI para um gene de interesse. O DNA de *E. coli* pode ser removido por digestão com enzima de restrição NotI, antes da transformação das cepas de *A. niger*.

Figura 4: mapa de plasmídeo de vetor de expressão pGBTOPGLA-1.

Esse é um exemplo de um vetor de expressão com base em pGBTOP. É indicado o mapa de plasmídeo de pGBTOPGLA-1, que é um vetor de expressão integrativo que contém um promotor em associação de operação com uma seqüência codificadora de um gene de interesse.

Figura 5: mapa de plasmídeo de vetor de superexpressão pGBFINMNR-1.

Esse plasmídeo compreende o gene TS08, que é mostrado como mnrl. São indicadas as regiões de flaqueamento glaA em relação ao promotor glaA e a inserção que codifica a proteína de resistência a manganês da invenção no sítio de clonagem HindIII-XhoI. O DNA de *E. coli* pode ser removido por digestão com enzima de restrição NotI, antes da transformação das cepas de *A. niger*.

Figura 6: Performance de cepas de superexpressão em fermentação de superfície.

São indicadas as cepas da Tabela 2, fermentadas como descrito no Exemplo 4. A performance das várias cepas é

mostrada como o rendimento da produção de ácido cítrico comparada ao rendimento da cepa WT3, que foi ajustado a 100%.

Figura 7: Performance de cepas de superexpressão em uma base rompida BS08 em fermentação de superfície.

São indicadas as cepas da Tabela 2, fermentadas como descrito no Exemplo 4. A performance das várias cepas é mostrada como o rendimento da produção de ácido cítrico comparada ao rendimento da cepa WT3, que foi ajustado a 100%.

Figura 8: Performance de cepas de superexpressão em fermentação submersa. São indicadas as cepas da Tabela 2, fermentadas como descrito no Exemplo 5. A performance das várias cepas é mostrada como o rendimento da produção de ácido cítrico comparada ao rendimento da cepa WT3, que foi ajustado a 100%.

Figura 9: Performance de cepas de superexpressão em uma base rompida BS08 em fermentação submersa.

São indicadas as cepas da Tabela 2, fermentadas como descrito no Exemplo 5. São indicadas as cepas da Tabela 2, fermentadas como descrito no Exemplo 5. A performance das várias cepas é mostrada como o rendimento da produção de ácido cítrico comparada ao rendimento da cepa WT3, que foi ajustado a 100%.

25 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

De modo surpreendente, constatou-se agora que as proteínas codificadas por polinucleotídeos que têm uma seqüência de nucleotídeos que hibridiza preferivelmente sob condições de alto rigor a seqüências de nucleotídeos de 30 TS08, TS09, CS07 e BS08 selecionadas do grupo de Id. de

Seq. N°s: 1, 6, 11 e 16, respectivamente, têm um importante papel na produção biotecnológica de ácido cítrico. Também foi constatado que, por alteração genética do nível de expressão de nucleotídeos de acordo com a invenção em um

5 microorganismo, como, por exemplo, *Aspergillus*, a eficiência da referida produção de ácido cítrico no referido microorganismo pode ser ainda muito melhorada, levando, por exemplo, a maior produção e/ou rendimento de ácido cítrico.

10 Conseqüentemente, a invenção relaciona-se a um polinucleotídeo TS08, TS09, CS07 e/ou BS08 selecionado do grupo que consiste em:

(a) polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo TS08, TS09, CS07 ou BS08 que compreende uma seqüência de

15 aminoácidos selecionada do grupo de Id. de Seq. N°s: 2, 7, 12 e 17, respectivamente;

(b) polinucleotídeos que compreendem a seqüência de nucleotídeos selecionada do grupo de Id. de Seq. N°s: 1, 6, 11 e 16;

20 (c) polinucleotídeos que compreendem uma seqüência de nucleotídeos obtenível por amplificação de ácido nucléico como reação em cadeia de polimerase, com o uso de DNA genômico de um microorganismo como um modelo e um conjunto de iniciador selecionado do grupo de Id. de Seq. N°: 3 e

25 Id. de Seq. N°: 4, Id. de Seq. N°: 8 e Id. de Seq. N°: 9, Id. de Seq. N°: 13 e Id. de Seq. N°: 14, ou Id. de Seq. N°: 18 e Id. de Seq. N°: 19, respectivamente;

(d) polinucleotídeos que compreendem uma seqüência de nucleotídeos que codifica um fragmento ou derivado de um

30 polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo de qualquer

um de (a) a (c), em que no referido derivado um ou mais resíduos de aminoácido são substituídos de modo conservador comparados ao referido polipeptídeo, e o referido fragmento ou derivado tem a atividade de um polipeptídeo TS08, TS09,
5 CS07 ou BS08;

(e) polinucleotídeos cujo filamento complementar hibridiza sob condições rigorosas a um polinucleotídeo como definido em qualquer um de (a) a (d) e que codifica um polipeptídeo TS08, TS09, CS07 ou BS08;

10 (f) polinucleotídeos que são pelo menos 70%, como 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%, homólogos a um polinucleotídeo como definido em qualquer um de (a) a (d) e que codifica um polipeptídeo TS08, TS09, CS07 ou BS08, ou

15 o filamento complementar de tal polinucleotídeo.

Em uma modalidade preferida da invenção, a invenção relaciona-se a um polinucleotídeo TS08 e/ou TS09 que é selecionado do grupo que consiste em:

(a) polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo
20 TS08 ou TS09 que compreende uma seqüência de aminoácidos de acordo com Id. de Seq. N°: 2 ou Id. de Seq. N°: 7, respectivamente;

(b) polinucleotídeos que compreendem uma seqüência de nucleotídeos de acordo com Id. de Seq. N°: 1 ou Id. de Seq.
25 N°: 6;

(c) polinucleotídeos que compreendem uma seqüência de nucleotídeos obtenível por amplificação de ácido nucléico como reação em cadeia de polimerase, com o uso de DNA genômico de um microorganismo como um modelo e um conjunto
30 de iniciador de acordo com Id. de Seq. N°: 3 e Id. de Seq.

Nº: 4, ou Id. de Seq. Nº: 8 e Id. de Seq. Nº: 9, respectivamente;

(d) polinucleotídeos que compreendem uma seqüência de nucleotídeos que codifica um fragmento ou derivado de um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo de qualquer um de (a) a (c), em que no referido derivado um ou mais resíduos de aminoácido são substituídos de maneira conservadora comparados ao referido polipeptídeo, e o fragmento ou derivado tem a atividade de um polipeptídeo TS08 ou TS09;

(e) polinucleotídeos cujo filamento complementar hibridiza sob condições rigorosas a um polinucleotídeo como definido em qualquer um de (a) a (d) e que codifica um polipeptídeo TS08 ou TS09;

(f) polinucleotídeos que são pelo menos 70%, como 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%, homólogos a um polinucleotídeo como definido em qualquer um de (a) a (d) e que codifica um polipeptídeo TS08 ou TS09 ou o filamento complementar de tal polinucleotídeo.

As proteínas TS, CS e BS como isoladas de *Aspergillus niger* CBS 513.88 mostradas em Id. de Seq. Nºs: 2, 7, 12 e 17 e aqui descritas são proteínas TS particularmente úteis, uma vez que elas realizam uma função crucial na produção de ácido cítrico em microorganismos, em particular, em fungos, como *Aspergillus*. Portanto, a invenção relaciona-se a um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo selecionado do grupo de Id. de Seq. Nºs: 2, 7, 12 e 17. A proteína pode ser codificada por uma seqüência de nucleotídeos selecionada do grupo de Id. de Seq. Nºs: 1, 6, 11 e 16, respectivamente. A invenção também se relaciona, portanto,

a polinucleotídeos que compreendem a seqüência de nucleotídeos selecionada do grupo de Id. de Seq. N°s: 1, 6, 11 e 16. Os cDNA correspondentes são mostrados em Id. de Seq. N°s: 5, 10, 15 e 20, respectivamente.

5 As seqüências de aminoácidos e de nucleotídeos acima determinadas foram usadas como uma "seqüência query" para realizar uma pesquisa com programa Blast2 (versão 2 ou BLAST de "National Center for Biotechnology" [NCBI] contra o banco de dados PRO SW-SwissProt (liberação total mais
10 atualizações incrementais). A partir das pesquisas, o polinucleotídeo TS08 de acordo com Id. de Seq. N°:1 foi anotado como codificando uma proteína que tem atividade de proteína 1 de resistência a manganês. O polinucleotídeo TS09 de acordo com Id. de Seq. N°:6 foi detalhado como
15 codificando uma proteína que tem atividade de transporte para ferro e manganês. O polinucleotídeo CS07 de acordo com Id. de Seq. N°:11 foi detalhado como codificando uma proteína que tem atividade de citrato sintase. A melhoria da produção de ácido cítrico pode ser esperada a partir da
20 expressão aumentada de um gene CS e/ou TS e atividade aumentada ou melhorada de um polipeptídeo TS e/ou CS.

O polinucleotídeo BS08 de acordo com Id. de Seq. N°: 16 foi detalhado como codificando uma proteína que tem atividade de superóxido dismutase mitocondrial MnSOD. A
25 melhoria da produção de ácido cítrico pode ser esperada a partir da infra-regulação/rompimento do gene MnSOD, que codifica a superóxido dismutase mitocondrial dependente de manganês. O rompimento de MnSOD deve causar uma falha da degradação dos radicais de íon de superóxido formados. O
30 "dano" causado pelo superóxido às proteínas, lipídeos e

ácidos nucleicos pode explicar vários efeitos pleiotrópicos de deficiência de Mn em *A. niger* gerando um acúmulo de ácido cítrico.

Um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo TS08, TS09, CS07 ou BS08 de acordo com e Id. de Seq. N°s: 2, 7, 12 e 17, respectivamente, pode ser obtido por amplificação de ácido nucleico com o uso de cDNA, mRNA ou, alternativamente, DNA genômico, como um modelo, e iniciadores de oligonucleotídeo adequados como os conjuntos de iniciador de nucleotídeo de acordo com Id. de Seq. N°:3 e Id. de Seq. N°:4, Id. de Seq. N°:8 e Id. de Seq. N°:9, Id. de Seq. N°:13 e Id. de Seq. N°:14, Id. de Seq. N°:18 e Id. de Seq. N°:19, respectivamente, de acordo com técnicas padrão de amplificação por PCR. Preferivelmente, um conjunto de iniciador de acordo com Id. de Seq. N°:3 e Id. de Seq. N°: 4, ou Id. de Seq. N°:8 e Id. de Seq. N°:9 é utilizado para obter um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo TS, preferivelmente um polipeptídeo TS08 ou TS09 de acordo com Id. de Seq. N°s: 2 e 7, respectivamente. O ácido nucleico assim amplificado pode ser clonado em um vetor adequado e caracterizado por análise de seqüência de DNA. Adicionalmente, o ácido nucleico pode ser obtido através de construção sintética do ácido nucleico.

Um panorama de Id. de Seq. N°s de DNA, polipeptídeos, seqüências codificadoras e iniciadores de nucleotídeos da presente invenção é apresentado na Tabela 1. Os termos "polinucleotídeo" e "ácido nucleico" como aqui usados devem descrever um DNA ou uma seqüência codificadora. Conseqüentemente, por exemplo, o termo "um polinucleotídeo TS08", dentre outros, engloba um DNA de TS08 de acordo com

Id. de Seq. N°: 1 e uma seqüência codificadora de TS08 de acordo com Id. de Seq. N°: 5, mas não um iniciador adiante/reverso de TS08 de acordo com Id. de Seq. N°s: 3 e 4. Da mesma forma, os termos "polipeptídeo" ou "proteína" como aqui usados devem descrever uma proteína ou seqüência de polipeptídeos. Conseqüentemente, por exemplo, o termo "um polipeptídeo TS08", entre outros, engloba um polipeptídeo TS08 de acordo com Id. de Seq. N°: 2.

	TS08	TS09	CS07	SB 08
DNA	Id. de Seq. N°: 1	Id. de Seq. N°: 6	Id. de Seq. N°: 11	Id. de Seq. N°: 16
Polipeptídeo	Id. de Seq. N°: 2	Id. de Seq. N°: 7	Id. de Seq. N°: 12	Id. de Seq. N°: 17
Iniciador adiante	Id. de Seq. N°: 3	Id. de Seq. N°: 8	Id. de Seq. N°: 13	Id. de Seq. N°: 18
Iniciador Reverso	Id. de Seq. N°: 4	Id. de Seq. N°: 9	Id. de Seq. N°: 14	Id. de Seq. N°: 19
Seqüência codificadora	Id. de Seq. N°: 5	Id. de Seq. N°: 10	Id. de Seq. N°: 15	Id. de Seq. N°: 20

10 Tabela 1. Panorama de Id. de Seq. Nos. do DNA, polipeptídeos, seqüências codificadoras e iniciadores de nucleotídeos da presente invenção.

O termo "gene" como aqui usado refere-se a um polinucleotídeo que pode ser isolado de DNA cromossômico.

Conseqüentemente, por exemplo, o termo "um gene TS08", entre outros, engloba um polinucleotídeo TS08 de acordo com Id. de Seq. N°: 1.

O modelo para a reação pode ser cDNA obtido por transcrição reversa de mRNA preparado a partir de cepas conhecidas ou suspeitas de compreender um polinucleotídeo de acordo com a invenção. O produto de PCR pode ser subclonado e seqüenciado para assegurar que as seqüências amplificadas representem as seqüências de uma nova seqüência de ácido nucléico como aqui descrito, ou um equivalente funcional desta.

O fragmento de PCR pode ser então usado para isolar um clone de cDNA de comprimento total por uma variedade de métodos conhecidos. Por exemplo, o fragmento amplificado pode ser rotulado e usado para rastrear uma biblioteca de bacteriófago ou cDNA de cosmídeo. Alternativamente, o fragmento rotulado pode ser usado para rastrear uma biblioteca genômica.

Portanto, a invenção relaciona-se a polinucleotídeos que compreendem uma seqüência de nucleotídeos obtenível por amplificação de ácido nucléico como reação em cadeia de polimerase, com o uso de DNA genômico de um microorganismo como um modelo e um conjunto de iniciador selecionados do grupo de Id. de Seq. N°:3 e Id. de Seq. N°:4, Id. de Seq. N°:8 e Id. de Seq. N°:9, Id. de Seq. N°:13 e Id. de Seq. N°:14, Id. de Seq. N°:18 e Id. de Seq. N°:19, respectivamente. Preferivelmente, um conjunto de iniciador de acordo com Id. de Seq. N°:3 e Id. de Seq. N°:4, ou Id. de Seq. N°:8 e Id. de Seq. N°:9 é utilizado para respectivamente obter um polinucleotídeo TS08 ou TS09 da

invenção.

A invenção também se relaciona a polinucleotídeos que compreendem uma seqüência de nucleotídeos que codifica um fragmento ou derivado de um polipeptídeo CS07, BS08, TS08
5 ou TS09 aqui codificado no referido derivado, um ou mais resíduos de aminoácido são substituídos de maneira conservadora comparados ao referido polipeptídeo, e o referido fragmento ou derivado tem a atividade de um polipeptídeo TS, CS ou BS, preferivelmente um polipeptídeo
10 CS07, BS08, TS08 ou TS09.

A invenção também se relaciona a polinucleotídeos cujo filamento complementar hibridiza sob condições rigorosas a um polinucleotídeo como aqui definido e que codifica um polipeptídeo TS, CS ou BS, preferivelmente um polipeptídeo
15 CS07, BS08, TS08 ou TS09.

A invenção também se relaciona a polinucleotídeos que são pelo menos 70% homólogos a um polinucleotídeo como aqui definido e que codificam um polipeptídeo CS07, BS08, TS08 ou TS09; e a invenção também se relaciona a
20 polinucleotídeos, sendo o filamento complementar de um polinucleotídeo como aqui definido acima.

A invenção também se relaciona a iniciadores, marcadores e fragmentos que podem ser usados para amplificar ou detectar um polinucleotídeo TS, CS e/ou BS de
25 acordo com a invenção e para identificar espécies relacionadas ou famílias de microorganismos que também portam tais genes.

A presente invenção também se relaciona a vetores que incluem polinucleotídeos da invenção. Portanto, a presente
30 invenção relaciona-se a vetores que compreendem um

polinucleotídeo TS08, TS09, CS07 e/ou BS08, preferivelmente um polinucleotídeo TS08 e/ou a TS09 da presente invenção e vetores que contêm um polinucleotídeo TS08, TS09, CS07 e/ou BS08, preferivelmente um polinucleotídeo TS08 e/ou a TS09 da invenção em que o referido polinucleotídeo é operacionalmente ligado a seqüências de controle de expressão permitindo a expressão em células procarióticas e eucarióticas.

A invenção também se relaciona a um microorganismo que é geneticamente construído com os polinucleotídeos TS08, TS09 e/ou CS07 da invenção e/ou com os vetores acima descritos. Esses microorganismos construídos são designados: microorganismos TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07 e TS08/TS09/CS07. Em uma outra modalidade, os microorganismos anteriormente mencionados são adicionalmente geneticamente construídos com um polinucleotídeo que compreende um polinucleotídeo para rompimento ou infra-regulação de um polinucleotídeo BS08. Esses microorganismos construídos podem ser designados: microorganismos TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, TS08/TS09/CS07, deltaBS08-TS08, deltaBS08-TS09, deltaBS08-CS07, deltaBS08-TS08/TS09, deltaBS08-TS08/CS07, deltaBS08-TS09/CS07, e deltaBS08-TS08/TS09/CS07.

Em uma outra modalidade nos microorganismos anteriormente mencionados, a produção ou atividade reduzida de um polipeptídeo BS08 é obtida por modificação ou inativação de uma seqüência de ácidos nucléicos presente na célula necessária para expressão do polinucleotídeo BS08.

A invenção também se relaciona aos microorganismos geneticamente construídos TS08, TS09, CS07, TS08/TS09,

TS08/CS07, TS09/CS07, TS08/TS09/CS07, deltaBS08-TS08,
deltaBS08-TS09, deltaBS08-CS07, deltaBS08-TS08/TS09,
deltaBS08-TS08/CS07, deltaBS08-TS09/CS07, e deltaBS08-
TS08/TS09/CS07, em que a produção ou atividade
5 opcionalmente reduzida de um polipeptídeo BS08 é obtida por
modificação ou inativação de uma seqüência de ácidos
nucléicos presente na célula necessária para expressão do
polinucleotídeo BS08, os referidos microorganismos capazes
de produzir ácido cítrico a partir de sacarose em
10 quantidades de 100 g/l ou mais.

A invenção também se relaciona a processos para a
produção de microorganismos capazes de expressar um
polipeptídeo codificado pelo polinucleotídeo acima definido
e um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo como
15 acima definido. Conseqüentemente, a invenção relaciona-se a
um processo para a produção de células capazes de expressar
um polipeptídeo TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07,
TS09/CS07, ou a TS08/TS09/CS07 que compreende a etapa de
construção genética de células com um polinucleotídeo TS08,
20 TS09 e/ou CS07 da invenção ou um vetor que compreende um
polinucleotídeo TS08, TS09 e/ou CS07 da invenção.
Preferivelmente, o processo compreende a construção
genética de células com um polinucleotídeo que codifica um
polipeptídeo TS08, TS09 e/ou CS07, cujo polinucleotídeo
25 pode ser compreendido em um vetor.

Em uma outra modalidade, o processo para produzir as
células capazes de expressar um polipeptídeo TS08, TS09,
CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou um polipeptídeo
TS08/TS09/CS07 acima descrito, adicionalmente compreende a
30 construção genética das células com um polinucleotídeo que

compreende um polinucleotídeo para rompimento ou infra-regulação de um polinucleotídeo BS08.

A invenção também se relaciona ao uso dos polinucleotídeos TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, 5 TS09/CS07, ou TS08/TS09/CS07 acima definidos, para a produção de ácido cítrico a partir de um carboidrato.

Em modalidade preferida, o uso dos polinucleotídeos TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou TS08/TS09/CS07 para a produção de ácido cítrico como aqui 10 descrito é combinado com o uso de um polinucleotídeo que compreende um polinucleotídeo para rompimento ou infra-regulação de um polinucleotídeo BS08.

Em uma outra modalidade, o polinucleotídeo TS08, TS09 ou CS07 é operacionalmente ligado a seqüências de controle 15 de expressão e transferido para um microorganismo. Mais preferivelmente, as seqüências de controle de expressão compreendem uma seqüência de regulação e/ou promotora, e/ou terminadora, em que pelo menos uma dessas seqüências é alterada de tal modo que ela leva a um melhor rendimento e/ou eficiência de produção de ácido cítrico a partir de um 20 carboidrato produzido pelo referido microorganismo. Ainda mais preferivelmente, as referidas seqüências de controle de expressão são alteradas de tal modo que elas levam a atividade aumentada e/ou melhorada do polipeptídeo TS08, 25 TS09 e/ou CS07 codificador respectivo.

Preferivelmente, o carboidrato usado para a produção de ácido cítrico é preferivelmente um carboidrato selecionado do grupo que consiste em glicose, frutose, sacarose, melado, amido, milho, mandioca e poliálcoois.

30 A invenção também se relaciona a microorganismos em

que a atividade de um polipeptídeo TS e/ou CS, preferivelmente um polipeptídeo TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou TS08/TS09/CS07, como os polipeptídeos de acordo com Id. de Seq. N°s: 2, 7 e 12
5 respectivamente, é aumentada ou melhorada de modo que o rendimento de ácido cítrico que é produzido a partir de um carboidrato é aumentado. Preferivelmente, o rendimento de ácido cítrico produzido por um microorganismo que compreende um polipeptídeo com atividade aumentada e/ou
10 melhorada como acima descrito é aumentado em pelo menos 1%, 2%, 3% 4%, 8%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 100%, 200%, 500% ou mais comparado à quantidade de ácido cítrico produzida pelo microorganismo parental. Isso pode ser realizado, por exemplo, por transferência de um
15 polinucleotídeo de acordo com a invenção em um microorganismo recombinante ou não recombinante que pode ou não conter um equivalente endógeno de um gene de CS07, BS08, TS08 e/ou TS09.

A invenção também se relaciona a microorganismos em
20 que a atividade de um polipeptídeo TS e/ou CS, preferivelmente um polipeptídeo TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou TS08/TS09/CS07, como os polipeptídeos de acordo com Id. de Seq. N°s: 2, 7 e 12 respectivamente, é aumentada ou melhorada e a atividade de
25 uma proteína BS08, como o polipeptídeo de acordo com Id. de Seq. N°: 17, é diminuída ou abolida de modo que o rendimento de ácido cítrico que é produzido a partir de um carboidrato é aumentado. Preferivelmente, o rendimento de ácido cítrico produzido por um microorganismo que
30 compreende um polipeptídeo com atividade aumentada e/ou

melhorada como acima descrito é aumentado em pelo menos 1%, 2%, 3%, 4%, 8%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 100%, 200%, 500% ou mais comparado à quantidade de ácido cítrico produzida pelo microorganismo parental.

5 Portanto, a invenção relaciona-se a um processo para a produção de um gene endógeno aperfeiçoado de TS08, TS09 ou TS08/TS09 em um microorganismo, o referido microorganismo compreendendo um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo TS08 ou TS09 como o polipeptídeo TS08 ou TS09
10 de acordo com Id. de Seq. N°s: 2 e 7, respectivamente, o referido processo compreendendo a etapa de alteração do referido polinucleotídeo em um tal modo que ela leve a um melhor rendimento e/ou eficiência de produção de ácido cítrico produzido a partir de um carboidrato pelo referido
15 microorganismo.

 Em uma outra modalidade, adicionalmente no microorganismo com gene endógeno melhorado de TS08, TS09 ou TS08/TS09 acima descrito, um gene de CS07 é melhorado por alteração de um polinucleotídeo que compreende um
20 polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo CS07, como o polipeptídeo CS07 de acordo com Id. de Seq. N°: 12, contido no referido microorganismo.

 Ainda em uma outra modalidade, adicionalmente no microorganismo com melhor TS08, TS09, CS07, TS08/TS09,
25 TS08/CS07, TS09/CS07, ou TS08/TS09/CS07 acima descrito, um gene endógeno BS08 é rompido e/ou infra-regulado por alteração de um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo BS08 como o polipeptídeo de acordo com Id. de Seq. N°: 17, contido no referido microorganismo.

30 Ainda em uma outra modalidade, adicionalmente no

microorganismo com melhor TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou TS08/TS09/CS07, ou com melhor TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou TS08/TS09/CS07, combinado com um gene de BS08 rompido ou
5 infra-regulado, a expressão reduzida de um gene endógeno de BS08 é obtida por modificação ou inativação de uma seqüência de polinucleotídeos, preferivelmente uma seqüência de controle, necessária para a expressão do gene de BS08.

10 Ainda em uma outra modalidade, a invenção relaciona-se a um processo para a produção de um polipeptídeo TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou a TS08/TS09/CS07 em um microorganismo, que compreende a etapa de alteração do referido microorganismo de modo que o
15 microorganismo produza o referido polipeptídeo com atividade de TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou a TS08/TS09/CS07 aumentada e/ou melhorada, opcionalmente combinado com atividade de BS08 diminuída ou abolida que leva a um melhor rendimento e/ou eficiência de
20 produção de ácido cítrico produzido a partir de um carboidrato pelo referido microorganismo.

Ainda em uma outra modalidade, a invenção relaciona-se a um processo para a produção de um microorganismo capaz de produzir ácido cítrico, que compreende a etapa de alteração
25 do referido microorganismo de modo que o microorganismo produza um polipeptídeo com atividade de TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou TS08/TS09/CS07 aumentada e/ou melhorada, opcionalmente combinada com atividade de BS08 diminuída ou abolida, levando a um melhor
30 rendimento e/ou eficiência de produção de ácido cítrico

produzido a partir de um carboidrato pelo referido microorganismo.

Ainda em uma outra modalidade, a invenção relaciona-se a um processo para a produção de um microorganismo que contém pelo menos um gene endógeno que compreende um polinucleotídeo da invenção, preferivelmente um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo TS08, TS09 ou CS07, que compreende a etapa de alteração do referido microorganismo de modo que o pelo menos um gene endógeno seja superexpresso, levando a um melhor rendimento e/ou eficiência de ácido cítrico produzido a partir de um carboidrato pelo referido microorganismo.

Em uma modalidade preferida, o processo adicionalmente compreende a etapa de alteração do microorganismo de modo que um gene endógeno que compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo BS08 seja infra-regulado ou rompido.

A pessoa habilitada saberá como melhorar e/ou aumentar a atividade de uma proteína TS e/ou CS, preferivelmente uma proteína TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou TS08/TS09/CS07. Isso pode ser realizado, por exemplo, por modificação genética do organismo hospedeiro de tal forma que ele produza mais cópias ou cópias mais estáveis da proteína TS e/ou CS, preferivelmente a proteína TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou TS08/TS09/CS07, que o organismo de tipo selvagem ou por aumento da atividade específica da proteína TS e/ou CS, preferivelmente a proteína TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou TS08/TS09/CS07.

A pessoa habilitada entenderá que tanto técnicas

recombinantes quanto genéticas clássicas podem ser usadas para mutar, modificar, melhorar ou superexpressar um gene TS e/ou CS para resultar em expressão aumentada e/ou melhor atividade do gene ou dos genes múltiplos.

5 Da mesma forma, a pessoa habilitada saberá como reduzir ou abolir a atividade de uma proteína BS, preferivelmente uma proteína BS08. Isso pode ser realizado, por exemplo, por modificação genética do organismo hospedeiro de tal modo que ele produza menos ou nenhuma
10 cópia da proteína BS, preferivelmente a proteína BS08, que o organismo de tipo selvagem, ou diminuindo ou abolindo a atividade específica da proteína BS, preferivelmente a proteína BS08. Da mesma forma, a pessoa habilitada compreenderá que tanto técnicas recombinantes quanto
15 genéticas clássicas podem ser usadas para diminuir ou abolir a atividade específica de uma proteína BS. Além disso, a pessoa habilitada compreenderá que tanto técnicas recombinantes quanto genéticas clássicas podem ser usadas para mutar, romper, deletar, modificar ou inativar um gene,
20 preferivelmente um gene de BS08 para resultar em expressão diminuída de um gene ou genes múltiplos.

Adicionalmente, um microorganismo que compreende combinações de vários genes supra-regulados e infra-regulados, como pode ser obtido por combinações de técnicas
25 de mutagênese recombinantes e clássicas. Por exemplo, superexpressão de um polinucleotídeo TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou TS08/TS09/CS07 pode ser realizada por métodos recombinantes; subseqüentemente, um polinucleotídeo endógeno BS08 pode ser infra-regulado com o
30 uso de mutagênese clássica. De acordo com um outro exemplo,

o polinucleotídeo endógeno BS08 pode ser infra-regulado ou rompido por mutagênese clássica, seguida por superexpressão recombinante de um polinucleotídeo TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou TS08/TS09/CS07. Outras 5 combinações de técnicas clássicas e recombinantes também são previstas pela atual invenção.

Na descrição a seguir, são detalhados procedimentos para tingir o aumento no rendimento e/ou produção de ácido cítrico que é produzido a partir de um carboidrato por 10 aumento da atividade de uma proteína TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou a TS08/TS09/CS07. Esses procedimentos se aplicam com as mudanças necessárias a outras proteínas TS e/ou CS.

Modificações para que o organismo produza mais cópias 15 dos genes e/ou proteína TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07 ou TS08/TS09/CS07 podem incluir o uso de um promotor forte, ou a mutação (por exemplo, inserção, deleção ou mutação em ponto) do (partes do) gene de TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07 ou 20 TS08/TS09/CS07 ou de seus elementos reguladores. Elas também podem envolver a inserção de múltiplas cópias do gene em um microorganismo adequado. Um aumento na atividade específica de uma proteína TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07 ou TS08/TS09/CS07 também pode ser 25 atingido por métodos conhecidos na técnica. Tais métodos podem incluir a mutação (por exemplo, inserção, deleção ou mutação em ponto) de (partes do) gene de TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou TS08/TS09/CS07.

Exemplos de um agente de mutagênese físico ou químico 30 adequado para a mutagênese clássica incluem radiação gama

ou ultravioleta (UV), hidroxilamina, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), O-metil hidroxilamina, ácido nitroso, etil metano sulfonato (EMS), bissulfito de sódio, ácido fórmico, e análogos de nucleotídeo. Quando tais
5 agentes são usados, a mutagênese é tipicamente realizada por incubação da célula parente para ser mutagenizada na presença do agente de mutagênese de escolha sob condições adequadas, e seleção por células mutantes que exibem expressão reduzida do gene.

10 Também são conhecidos na técnica métodos de aumento da atividade de uma dada proteína por contato da proteína TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07 ou TS08/TS09/CS07 com intensificadores específicos ou outras substâncias que interagem especificamente com a proteína
15 TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07 ou TS08/TS09/CS07. Para identificar tais intensificadores específicos, a proteína TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07 ou TS08/TS09/CS07 pode ser expressa e testada para atividade na presença de compostos suspeitos
20 de melhorar a atividade da proteína respectiva TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07 ou TS08/TS09/CS07. A atividade da proteína TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07 ou TS08/TS09/CS07 também pode ser aumentada por estabilização de RNA mensageiro que codifica
25 a proteína TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07 ou TS08/TS09/CS07, respectivamente. Tais métodos são também conhecidos na técnica; veja, por exemplo, em Sambrook e cols., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N. Y.; e Ausubel e cols.
30 (eds.), 1995, Current Protocols in Molecular Biology, (John

Wiley & Sons, N.Y.).

Na descrição a seguir, são detalhados procedimentos para atingir o aumento no rendimento e/ou produção de ácido cítrico que é produzido a partir de um carboidrato por
5 redução ou eliminação da atividade de uma proteína BS08. Esses procedimentos se aplicam com as mudanças necessárias a outras proteínas BS.

Modificações para que o organismo produza menos ou nenhuma cópia do gene BS08 e/ou proteína podem incluir o
10 uso de um promotor fraco, ou a mutação (por exemplo, inserção, deleção ou mutação em ponto) do (partes do) gene de BS08 ou de seus elementos reguladores. A diminuição ou eliminação da atividade específica de uma proteína BS08 pode também ser realizada por métodos conhecidos na
15 técnica. Tais métodos podem incluir a mutação (por exemplo, inserção, deleção ou mutação em ponto) do (partes do) gene de BS08.

Também são conhecidos na técnica métodos de redução ou eliminação da atividade de uma dada proteína por contato da
20 proteína BS08 com inibidores específicos ou outras substâncias que interagem especificamente com a proteína BS08. Para identificar tais inibidores específicos, a proteína BS08 pode ser expressa e testada para atividade na presença de compostos suspeitos de inibir a atividade da
25 proteína BS08. Compostos de inibição potenciais podem ser, por exemplo, anticorpos monoclonais ou policlonais contra a proteína BS08. Tais anticorpos podem ser obtidos por protocolos rotineiros de imunização de animais de laboratório adequados.

30 A invenção pode ser realizada em qualquer

microorganismo que porte um gene de TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, TS08/TS09/CS07, TS08/BS08, TS09/BS08, CS07/BS08, TS08/TS09/BS08, TS08/CS07/BS08, TS09/CS07/BS08 ou TS08/TS09/CS07/BS08 ou homólogo destes.

5 Microorganismos adequados podem ser selecionados de fungos, em particular, fungos filamentosos, ou levedura como cepas de tipo selvagem, cepas mutantes derivadas por mutagênese clássica, e métodos de seleção ou como cepas recombinantes. "Fungos filamentosos" incluem todas as formas filamentosas

10 da subdivisão Eumycota e Oomycota (como definido por Hawksworth e cols., 1995, supra). Exemplos de tais microorganismos incluem, sem limitação, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*,

15 *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolyposcladium*, e *Trichoderma*. Microorganismos preferidos da invenção são selecionados do grupo de fungos filamentosos, preferivelmente de *Aspergillus*, mais

20 preferivelmente de *A. niger*, *A. awamori*, *A. aculeatus*, *A. japonicus*, *A. oryzae*, *A. vadensis*, *A. carbonarius*, *A. tubingensis*, *A. lacticoffeatus*, *A. brasiliensis*, *A. piperis* *A. costaricaensis* ou *A. foetidus*, ainda mais preferivelmente *A. foetidus* variante *acidus* ou *A. foetidus*

25 variante *pallidus*, ainda mais preferivelmente de *A. niger* variante *awamori*, ainda mais preferivelmente de *A. niger* ATCC1015 e mais preferivelmente de *A. niger* CBS 513.88. Um microorganismo como os da presente invenção pode carregar modificações adicionais no nível de DNA ou de proteína

30 (veja acima), desde que tal modificação tenha um impacto

direto sobre o rendimento, produção e/ou eficiência da produção de ácido cítrico. Como tal, um microorganismo da presente invenção pode carregar modificações adicionais que resultam em melhor produtividade de ácido cítrico por uma
5 combinação de mutagênese clássica e biologia molecular. Tais modificações adicionais podem afetar, por exemplo, outros genes que codificam proteínas TS como, por exemplo, transportadores de íon ou açúcar, genes de BS que estão envolvidos nas chamadas "vias de by-pass" como, por
10 exemplo, oxaloacetato hidrolases, glicose oxidase e/ou glicolato (oxido-)redutases, genes de CS que codificam proteínas que estão envolvidas na biossíntese de citrato como, por exemplo, sintases de citrato, aconitases, genes que codificam proteínas que estão envolvidas no sistema
15 respiratório como, por exemplo, NADH de bombemaneot de próton:ubiquinona redutase ou oxidases mitocondriais, 6-fosfofrutoquinase pfkA, ou mutações nas enzimas respiratórias dependentes de citocromo ou via respiratória alternativa. Métodos de realizar tais modificações são
20 conhecidos na técnica, com alguns exemplos também aqui descritos.

Em uma modalidade, a presente invenção é relacionada a um microorganismo modificado em que a atividade de um polipeptídeo TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07,
25 TS09/CS07 ou TS08/TS09/CS07 é aumentada ou melhorada e opcionalmente, a atividade de uma proteína BS, preferivelmente uma proteína BS08, é diminuída ou abolida de modo que o rendimento de ácido cítrico que é produzido a partir de um carboidrato é aumentado combinado com uma
30 modificação adicional como acima definido, em particular,

portanto uma deficiência adicional no gene que codifica oxaloacetato hidrolase, como descrito, por exemplo, em WO 04/070022, útil para a produção de ácido cítrico.

De acordo com um objetivo adicional da presente
5 invenção, é fornecido o uso de um polinucleotídeo como acima definido ou um microorganismo que é geneticamente construído com o uso de tais polinucleotídeos na produção de ácido cítrico.

A invenção também se relaciona a processos para a
10 expressão de genes endógenos em um microorganismo, a processos para a produção de polipeptídeos como acima definido em um microorganismo, e a processos para a produção de microorganismos capazes de produzir ácido cítrico. Todos esses processos podem compreender a etapa de
15 alteração de um microorganismo, em que "alteração", como aqui usado, engloba o processo para "alterar geneticamente" ou "alterar a composição do meio de cultura de células e/ou métodos usados para cultura", de tal modo que o rendimento e/ou produtividade do produto da fermentação possa ser
20 melhorado comparado ao organismo de tipo selvagem.

De acordo com ainda um outro aspecto da invenção, é fornecido um processo para a produção de ácido cítrico por fermentação. Portanto, é fornecido um processo para a produção de ácido cítrico a partir de um carboidrato em que
25 um microorganismo da invenção como aqui descrito é cultivado em um meio nutriente aquoso sob condições que permitem a produção de ácido cítrico a partir do referido carboidrato e em que o ácido cítrico é isolado como o produto da fermentação. Em uma modalidade preferida, é
30 fornecido um processo para a produção de ácido cítrico com

um microorganismo obtenível a partir de um dos métodos da invenção em que o referido microorganismo é cultivado em um meio nutriente aquoso sob condições que permitem a produção de ácido cítrico a partir de um carboidrato e em que o ácido cítrico é isolado como o produto da fermentação. Mais preferivelmente, o carboidrato é selecionado do grupo que consiste em glicose, frutose, sacarose, melado, amido, milho, mandioca e poliálcoois. Os microorganismos dessa modalidade compreendem:

- 10 1) um microorganismo que é geneticamente construído com os polinucleotídeos TS08, TS09 e/ou CS07 da invenção e/ou com os vetores descritos imediatamente acima. Esses microorganismos construídos são designados: microorganismos TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07 e
- 15 TS08/TS09/CS07. Opcionalmente, os microorganismos anteriormente mencionados são adicionalmente geneticamente construídos com um polinucleotídeo que compreende um polinucleotídeo para rompimento ou infra-regulação de um polinucleotídeo BS08. Esses microorganismos construídos
- 20 podem ser designados: microorganismos TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, TS08/TS09/CS07, deltaBS08-TS08, deltaBS08-TS09, deltaBS08-CS07, deltaBS08-TS08/TS09, deltaBS08-TS08/CS07, deltaBS08-TS09/CS07 e deltaBS08-TS08/TS09/CS07. Opcionalmente, nos microorganismos
- 25 anteriormente mencionados, a produção ou atividade reduzida de um polipeptídeo BS08 é obtida por modificação ou inativação de uma seqüência de ácidos nucléicos presente na célula necessária para a expressão do polinucleotídeo BS08.
- 2) o microorganismo de (1) capaz de produzir ácido
- 30 cítrico a partir de sacarose em quantidades de 100 g/l ou

mais.

3) um microorganismo em que a atividade de um polipeptídeo TS e/ou CS, preferivelmente um polipeptídeo TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07 ou 5 TS08/TS09/CS07, como os polipeptídeos de acordo com Id. de Seq. N°s: 2, 7 e 12 respectivamente, é aumentada ou melhorada de modo que o rendimento de ácido cítrico que é produzido a partir de um carboidrato é aumentado. Preferivelmente, o rendimento de ácido cítrico produzido 10 por um microorganismo que compreende um polipeptídeo com atividade aumentada e/ou melhorada como acima descrito é aumentado em pelo menos 1%, 2%, 3%, 4%, 8%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 100%, 200%, 500% ou mais comparado à quantidade de ácido cítrico produzida pelo microorganismo 15 parental.

4) um microorganismo em que a atividade de um polipeptídeo TS e/ou CS, preferivelmente um polipeptídeo TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07 ou 20 TS08/TS09/CS07, como os polipeptídeos de acordo com Id. de Seq. N°s: 2, 7 e 12 respectivamente, é aumentada ou melhorada e a atividade de uma proteína BS08, como o polipeptídeo de acordo com Id. de Seq. N°: 17, é diminuída ou abolida de modo que o rendimento de ácido cítrico que é produzido a partir de um carboidrato é aumentado. 25 Preferivelmente, o rendimento de ácido cítrico produzido por um microorganismo que compreende um polipeptídeo com atividade aumentada e/ou melhorada como acima descrito é aumentado em pelo menos 1%, 2%, 3%, 4%, 8%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 100%, 200%, 500% ou mais comparado à 30 quantidade de ácido cítrico produzida pelo microorganismo

parental.

5) o microorganismo de qualquer um de (1) a (4), em que o microorganismo é selecionadas do grupo de fungos filamentosos, preferivelmente de *Aspergillus*, mais preferivelmente de *A. niger*, *A. awamori*, *A. aculeatus*, *A. japonicus*, *A. oryzae*, *A. vadensis*, *A. carbonarius*, *A. tubingensis*, *A. lacticoffeatus*, *A. brasiliensis*, *A. piperis*, *A. costaricaensis* ou *A. foetidus*, ainda mais preferivelmente *A. foetidus* variante *acidus* ou *A. foetidus* variante *pallidus*, ainda mais preferivelmente de *A. niger* variante *awamori*, ainda mais preferivelmente de *A. niger* ATCC1015 e mais preferivelmente de *A. niger* CBS 513.88.

Carboidratos adequados que podem ser convertidos em ácido cítrico podem ser, por exemplo, glicose ou selecionados de fontes de carbono cuja assimilação resulta na formação de glicose, como, por exemplo, sacarose, amido, milho, melado, mandioca ou poliálcoois. No caso de melado, melado de beterraba ou cana pode ser usado. Os carboidratos podem estar em forma liquefeita, como, por exemplo, milho liquefeito, amido ou mandioca, ou eles podem estar na forma de um xarope, como, por exemplo, xarope de glicose, frutose, sacarose ou melado. Uma combinação dos referidos substratos é também possível. Dependendo das condições de fermentação e das cepas usadas, os carboidratos usados como substratos podem variar. No caso de fermentação submersa, o carboidrato preferido é selecionado de, por exemplo, xaropes de glicose, sacarose ou amidos liquefeitos. No caso de fermentação de superfície, o carboidrato preferido é selecionado, por exemplo, de melado ou xarope de sacarose. Tanto a fermentação submersa quanto de superfície são

englobadas pela invenção. Um exemplo da produção industrial de ácido cítrico é descrito em US5081025.

A conversão do carboidrato em ácido cítrico em conexão com o processo acima que usa um microorganismo significa
5 que a conversão do carboidrato que resulta em ácido cítrico é realizada pelo microorganismo, ou seja, o substrato pode ser diretamente convertido em ácido cítrico. O referido microorganismo é cultivado sob condições que permitam tal conversão do carboidrato como acima definido.
10 Microorganismos adequados para a produção de ácido cítrico a partir de um dado carboidrato são capazes da conversão do referido carboidrato no produto especificado, ou seja, ácido cítrico, por meio de uma ou mais etapas de conversão biológica, sem a necessidade de qualquer etapa adicional de
15 conversão química.

Um meio como aqui usado para o processo acima que usa um microorganismo pode ser qualquer meio adequado para a produção de ácido cítrico. Tipicamente, o meio é um meio aquoso que compreende, por exemplo, sais, substrato(s), e
20 um certo pH.

"Fermentação" ou "produção" ou "processo de fermentação" como aqui usado pode ser o uso de células de crescimento que usam meio, condições e procedimentos conhecidos por pessoa habilitada, ou o uso de células que
25 não crescem chamadas em repouso, depois de serem cultivadas com o uso de meio, condições e procedimentos conhecidos por pessoa habilitada, sob condições adequadas para a conversão de carboidratos adequados no produto desejado como ácido cítrico. Um exemplo de tal processo para a produção de
30 ácido cítrico é descrito em "Citric acid", Max Roehr,

Christian Kubicek, Jiri Kominek, em *Biotechnology* 2ª Ed, Wiley VCH, 1997, pp 308-345 (como aqui incorporado por referência). As fermentações são tipicamente realizadas em lote, ou em modo contínuo.

5 A seqüência dos genes que compreendem uma seqüência de nucleotídeos selecionada do grupo de Id. de Seq. N°s: 1, 6, 11 e 16, que codificam uma proteína TS08, TS09, CS07 ou BS08, respectivamente, foi determinada por seqüenciamento de um clone genômico obtido de *Aspergillus niger* CBS
10 513.88.

A invenção também se relaciona a um polinucleotídeo que codifica pelo menos um fragmento ou derivado biologicamente ativo de um polipeptídeo TS08, TS09, CS07 e/ou BS08 de acordo com Id. de Seq. N°s: 2, 7, 12 e 17,
15 respectivamente.

Como aqui usado, "fragmento ou derivado biologicamente ativo" significa um polipeptídeo que retém essencialmente a mesma função ou atividade biológica que um polipeptídeo selecionado do grupo de Id. de Seq. N°s: 2, 7, 12 e 17.
20 Exemplos de atividade biológica podem ser, por exemplo, atividade enzimática, atividade de sinalização, atividade de transporte, ou atividade de reatividade de anticorpo. O termo "função biológica" ou "equivalente funcional" como aqui usado significa que a proteína tem essencialmente a
25 mesma atividade biológica, por exemplo, enzimática, de transporte, de sinalização ou atividade de reatividade de anticorpo, que um polipeptídeo selecionado do grupo de Id. de Seq. N°s: 2, 7, 12 e 17.

Os polipeptídeos e polinucleotídeos da presente
30 invenção são preferivelmente fornecidos em uma forma

isolada, e preferivelmente são purificados até homogeneidade.

O termo "isolado" significa que o material é removido de seu ambiente original (por exemplo, o ambiente natural, se ele for de ocorrência natural). Por exemplo, um polinucleotídeo ou polipeptídeo de ocorrência natural presente em um microorganismo vivo não é isolado, mas o mesmo polinucleotídeo ou polipeptídeo, separado de algum ou de todos os materiais coexistentes no sistema natural, é isolado. Tais polinucleotídeos podem ser parte de um vetor e/ou tais polinucleotídeos ou polipeptídeos podem ser parte de uma composição e ainda ser isolados no que tal vetor ou composição não é parte de seu ambiente natural.

Um polinucleotídeo ou ácido nucléico isolado como aqui usado pode ser um DNA ou RNA que não é imediatamente contíguo com ambas as seqüências codificadoras com as quais ele é imediatamente contíguo (uma na extremidade 5' e uma na extremidade 3') no genoma de ocorrência natural do organismo do qual ele é derivado. Assim, em uma modalidade, um ácido nucléico inclui algumas ou todas as seqüências 5'-não codificadoras (por exemplo, promotoras) que são imediatamente contíguas à seqüência codificadora. O termo "polinucleotídeo isolado" inclui, portanto, por exemplo, um DNA recombinante que é incorporado em um vetor, em um plasmídeo ou vírus autonomicamente replicante, ou no DNA genômico de um procariota ou eucariota, ou que existe como uma molécula separada (por exemplo, um fragmento de cDNA ou de um DNA genômico produzido por PCR ou tratamento com endonuclease de restrição) independente de outras seqüências. Ele também inclui um DNA recombinante que é

parte de um gene híbrido que codifica um polipeptídeo adicional que é substancialmente livre de material celular, material viral, ou meio de cultura (quando produzido por técnicas de DNA recombinante), ou precursores químicos ou outros agentes químicos (quando quimicamente sintetizados).
5 Além disso, um "fragmento de ácido nucléico isolado" é um fragmento de ácido nucléico que não é de ocorrência natural como um fragmento e não seria encontrado no estado natural.

Como aqui usado, os termos "polinucleotídeo", "gene" e
10 "gene recombinante" referem-se a moléculas de ácido nucléico que podem ser isoladas de DNA cromossômico, que incluem uma estrutura de leitura aberta que codificam uma proteína, por exemplo, proteínas CBS 513.88 TS, CS ou BS de *A. niger*. Um polinucleotídeo pode incluir uma seqüência de
15 polinucleotídeos selecionada do grupo de Id. de Seq. N°s: 1, 6, 11 e 16 ou fragmentos destas e regiões acima e abaixo das seqüências de gene que podem incluir, por exemplo, regiões promotoras, regiões reguladoras e regiões terminadoras importantes para a expressão adequada e
20 estabilização dos polipeptídeo derivado destas.

Um gene pode incluir seqüências codificadoras, seqüências não codificadoras como, por exemplo, seqüências não traduzidas localizadas nas extremidades 3'- e 5'- da região codificadora de um gene, e seqüências reguladoras.
25 Além disso, um gene refere-se a uma molécula de ácido nucléico isolado como aqui definido. É também percebido por uma pessoa habilitada que polimorfismos de seqüência de DNA que levam a mudanças nas seqüências de aminoácidos de proteínas TS, CS ou BS podem existir em uma população, por
30 exemplo, a população de *Aspergillus niger*. Tal polimorfismo

genético no gene de CS07, BS08, TS08 ou TS09 pode existir entre indivíduos em uma população devido a variação natural ou em células de diferentes populações. Tais variações naturais podem resultar tipicamente em variância de 1-5% na seqüência de nucleotídeos do gene de CS07, BS08, TS08 ou TS09. Qualquer uma e todas essas variações de nucleotídeo e o polimorfismo de aminoácido resultante em CS07, BS08, TS08 ou TS09 são o resultado de variação natural e que não alteram a atividade funcional das proteínas TS devem estar dentro do escopo da invenção.

Como aqui usado, os termos "polinucleotídeo" ou "molécula de ácido nucléico" ou "ácido nucléico" são intercambiáveis e devem incluir moléculas de DNA (por exemplo, cDNA ou DNA genômico) e moléculas de RNA (por exemplo, mRNA) e análogos do DNA ou RNA gerado com o uso de análogos de nucleotídeo. A molécula de ácido nucléico pode ser de filamento único ou de filamento duplo, mas é preferivelmente DNA de filamento duplo. O ácido nucléico pode ser sintetizado com o uso de análogos de oligonucleotídeo ou derivados (por exemplo, nucleotídeos de inosina ou fosforotioato). Tais oligonucleotídeos podem ser usados, por exemplo, para preparar ácidos nucléicos que têm capacidades de pareamento de base alteradas ou resistência aumentada a nucleases.

Um polinucleotídeo da invenção pode ser um polinucleotídeo inteiramente sintético ou sintético em parte. O uso de códon do polinucleotídeo pode ser adaptado para expressão aumentada em um hospedeiro específico. Um exemplo de um método para adaptar uso de códon de um polinucleotídeo é descrito em WO 2006/077258.

A informação de seqüência como aqui fornecida não deve ser interpretada estritamente como necessitando da inclusão de bases erroneamente identificadas. As seqüências específicas aqui reveladas podem ser facilmente usadas para
5 isolar o gene completo de um microorganismo recombinante ou não recombinante capaz de converter um carboidrato em ácido cítrico, em particular *Aspergillus niger*, preferivelmente *Aspergillus niger* CBS 513.88, que por sua vez pode ser facilmente submetido a análise de seqüência adicional assim
10 identificando erros de seqüenciamento.

A menos que indicado de outra forma, todas as seqüências de nucleotídeos determinadas por seqüenciamento de uma molécula de DNA nesta especificação foram determinadas com o uso de um seqüenciador automático de
15 DNA, e todas as seqüências de aminoácidos de polipeptídeos codificados por moléculas de DNA aqui determinadas foram previstas por tradução de uma seqüência de DNA determinada como acima. Portanto, como é conhecido na técnica para qualquer seqüência de DNA determinada por essa abordagem
20 automática, qualquer seqüência de nucleotídeos aqui determinada pode conter alguns erros. Seqüências de nucleotídeos determinadas por automação são tipicamente pelo menos cerca de 90% idênticas, mais tipicamente pelo menos cerca de 95% a pelo menos cerca de 99,9% idênticas a
25 seqüência de nucleotídeos real da molécula de DNA seqüenciada. A seqüência real pode ser mais precisamente determinada por outras abordagens que incluem métodos manuais de seqüenciamento de DNA bem conhecidos na técnica. Como é também conhecido na técnica, uma inserção ou deleção
30 única em uma seqüência de nucleotídeos determinada

comparada à seqüência real causará uma mudança de estrutura na tradução da seqüência de nucleotídeos de modo que a seqüência de aminoácidos prevista codificada por uma seqüência de nucleotídeos determinada será completamente diferente da seqüência de aminoácidos realmente codificada pela molécula de DNA seqüenciado, iniciando no ponto de tal inserção ou deleção.

A pessoa habilitada na técnica é capaz de identificar tais bases erroneamente identificadas e sabe como corrigir tais erros.

Uma molécula de ácido nucléico de acordo com a invenção pode compreender apenas uma porção ou um fragmento da seqüência de ácidos nucléicos fornecida pela presente invenção, como, por exemplo, as seqüências mostradas em Id. de Seq. N°s: 1, 6, 11 ou 16, por exemplo, um fragmento que pode ser usado como um marcador ou iniciador como, por exemplo, Id. de Seq. N°s: 3, 4, 8, 9, 13, 14, 18 ou 19, ou um fragmento que codifica uma porção da proteína de acordo com a invenção. A seqüência de nucleotídeos determinada a partir da clonagem do gene de TS08, TS09, CS07 ou BS08 permite a geração de marcadores e iniciadores desenhados para uso na identificação e/ou clonagem de outros membros da família de TS08, TS09, CS07 ou BS08, bem como homólogos de TS08, TS09, CS07 ou BS08 de outras espécies. O marcador/iniciador tipicamente compreende oligonucleotídeos substancialmente purificados que compreendem tipicamente uma região da seqüência de nucleotídeos que hibridiza preferivelmente sob condições altamente rigorosas a pelo menos cerca de 12 ou 15, preferivelmente cerca de 18 ou 20, mais preferivelmente cerca de 22 ou 25, ainda mais

preferivelmente cerca de 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, ou 75 ou mais nucleotídeos consecutivos de uma seqüência de nucleotídeos selecionada do grupo de Id. de Seq. N°s: 1, 6, 11 ou 16, ou um fragmento ou derivado desta.

5 Uma molécula de ácido nucléico que engloba toda ou uma porção de uma seqüência de ácidos nucléicos selecionada do grupo de Id. de Seq. N°s: 1, 6, 11 ou 16 pode ser também isolada pela reação em cadeia de polimerase (PCR) com o uso de iniciadores de oligonucleotídeo sintéticos desenhados
10 com base na informação de seqüência aqui contida. Adicionalmente, uma molécula de ácido nucléico pode ser gerada através de síntese de gene.

Um ácido nucléico da invenção pode ser amplificado com o uso de cDNA, mRNA ou, alternativamente, DNA genômico,
15 como um modelo, e iniciadores de oligonucleotídeo adequados de acordo com técnicas padrão de amplificação por PCR. O ácido nucléico assim amplificado pode ser clonado em um vetor adequado e caracterizado por análise de seqüência de DNA.

20 Fragmentos de um polinucleotídeo de acordo com a invenção também podem compreender polinucleotídeos que não codificam polipeptídeos funcionais. Tais polinucleotídeos podem funcionar como marcadores ou iniciadores para uma reação de PCR.

25 Ácidos nucléicos de acordo com a invenção independentemente de se eles codificam polipeptídeos funcionais ou não funcionais podem ser usados como marcadores de hibridização ou iniciadores de reação em cadeia de polimerase (PCR). Usos das moléculas de ácido
30 nucléico da presente invenção que não codificam um

polipeptídeo que têm atividade de TS08, TS09, CS07 ou BS08 incluem, entre outros, (1) isolamento do gene que codifica a proteína da presente invenção, ou variantes alélicas destes de uma biblioteca de cDNA, por exemplo, de outros 5 organismos que não *Aspergillus niger*, e (2) análise de *Northern blot* para detecção da expressão de mRNA da referida proteína em células específicas, ou (3) uso no aumento e/ou melhoria da função ou atividade de genes homólogos de TS08, TS09, CS07 ou BS08 nos referidos outros 10 organismos.

Marcadores com base nas seqüências de nucleotídeos aqui fornecidas podem ser usados para detectar transcritos ou seqüências genômicas que codificam as mesmas ou proteínas homólogas, por exemplo, em outros organismos. 15 Moléculas de ácido nucléico que correspondem a variantes naturais e homólogos não *G. oxydans* do DNA de TS08, TS09, CS07 ou BS08 de *A. niger*, que são também englobados pela presente invenção, podem ser isoladas com base em sua homologia ao ácido nucléico de TS08, TS09, CS07 ou BS08 de 20 *A. niger* aqui revelado com o uso do DNA de *A. niger*, ou uma porção deste, como um marcador de hibridização de acordo com técnicas padrão de hibridização, preferivelmente sob condições de hibridização de alto rigor.

Em modalidades preferidas, o marcador também 25 compreende um grupo de rotulagem anexado a ele, por exemplo, o grupo de rotulagem pode ser um radioisótopo, um composto fluorescente, uma enzima, ou um co-fator enzimático.

Seqüências de gene homólogo podem ser isoladas, por 30 exemplo, por realização de PCR com o uso de dois conjuntos

de iniciador de oligonucleotídeo degenerados designados com base nas seqüências de nucleotídeos como aqui ensinado.

O modelo para a reação pode ser cDNA obtido por transcrição reversa de mRNA preparado a partir cepas
5 conhecidas ou suspeitas de expressar um polinucleotídeo de acordo com a invenção. O produto de PCR pode ser subclonado e seqüenciado para assegurar que a seqüência amplificada represente as seqüências de uma nova seqüência de ácido nucléico como aqui descrito, ou um equivalente funcional
10 desta.

O fragmento de PCR pode ser então usado para isolar um clone de cDNA de comprimento total por vários métodos conhecidos. Por exemplo, o fragmento amplificado pode ser rotulado e usado para rastrear um biblioteca de cDNA de
15 bacteriófago ou cosmídeo. Alternativamente, o fragmento rotulado pode ser usado para rastrear uma biblioteca genômica.

Tecnologia de PCR também pode ser usada para isolar seqüências de cDNA de comprimento total de outros
20 organismos. Por exemplo, RNA pode ser isolado, seguindo procedimentos padrão, de uma fonte celular ou tecidual adequadas. Uma reação de transcrição reversa pode ser realizada no RNA com o uso de um iniciador de oligonucleotídeo específico para a extremidade mais 5' do
25 fragmento amplificado para a iniciação da síntese do primeiro filamento.

O híbrido de RNA/DNA resultante pode ser então "tailed" (por exemplo, com guaninas) com o uso de uma reação de transferase terminal padrão, o híbrido pode ser
30 digerido com RNaseH, e a síntese do segundo filamento pode

ser então iniciada (por exemplo, com um iniciador poli-C). Portanto, seqüências de cDNA acima do fragmento amplificado podem ser facilmente isoladas. Para uma revisão de estratégias úteis de clonagem, veja, por exemplo, Sambrook e cols., supra; e Ausubel e cols., supra.

Além disso, ácidos nucléicos que codificam outros membros da família de TS08, TS09, CS07 ou BS08, que assim têm uma seqüência de nucleotídeos que difere da seqüência de nucleotídeos respectiva de acordo com Id. de Seq. N°s: 1, 6, 11 ou 16, estão dentro do escopo da invenção. Além disso, ácidos nucléicos que codificam proteínas TS08, TS09, CS07 ou BS08 de diferentes espécies que assim podem ter uma seqüência de nucleotídeos que difere da seqüência de nucleotídeos respectiva de acordo com Id. de Seq. N°s: 1, 6, 11 ou 16 estão dentro do escopo da invenção.

A invenção também se relaciona a um polinucleotídeo isolado hibridizável sob condições rigorosas, preferivelmente sob condições altamente rigorosas, a um polinucleotídeo da presente invenção, como, por exemplo, um polinucleotídeo de acordo com Id. de Seq. N°s: 1, 6, 11 ou 16. Vantajosamente, tal polinucleotídeo pode ser obtido a partir de um microorganismo capaz de converter um carboidrato em ácido cítrico, em particular, *Aspergillus niger*, preferivelmente *Aspergillus niger* CBS 513.88.

Como aqui usado, o termo "hibridização" deve descrever condições para hibridização e lavagem sob as quais as seqüências de nucleotídeos de pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, mais preferivelmente pelo menos cerca de 80%, ainda mais preferivelmente pelo menos cerca de 85% a 90%, mais

preferivelmente pelo menos 95% homólogas uma à outra permanecem tipicamente hibridizadas uma à outra.

Em uma modalidade, um ácido nucleico da invenção é pelo menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 5 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou mais homólogo a uma seqüência de ácidos nucleicos selecionada do grupo de Id. de Seq. N°s: 1, 6, 11 ou 16, ou um complemento dessa.

Um exemplo preferido, não limitante de tais condições 10 de hibridização são hibridização em 6x cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) a cerca de 45°C, seguida por uma ou mais lavagens em 1x SSC, 0,1% SDS a 50°C, preferivelmente a 55°C, mais preferivelmente a 60°C e ainda mais preferivelmente a 65°C.

15 Condições de alto rigor incluem, por exemplo, hibridização a 68°C em 6x SSC/5x solução de Denhardt/1,0% SDS e lavagem em 0,2x SSC/0,1% SDS em temperatura ambiente. Alternativamente, a lavagem pode ser realizada a 42°C, 50°C, 60°C, 65°C ou alternativamente 68°C para condições 20 muito rigorosas.

O "rigor" das reações de hibridização é facilmente determinável por pessoa de habilidade comum na técnica. Para detalhes adicionais e explicação de rigor das reações de hibridização, veja, Ausubel e cols., Current Protocols 25 in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

Preferivelmente, uma molécula de ácido nucleico isolado da invenção que hibridiza sob condições preferivelmente altamente rigorosas a uma seqüência de 30 nucleotídeos da invenção corresponde a uma molécula de

ácido nucleico de ocorrência natural. Como aqui usado, uma molécula de ácido nucleico "de ocorrência natural" refere-se a uma molécula de RNA ou DNA que tem uma seqüência de nucleotídeos que ocorre na natureza (por exemplo, codifica uma proteína natural). Em uma modalidade, o ácido nucleico codifica uma proteína natural TS08, TS09, CS07 ou BS08 de *A. niger*.

O profissional habilitado saberá quais condições aplicar para condições de hibridização rigorosas e altamente rigorosas. Um guia adicional com relação a tais condições é facilmente disponível na técnica, por exemplo, em Sambrook e cols., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N. Y.; e Ausubel e cols. (eds.), 1995, *Current Protocols in Molecular Biology*, (John Wiley & Sons, N. Y.). De fato, um polinucleotídeo que hibridiza apenas a uma seqüência poli (A) (como o trato 3'-terminal poli (A) de mRNAs), ou a um estiramento complementar de resíduos T (ou U), não deve ser incluído em um polinucleotídeo da invenção usado para hibridizar especificamente a uma porção de um ácido nucleico da invenção, uma vez que tal polinucleotídeo deve hibridizar a qualquer molécula de ácido nucleico que contém um estiramento poli (A) ou o complemento desse (por exemplo, praticamente qualquer clone de cDNA de filamento duplo).

Em uma abordagem típica, DNA genômico ou bibliotecas de cDNA construídas a partir de outros organismos, por exemplo, microorganismos capazes de converter um carboidrato em ácido cítrico, em particular outras espécies de *Aspergillus* podem ser rastreados.

Por exemplo, cepas de *Aspergillus* podem ser rastreadas

para polinucleotídeos homólogos por análise de *Northern blot*. Após detecção de transcritos homólogos aos polinucleotídeos de acordo com a invenção, as bibliotecas de DNA podem ser construídas a partir de RNA isolado da
5 cepa adequada, utilizando técnicas padrão bem conhecidas por aqueles habilitados na técnica. Alternativamente, uma biblioteca total de DNA genômico pode ser rastreada com o uso de um marcador hibridizável a um polinucleotídeo de acordo com a invenção.

10 Uma molécula de ácido nucleico da presente invenção, como, por exemplo, uma molécula de ácido nucleico selecionada do grupo de Id. de Seq. N°s: 1, 6, 11 ou 16, ou um fragmento ou derivado dessa, pode ser isolada com o uso de técnicas padrão de biologia molecular e a informação de
15 seqüência aqui fornecida. Por exemplo, com o uso de toda ou de uma porção de uma seqüência de ácidos nucleicos selecionada do grupo de Id. de Seq. N°s: 1, 6, 11 ou 16 como um marcador de hibridização, as moléculas de ácido nucleico de acordo com a invenção podem ser isoladas com o
20 uso de técnicas padrão de hibridização e de clonagem (por exemplo, como descrito em Sambrook, J., Fritsh, E. F. , e Maniatis, T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2ª, ed. , Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

25 Além disso, oligonucleotídeos que correspondem ou que são hibridizáveis a seqüências de nucleotídeos de acordo com a invenção podem ser preparados por técnicas sintéticas padrão, por exemplo, com o uso de um sintetizador de DNA automatizado.

30 Os termos "homologia" ou "percentual de identidade"

são usados de modo intercambiável nessa. Para o objetivo dessa invenção, é aqui definido que para determinar o percentual de identidade de duas seqüências de aminoácidos ou de duas seqüências de ácido nucleico, as seqüências são alinhadas para objetivos de comparação (por exemplo, *gaps* podem ser introduzidos na seqüência de uma primeira seqüência de aminoácido ou ácido nucleico para alinhamento ótimo com a segunda seqüência de amino ou ácido nucleico). Os resíduos de aminoácido ou nucleotídeos nas posições correspondentes de aminoácido ou posições de nucleotídeos são então comparadas. Quando uma posição na primeira seqüência é ocupada pelo mesmo resíduo de aminoácido ou nucleotídeo que a posição correspondente na segunda seqüência, então as moléculas são idênticas naquela posição. O percentual de identidade entre as duas seqüências é uma função do número de posições idênticas partilhado pelas seqüências (ou seja, % de identidade = número de posições idênticas/número de posições total (ou seja, posições de sobreposição) x 100). Preferivelmente, as duas seqüências têm o mesmo comprimento.

A pessoa habilitada estará ciente do fato de que vários diferentes programas de computador são disponíveis para determinar a homologia entre duas seqüências. Por exemplo, uma comparação de seqüências e determinação do percentual de identidade entre duas seqüências pode ser realizada com o uso um algoritmo matemático. Em uma modalidade preferida, o percentual de identidade entre duas seqüências de aminoácidos é determinado com o uso do algoritmo de Needleman e Wunsch (J. Mol. Biol. (48): 444-453 (1970)) que foi incorporado no programa GAP no pacote

de programa GCG (disponível em <http://www.accelrys.com>), com o uso de uma matriz Blossom 62 ou um matriz PAM250, e um peso de *gap* de 16, 14, 12, 10, 8, 6 ou 4 e peso de *length* de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6. A pessoa habilitada perceberá que todas esses diferentes parâmetros gerarão resultados levemente diferentes mas que o percentual de identidade geral de duas seqüências não é significativamente alterado quando do uso de diferentes algoritmos.

Ainda em uma outra modalidade, o percentual de identidade entre duas seqüências de nucleotídeos é determinado com o uso do programa GAP no pacote de programas GCG (disponível em <http://www.accelrys.com>), com o uso de uma matriz NWSgapdna.CMP e um peso de *gap* de 40, 50, 60, 70 ou 80 e um peso de *length* de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

Em uma outra modalidade, o percentual de identidade entre duas aminoácido ou seqüências de nucleotídeos é determinado com o uso do algoritmo de E. Meyers e W. Miller (CABIOS, 4: 11-17 (1989) que foi incorporado no programa ALIGN (versão 2.0) (disponível em <http://vega.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi>) usando uma tabela de resíduo de peso PAM120, uma *gap length penalty* de 12 e uma *gap penalty* de 4. Ainda em uma outra modalidade, o percentual de identidade entre duas seqüências de nucleotídeos é determinado com o uso do programa CDA (Huang, 1994, A Context Dependent Method for Comparing Sequences, Proceedings of the 5th Symposium on Combinatorial Pattern Matching, Lecture Notes in Computer Science 807, Springer-Verlag, 54-63) com os parâmetros apresentados como se seguir: (i) para alinhamentos de (poli)peptídeo: Mismatch:-2 GapOpen:11 GapExtend:1 ContextLength:10 MatchBonus:1, e (ii) para alinhamento de

seqüência de nucleotídeos: Mismatch:-15 GapOpen:5
GapExtend:2 ContextLength:10 MatchBonus:1.

Exemplos de programas alternativos usados para alinhamentos e determinação de homologia são método Clustal
5 (Higgins, 1989, CABIOS 5 : 151-153) ou Clustal W (Thompson
JD, Higgins DG, e Gibson TJ (1994)-CLUSTAL W: que melhoram
a sensibilidade de alinhamento progressivo de seqüência
múltipla através de pesagem de seqüência, *gap penalties*
específicas para posições e escolha de matriz de peso.
10 Nucleic Acids Research 22:4673-4680).

As seqüências de ácido nucleico e proteína da presente invenção também podem ser usadas como uma "seqüência query" para realizar um pesquisa contra bases de dados públicas, por exemplo, para identificar outros membros de família ou
15 seqüências relacionadas. Tais pesquisas podem ser realizadas com o uso dos programas BLASTN e BLASTX (versão 2.0) de Altschul, e cols. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Pesquisas de nucleotídeos BLAST podem ser realizadas com o programa BLASTN, pontuação = 100, comprimento de palavra =
20 11, para obter seqüências de nucleotídeos homólogas a moléculas de ácidos nucleicos da presente invenção. Pesquisas de proteína BLAST podem ser realizadas com o programa BLASTX, pontuação = 50, comprimento de palavra =
3, para obter seqüências de aminoácidos homólogas a
25 moléculas de proteína da presente invenção. Para obter alinhamentos *gapped* para objetivos de comparação, Gapped BLAST pode ser utilizado como descrito em Altschul e cols., (1997) Nucleic Acids Res. 25 (17): 3389-3402. Quando da utilização de programas BLAST e Gapped BLAST, os parâmetros
30 padrão dos respectivos programas (por exemplo, BLASTX e

BLASTN) podem ser usados. Veja [www. ncbi. nlm. nih. gov.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

Em uma outra modalidade preferida, uma molécula de ácido nucleico isolado da invenção compreende uma molécula de ácido nucleico que é o complemento de uma seqüência de nucleotídeos da presente invenção, como, por exemplo, a seqüência selecionada do grupo de Id. de Seq. N°s: 1, 6, 11 ou 16. A molécula de ácido nucleico, que é complementar a uma seqüência de nucleotídeos aqui revelada, é uma que é suficientemente complementar a uma seqüência de nucleotídeos selecionada do grupo de Id. de Seq. N°s: 1, 6, 11 ou 16 de modo que ela hibridiza à referida seqüência de nucleotídeos assim formando um duplex estável.

Em uma modalidade preferida adicional, um ácido nucleico da invenção selecionado do grupo de Id. de Seq. N°s: 1, 6, 11 ou 16, ou o complemento desse contém pelo menos uma mutação que leva a um produto de gene com função/atividade modificada. Pelo menos uma mutação pode ser introduzida por métodos aqui descritos. Em um aspecto, pelo menos uma mutação leva a uma proteína respectiva TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, TS08/TS09/CS07, TS08/BS08, TS09/BS08, CS07/BS08, TS08/TS09/BS08, TS08/CS07/BS08, TS09/CS07/BS08, ou TS08/TS09/CS07/BS08 cuja função e/ou atividade comparada à contraparte de tipo selvagem é aumentada ou melhorada. Métodos para introdução de tais mutações são bem conhecidos na técnica.

O termo "aumento" de atividade como aqui usado engloba aumento da atividade de um ou mais polipeptídeos no organismo produtor, que por sua vez são codificados pelos polinucleotídeos correspondentes aqui descritos. Há

inúmeros métodos disponíveis na técnica para realizar aumento da atividade de uma dada proteína, nesse caso a proteína TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, TS08/TS09/CS07, TS08/BS08, TS09/BS08, CS07/BS08, 5 TS08/TS09/BS08, TS08/CS07/BS08, TS09/CS07/BS08, ou TS08/TS09/CS07/BS08. Em geral, a atividade específica de uma proteína pode ser aumentada ou o número de cópias da proteína pode ser aumentado. O termo aumento da atividade ou expressões equivalentes também englobam a situação em 10 que a atividade da proteína TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, TS08/TS09/CS07, TS08/BS08, TS09/BS08, CS07/BS08, TS08/TS09/BS08, TS08/CS07/BS08, TS09/CS07/BS08, ou TS08/TS09/CS07/BS08 é introduzida em uma célula que não continha essa atividade antes, por exemplo, por introdução 15 de um gene que codifica TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, TS08/TS09/CS07, TS08/BS08, TS09/BS08, CS07/BS08, TS08/TS09/BS08, TS08/CS07/BS08, TS09/CS07/BS08, ou TS08/TS09/CS07/BS08 em uma célula que não continha um equivalente desse gene(s) antes, ou que não pode expressar 20 uma forma ativa da proteína correspondente antes. Para facilitar tal aumento, o número de cópia dos genes que correspondem aos polinucleotídeos aqui descritos pode ser aumentado. Alternativamente, um promotor forte pode ser usado para direcionar a expressão do polinucleotídeo. Em 25 uma outra modalidade, o promotor, região reguladora e/ou o sítio de ligação de ribossomo acima do gene pode ser alterado para aumentar a expressão. A expressão também pode ser aumentada ou melhorada por aumento da meia-vida relativa do RNA mensageiro. Em uma outra modalidade, a 30 atividade do polipeptídeo em si pode ser aumentada por

emprego de uma ou mais mutações no polipeptídeo da seqüência de aminoácidos, que aumenta a atividade. Por exemplo, a alteração da afinidade do polipeptídeo por seu substrato correspondente pode resultar em melhor atividade.

5 Do mesmo modo, a meia-vida relativa do polipeptídeo pode ser aumentada. Em cada um desses cenários, seja a expressão aumentada do gene ou atividade específica aumentada, a melhoria pode ser atingida por alteração da composição do meio de cultura de célula e/ou métodos usados para cultura.

10 "Expressão aumentada" ou "atividade melhorada" como aqui usado significa um aumento de pelo menos 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 200% ou ainda mais que 500%, comparado a uma proteína, polinucleotídeo, gene de tipo selvagem; ou a atividade e/ou a concentração da proteína presente antes

15 dos polinucleotídeos ou polipeptídeos serem aumentados e/ou melhorados. A atividade da proteína TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, TS08/TS09/CS07, TS08/BS08, TS09/BS08, CS07/BS08, TS08/TS09/BS08, TS08/CS07/BS08, TS09/CS07/BS08, ou TS08/TS09/CS07/BS08 pode

20 também ser aumentada por contato da proteína com intensificador específico ou geral de sua atividade.

Em uma modalidade adicional, além da atividade aumentada e/ou melhorada de uma proteína TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou TS08/TS09/CS07, um

25 ácido nucleico que codifica BS08 da invenção como mostrado em Id. de Seq. N°:16 ou o complemento desse contém pelo menos uma mutação que leva a um produto de gene com função/atividade modificada, preferivelmente atividade reduzida. Pelo menos uma mutação pode ser introduzida por

30 métodos aqui descritos. Em um aspecto, a mutação leva a uma

proteína BS08 cuja função comparada à contraparte de tipo selvagem é completamente ou parcialmente destruída. Métodos para introdução de tais mutações são bem conhecidos na técnica.

5 O termo "redução" da atividade como aqui usado engloba diminuição da atividade de um ou mais polipeptídeos no organismo produtor, que, por sua vez, são codificadas pelos polinucleotídeos correspondentes aqui descritos. Há inúmeros métodos disponíveis na técnica para realizar a
10 redução da atividade de uma dada proteína, nesse caso a proteína BS08. Em geral, a atividade específica de uma proteína pode ser diminuída ou o número de cópia da proteína pode ser diminuído.

Para facilitar tal diminuição, o número de cópia dos
15 genes que correspondem aos polinucleotídeos aqui descritos pode ser diminuído. Essa diminuição pode incluir o rompimento, modificação ou inativação dos genes que correspondem aos polinucleotídeos aqui descritos. Modificação ou inativação do gene pode ser realizada por
20 técnicas anti-senso estabelecidas com o uso de uma seqüência de nucleotídeos complementar à seqüência de ácido nucleico do gene. Mais especificamente, a expressão do gene por uma célula fúngica filamentosa pode ser reduzida ou eliminada por introdução de uma seqüência de nucleotídeos
25 complementar à seqüência de ácido nucleico, que pode ser transcrita na célula e é capaz de hibridização ao mRNA produzido na célula. Sob condições que permitem a seqüência de nucleotídeos anti-senso complementar para hibridizar ao mRNA, a quantidade de proteína traduzida é assim reduzida
30 ou eliminada. Um exemplo de expressão de um RNA anti-senso

é mostrado em Appl Environ Microbiol. 2000 Feb;66(2):775-82. (Characterization of a foldase, protein disulfide isomerase A, in the protein secretory pathway of *Aspergillus niger*. Ngiam C, Jeenes DJ, Punt PJ, Van Den Hondel CA, Archer DB) ou (Zrenner R, Willmitzer L, Sonnewald U. Analysis of the expression of potato uridinedifosfato-glicose pyrofosforilase and its inhibition by antisense RNA. Planta. (1993);190(2):247-52). Além disso, modificação, infra-regulação ou inativação do gene pode ser obtido via técnica de interferência de RNA (RNAi) (FEMS Microb. Lett. 237 (2004): 317-324). As técnicas de interferência de RNA descritas em WO 05/05672 A1 e/ou WO 05/026356 A1 podem ser usadas para infra-regulação, modificação ou inativação do gene.

Alternativamente, um promotor fraco pode ser usado para direcionar a expressão do polinucleotídeo. Em uma outra modalidade, o promotor, região reguladora e/ou o sítio de ligação de ribossomo acima do gene pode ser alterado para atingir a infra-expressão. A expressão também pode ser reduzida por diminuição da meia-vida relativa do RNA mensageiro. Em uma outra modalidade, a atividade do polipeptídeo em si pode ser diminuída por emprego de uma ou mais mutações no polipeptídeo seqüência de aminoácidos, que diminui a atividade. Por exemplo, alteração da afinidade do polipeptídeo por seu substrato correspondente pode resultar em atividade reduzida. Da mesma forma, a meia-vida relativa do polipeptídeo pode ser diminuída. Em cada caso, seja expressão de gene reduzida ou atividade reduzida, a redução pode ser realizada por alteração da composição do meio de cultura de célula e/ou dos métodos usados para cultura.

"Expressão reduzida", "infra-regulação" ou "atividade reduzida" como aqui usado significa uma diminuição de pelo menos 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 80%, 90%, 95% ou mesmo de 100% comparada a uma proteína, polinucleotídeo, gene de tipo selvagem (BS08); ou a atividade e/ou a concentração da proteína presente antes dos polinucleotídeos ou polipeptídeos serem reduzidos. A atividade da proteína BS08 também pode ser reduzida por contato da proteína com um inibidor específico ou geral de sua atividade.

10 Um outro aspecto da invenção pertence a vetores, que contêm um ácido nucleico que codifica uma proteína de acordo com a invenção ou um equivalente funcional ou porção desse. Como aqui usado, o termo "vetor" refere-se a uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar um outro

15 ácido nucleico ao qual ela foi ligada. Um tipo de vetor é um "plasmídeo", que refere-se a uma alça de DNA de filamento duplo circular em que segmentos adicionais de DNA podem ser ligados. Um outro tipo de vetor é um vetor viral, em que segmentos adicionais de DNA podem ser ligados no

20 genoma viral. Certos vetores são capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira em que eles são introduzidos (por exemplo, vetores bacterianos tendo uma origem bacteriana de replicação e vetores epissomais de mamífero). Um vetor de clonagem autonomicamente mantido

25 para um fungo filamentoso pode compreender a AMA1-seqüência (veja, por exemplo, Aleksenko e Clutterbuck (1997), Fungal Genet. Biol. 21: 373-397). Outros vetores (por exemplo, vetores não epissomais de mamífero) são integrados no genoma de uma célula hospedeira após introdução na célula

30 hospedeira, e dessa forma são replicados junto com o genoma

do hospedeiro.

Além disso, certos vetores são capazes de direcionar a expressão de genes aos quais eles são operacionalmente ligados. Tais vetores são aqui referidos como "vetores de expressão". Em geral, vetores de expressão de utilidade em técnicas de DNA recombinante estão freqüentemente na forma de plasmídeos. Os termos "plasmídeo" e "vetor" podem ser usados de forma intercambiável nessa uma vez que o plasmídeo pe a forma mais comumente usada de vetor. No entanto, a invenção deve incluir tais outras formas de vetores de expressão, como vetores virais (por exemplo, retrovírus de replicação defeituosa, adenovírus e vírus adeno-associados), que servem a funções equivalentes. Exemplos do desenho geral de vetores de expressão e do uso de vetores de expressão para superexpressão de gene podem ser encontrados em WO 99/32617, WO 01/21779 ou WO 05/100573.

Os vetores recombinantes da invenção compreendem um ácido nucleico da invenção em uma forma adequada para expressão do ácido nucleico em uma célula hospedeira, o que significa que o vetor de expressão recombinante inclui uma ou mais seqüências reguladoras, selecionadas com base nas células hospedeiras a serem usadas para expressão, que é operacionalmente ligada à seqüência de ácido nucleico a ser expressa. Em um vetor de expressão recombinante, "operacionalmente ligado" deve significar que a seqüência de nucleotídeos de interesse é ligada à seqüência(s) reguladora(s) em uma maneira que permita a expressão da seqüência de nucleotídeos (por exemplo, em um sistema de transcrição/tradução *in vitro* ou em uma célula hospedeira

quando o vetor é introduzido na célula hospedeira). O termo "seqüências reguladoras" deve incluir promotores, intensificadores e outros elementos de controle de expressão (por exemplo, atenuador). Tais seqüências reguladoras são descritas, por exemplo, em Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Seqüências reguladoras incluem aquelas que direcionam a expressão constitutiva ou indutível de uma seqüência de nucleotídeos em vários tipos de células hospedeiras e aquelas que direcionam a expressão da seqüência de nucleotídeos apenas em uma certa célula hospedeira (por exemplo, seqüências reguladoras específicas para tecido). Deve ser percebido por aqueles habilitados na técnica que o desenho do vetor de expressão pode depender de tais fatores como a escolha da célula hospedeira a ser transformada, o nível de expressão desejado da proteína etc. Os vetores de expressão da invenção podem ser introduzidos em células hospedeiras para assim produzir proteínas ou peptídeos, codificados por ácido nucleicos como aqui descritos, incluindo, sem limitação, proteínas mutantes, fragmentos dessas, variantes ou equivalentes funcionais dessas, e proteínas de fusão, codificadas por um ácido nucleico como aqui descrito, por exemplo, proteínas TS08, TS09, CS07 e/ou BS08, formas mutantes de proteínas TS08, TS09, CS07 e/ou BS08, proteínas de fusão e outros.

Os vetores de expressão recombinante da invenção podem ser desenhados para expressão de proteínas TS08, TS09, CS07 e/ou BS08 em um microorganismo adequados. Por exemplo, a proteína de acordo com a invenção pode ser expressa em células fúngicas como cepas que pertencem ao gênero,

Acremonium, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*,
Fusarium, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*,
Neocallimastix, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*,
Piromyces, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*,
5 *Thielavia*, *Tolyocladium*, e *Trichoderma*. Vetores de
expressão úteis na presente invenção incluem vetores
cromossomo, episomal e vírus-derivados, por exemplo,
vetores derivados de plasmídeos bacterianos, bacteriófago,
episomo de levedura, elementos cromossômicos de levedura,
10 vírus como baculovírus, papova vírus, vaccínia vírus,
adenovírus, pox vírus falsos, vírus da pseudo-raiva e
retrovírus, e vetores derivados de combinações desses, como
aqueles derivados de elementos genéticos de plasmídeo e
bacteriófago, como cosmídeo e fagemídeos.

15 Alternativamente, o vetor pode ser um que, quando
introduzido na células do fungo filamentoso, é integrado no
genoma e replicado junto com o cromossomo (s) em que ele
foi integrado. O vetor de clonagem integrativo pode se
integrar aleatoriamente ou em um locus alvo predeterminado
20 nos cromossomos da célula hospedeira fúngica filamentosa.
Em uma modalidade preferida da invenção, o vetor de
clonagem integrativo compreende um fragmento de DNA, que é
homólogo a uma seqüência de DNA em um locus alvo
predeterminado no genoma da célula hospedeira fúngica
25 filamentosa para direcionamento da integração do vetor de
clonagem a esse locus predeterminado. Para promover
integração direcionada, o vetor de clonagem é
preferivelmente linearizado antes da transformação da
célula hospedeira. A linearização é preferivelmente
30 realizada de tal modo que pelo menos uma mas

preferivelmente cada uma das extremidades do vetor de clonagem é flanqueada por seqüências homólogas ao lócus alvo. O comprimento das seqüências homólogas que flanqueiam o lócus alvo é de preferivelmente pelo menos 30 bp, 5 preferivelmente pelo menos 50 bp, preferivelmente pelo menos 0,1 kb, ainda preferivelmente pelo menos 0,2kb, mais preferivelmente pelo menos 0,5 kb, ainda mais preferivelmente pelo menos 1 kb, mais preferivelmente pelo menos 2 kb. Preferivelmente, a eficiência da integração 10 direcionada no genoma da célula hospedeira, ou seja, integração em um lócus alvo predeterminado, é aumentada por aumento das capacidades de recombinação homóloga da célula hospedeira. Tal fenótipo da células envolve preferivelmente um gene deficiente ku70 como descrito em WO2005/095624. 15 WO2005/095624, que é aqui incorporado por referência, revela um método para obter uma células de fungo filamentosos que compreendem eficiência aumentada da integração direcionada. Preferivelmente, a seqüência de DNA no vetor de clonagem, que é homóloga ao lócus alvo, é 20 derivada de um lócus altamente expresso significando que ela é derivada de um gene, que é capaz de alto nível de expressão na célula hospedeira fúngica filamentosos. Um gene capaz de alto nível de expressão, ou seja, um gene altamente expresso, é aqui definido como um gene cujo mRNA 25 pode fazer pelo menos 0,5% (w/w) do mRNA total celular, por exemplo, sob condições induzidas, ou alternativamente, um gene cujo produto de gene pode fazer pelo menos 1% (w/w) da proteína total celular, ou, no caso de um produto de gene secretado, pode ser secretado a um nível de pelo menos 0,1 30 g/l (como descrito em EP 357 127). Inúmeros genes fúngicos

preferidos altamente expressos são dados por via de exemplo: genes de amilase, glicoamilase, álcool desidrogenase, xilanase, gliceraldeído-fosfato desidrogenase ou celobiohidrolase (cbh) de *Aspergillus* ou 5 *Trichoderma*. Genes altamente expressos mais preferidos para esses objetivos são um gene de glicoamilase, preferivelmente um gene de glicoamilase de *A. niger*, um gene de TAKA-amilase de *A. oryzae*, um gene *gpdA* de *A. nidulans*, um gene *cbh* de *Trichoderma reesei*, 10 preferivelmente *cbh1*. O sistema de vetor pode ser um vetor único ou plasmídeo ou dois ou mais vetores ou plasmídeos, que juntos contêm o DNA total a ser introduzido no genoma da célula fúngica filamentosa, ou um transpóson. Mais de uma cópia de uma seqüência de nucleotídeos que codifica um 15 polipeptídeo pode ser inserida na célula para aumentar a produção do produto de gene. Isso pode ser feito, preferivelmente, por integração no cromossomo da célula da seqüência de nucleotídeos, mais preferivelmente por direcionamento da integração da seqüência de nucleotídeos 20 em um dos lócus altamente expressos acima listados. A integração pode ser aumentada por uma recombinase. Alternativamente, isso pode ser feito por inclusão de um gene de marcador selecionável amplificável com a seqüência de nucleotídeos em que as células contendo cópias 25 amplificadas do gene de marcador selecionável, e assim cópias adicionais da seqüência de nucleotídeos, podem ser selecionadas por cultivo das células na presença do agente selecionável adequado. para aumentar ainda mais o número de cópias da seqüência de DNA a ser super-expressa, a técnica 30 de conversão de gene as descrita em WO 98/46772 pode ser

usada.

Alternativamente, o vetor de expressão recombinante pode ser transcrito e traduzido *in vitro*, por exemplo, com o uso de uma seqüência reguladora de promotor T7 e T7
5 polimerase.

A inserção de DNA pode ser operacionalmente ligada a um promotor adequado, que pode ser um promotor constitutivo ou indutível como, por exemplo, o promotor PL de fago lambda, o lac de *E. coli*, promotores trp e tac, os
10 promotores de SV40 precoces e tardios e promotores de LTRs retrovirais. A pessoa habilitada saberá como selecionar promotores adequados. As construções de expressão podem conter sítios para iniciação de transcrição, terminação, e, na região transcrita, um sítio de ligação de ribossomo para
15 tradução. A porção codificadora dos transcritos maduros expressos pelas construções pode preferivelmente incluir um códon de iniciação no início e um códon de terminação adequadamente posicionado na extremidade do polipeptídeo a ser traduzido.

20 Preferivelmente, o promotor pode ser derivado de um gene, que é altamente expresso (aqui definido como a concentração de mRNA com pelo menos 0,5% (w/w) do mRNA total celular). Em uma outra modalidade preferida, o promotor pode ser derivado de um gene, que é meio expresso
25 (aqui definido como a concentração de mRNA com pelo menos 0,01% até 0,5% (w/w do mRNA total celular). Em uma outra modalidade preferida, o promotor pode ser derivado de um gene, que é menos expresso (aqui definido como a concentração de mRNA menor que 0,01% (w/w) do mRNA total
30 celular).

Mais preferivelmente, dados de micro arranjo são usados para selecionar genes, e assim promotores daqueles genes, que têm um certo nível de transcrição e regulação. Desse modo uma pessoa pode adaptar os cassetes de expressão de gene otimamente às condições em que devem funcionar. Esses fragmentos de promotor podem ser derivados de várias fontes, ou seja, diferentes espécies, PCR amplificado, sinteticamente e outros.

A seqüência de controle também pode incluir uma seqüência de terminação de transcrição adequada, uma seqüência reconhecida por uma célula eucariótica para terminar a transcrição. A seqüência terminadora é operacionalmente ligada ao terminal 3' da seqüência de ácidos nucleicos que codifica o polipeptídeo. Qualquer terminador, que é funcional na célula, pode ser usado na presente invenção.

Terminadores preferidos para células fúngicas filamentosas são obtidos a partir dos genes que codificam TAKA amilase de *Aspergillus oryzae*; terminadores de *Penicillium chrysogenum* pcbAB, pcbC e penDE; giucoamilase de *Aspergillus niger*; antranilato sintase de *Aspergillus nidulans*; alfa-glicosidase de *Aspergillus niger*; gene trpC de *Aspergillus nidulans*; amdS de *Aspergillus nidulans*; gpdA de *Aspergillus nidulans*; protease semelhante a tripsina de *Fusarium oxysporum*.

A seqüência de controle também pode ser uma seqüência líder adequada, uma região não traduzida de um mRNA que pe importante para tradução pela célula. A seqüência líder pe operacionalmente ligada ao terminal 5' da seqüência de ácidos nucleicos que codifica o polipeptídeo.

Qualquer seqüência líder, que é funcional na célula, pode ser usada na presente invenção. líderes preferidos para células fúngicas filamentosas são obtidas dos genes que codificam TAKA amilase de *Aspergillus oryzae* e triose 5 fosfato isomerase de *Aspergillus nidulans* e glaA de *Aspergillus niger*.

A seqüência de controle também pode ser uma seqüência de poliadenilação, a seqüência que é operacionalmente ligada ao terminal 3' da seqüência de ácidos nucleicos e 10 que, quando transcrita, é reconhecida pela célula como um sinal para adicionar resíduos de poliadenosina ao mRNA transcrito. Qualquer seqüência de poliadenilação, que seja funcional na célula, pode ser usada na presente invenção.

Seqüências de poliadenilação preferidas para células 15 fúngicas filamentosas são obtidas dos genes que codificam TAKA amilase de *Aspergillus oryzae*, glicoamilase de *Aspergillus niger*, antranilato sintase de *Aspergillus nidulans*, protease semelhante a tripsina de *Fusarium oxysporum* e alfa-glicosidase de *Aspergillus niger*.

20 Seqüências de controle podem ser as seqüências Kozak, seqüências de iniciação e de terminação de tradução codificadoras como descrito em WO 2006/077258.

DNA de vetor pode ser introduzido em células hospedeiras adequadas por meio de técnicas convencionais de 25 transformação ou transfecção. Como aqui usado, os termos "transformação", "transconjugação" e "transfecção" devem referir-se a uma variedade de técnicas reconhecidas para introdução de ácido nucleico estranho (por exemplo, DNA) em uma célula hospedeira, incluindo co-precipitação de fosfato de cálcio ou cloreto de cálcio, transfecção mediada por 30

DEAE-dextrano, transdução, infecção, lipofecção, transfecção catiônica mediada por lipídeo ou eletroporação. Métodos adequados para transformação ou transfecção de células hospedeiras podem ser encontrados em Sambrook, e
5 cols. (supra), Davis e cols., Basic Methods in Molecular Biology (1986) e outros manuais de laboratório.

Métodos de transformação de *A. niger* são bem conhecidos por pessoa habilitada (Biotechnology of Fungos filamentosos: Technology and Products. (1992) Reed
10 Publishing (USA); capítulo 6: Transformation páginas 113 a 156). A pessoa habilitada reconhecerá que a transformação bem sucedida de *A. niger* não é limitada ao uso de vetores, sistemas de marcador de seleção, promotores e protocolos de transformação especificamente aqui exemplificados.
15 Protocolos de transformação específicos para *A. niger* são descritos, por exemplo, em WO 99/32617 ou WO 98/46772.

Os vetores preferivelmente contêm um ou mais marcadores selecionáveis, que permitem a fácil seleção de células transformadas. Um marcador selecionável é um gene
20 cujo produto fornece resistência a biocida ou viral, resistência a metais pesados, prototrofia a auxotrofos, e outros. Um marcador selecionável para uso na célula fúngica filamentosa pode ser selecionado do grupo que inclui, sem limitação, *amdS* (acetamidase), *argB* (ornitina
25 carbamoiltransferase), *bar* (fosfinotricinacetil transferase), *bleA* (ligação a bleomicina), *hygB* (higromicina fosfotransferase), *niaD* (nitrato redutase), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato descarboxilase), *sc* (sulfato adeniltransferase), e *trpC* (antranilato sintase), bem como
30 equivalentes de outras espécies. Preferidos para uso em uma

célula de *Aspergillus* e *Penicillium* são os genes *amdS* (EP 635574, WO 97/06261) e *pyrG* de *A. nidulans* ou *A. oryzae* e o gene *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*. Mais preferivelmente um gene *amdS* é usado, ainda mais preferivelmente um gene *amdS* de *A. nidulans* ou *A. niger*. Um gene de marcador de seleção mais preferido é a seqüência codificadora *amdS* de *A. nidulans* fundida ao promotor *gpdA* de *A. nidulans* como revelado em EP 635574, que é aqui englobado por referência. Genes *amdS* de outros fungos também podem ser usados, por exemplo, aqueles revelados em WO 97/06261.

Um ácido nucleico que codifica um marcador selecionável é preferivelmente introduzido em uma célula hospedeira no mesmo vetor como o que codifica uma proteína de acordo com a invenção ou pode se introduzido em um vetor separado como, por exemplo, um vetor suicida, que não pode replicar nas células hospedeiras. As células transformadas de forma estável com o ácido nucleico introduzido podem ser identificadas por seleção de medicamento (por exemplo, células que têm incorporado o gene de marcador selecionável sobreviverão enquanto as outras células morrem).

A invenção também fornece um polipeptídeo isolado que tem uma seqüência de aminoácidos de acordo com Id. de Seq. N°s: 2, ou 7, respectivamente ou uma seqüência de aminoácidos obtenível por expressão de um polinucleotídeo da presente invenção, como, por exemplo, uma seqüência de polinucleotídeos de acordo com Id. de Seq. N°s: 1 ou 6, respectivamente em um hospedeiro adequado.

Em uma outra modalidade, é fornecido um polipeptídeo que tem a atividade de uma proteína TS08 ou TS09, em que o

referido polipeptídeo é polipeptídeo tendo uma seqüência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de homologia, como 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou 99,5% com a seqüência de aminoácidos de Id. de Seq. N°: 2, ou Id. de Seq. N°: 7, respectivamente.

Polipeptídeos (os termos "polipeptídeo" e "proteína" são usados de forma intercambiável nessa) de acordo com a invenção podem conter apenas substituições conservadoras de um ou mais aminoácidos nas seqüências de aminoácidos representadas por Id. de Seq. N°s: 2, 7, 11 ou 17, ou substituições, inserções ou deleções de aminoácidos não essenciais. Portanto, um aminoácido não essencial é um resíduo que pode ser alterado nas seqüências de aminoácidos mostradas em Id. de Seq. N°s: 2, 7, 11 ou 17 sem alterar substancialmente a função biológica. Por exemplo, resíduos de aminoácido que são conservados entre as proteínas da presente invenção, são previstos para serem particularmente não propensos a alteração. Além disso, aminoácidos conservados entre as proteínas de acordo com a presente invenção e outras proteínas TS08, TS09, CS07 e/ou BS08 provavelmente não são propensas a alteração.

O termo "substituição conservadora" deve significar uma substituição em que o resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido que tem uma cadeia lateral similar. Essas famílias são conhecidas na técnica e incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina e histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (por exemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina,

cisteína), cadeias laterais não polares (por exemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais beta-ramificadas (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina).

Como acima mencionado, os polinucleotídeos da invenção podem ser utilizados na construção genética de uma célula hospedeira adequada para torná-la melhor e mais eficiente na fermentação, por exemplo, em um processo de fermentação para ácido cítrico.

De acordo com a invenção uma célula hospedeira geneticamente construída/recombinantemente produzida (também referida como célula recombinante ou célula transformada) que porta tal polinucleotídeo modificado em que a função da proteína ligada é significativamente modificada em comparação a uma célula de tipo selvagem de modo que o rendimento, produção e/ou eficiência de produção de um ou mais produtos da fermentação como ácido cítrico é melhorado. A célula hospedeira pode ser selecionada de um microorganismo capaz de produzir um ou mais produtos da fermentação como, por exemplo, ácido cítrico a partir de um carboidrato, como fungos filamentosos, em particular *Aspergillus*, preferivelmente *Aspergillus niger*, mais preferivelmente *A. niger* CBS 513.88.

Uma "célula transformada" ou "célula recombinante" é uma célula em que (ou em um ancestral da qual) foi introduzido, por meio de técnicas de DNA recombinante, um ácido nucleico de acordo com a invenção, ou em que a atividade da proteína TS08, TS09, CS07 foi aumentada e/ou

melhorada e/ou a atividade da proteína BS08 foi diminuída ou abolida. Células hospedeiras adequadas incluem células de microorganismos capazes de produzir um dado produto da fermentação, por exemplo, conversão de um dado carboidrato em ácido cítrico. Em particular, essas incluem cepas selecionadas do grupo de fungos filamentosos, preferivelmente de *Aspergillus*, mais preferivelmente de *A. niger*, *A. awamori*, *A. aculeatus*, *A. japonicus*, *A. oryzae*, *A. vadensis*, *A. carbonarius*, *A. tubingensis*, *A. lacticoffeatus*, *A. brasiliensis*, *A. piperis*, *A. costaricensis* ou *A. foetidus*, ainda mais preferivelmente *A. foetidus* var. *acidus* ou *A. foetidus* var. *pallidus*, ainda mais preferivelmente de *A. niger* var. *awamori*, ainda mais preferivelmente de *A. niger* ATCC1015 e mais preferivelmente de *A. niger* CBS 513.88.

Uma melhor expressão de gene pode ser atingida por modificação do gene de TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou TS08/TS09/CS07, por exemplo, por introdução de uma ou mais mutações no gene de TS08, TS09 e/ou CS07 em que a referida modificação leve a uma proteína TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou TS08/TS09/CS07 com uma função que é significativamente melhorada em comparação à proteína de tipo selvagem.

Portanto, em uma outra modalidade, o polinucleotídeo que porta pelo menos uma mutação é derivado de um polinucleotídeo selecionado do grupo de Id. de Seq. N°s: 1, 6 e/ou 11, ou equivalentes desses.

Uma mutação como aqui usado pode ser qualquer mutação que leva a um polipeptídeo mais funcional ou mais estável, por exemplo, produtos de gene mais funcionais ou mais

estáveis de TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou TS08/TS09/CS07. Isso pode incluir, por exemplo, uma alteração no genoma de um microorganismo, que melhora a síntese de uma proteína TS08, TS09, CS07, 5 TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou TS08/TS09/CS07 ou leva à expressão de uma proteína TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou TS08/TS09/CS07 com uma seqüência de aminoácidos alterada cuja função comparada com a contraparte de tipo selvagem que tem uma seqüência de 10 aminoácidos não alterada é melhorada e/ou aumentada. A melhoria pode ocorrer no nível de transcrição, tradução ou pós-tradução.

A alteração no genoma do microorganismo pode ser obtida, por exemplo, por substituição através de uma 15 recombinação de cruzamento único ou duplo de uma seqüência de DNA de tipo selvagem por uma seqüência de DNA que contém a alteração. Para seleção conveniente de transformantes do microorganismo com a alteração em seu genoma a alteração pode, por exemplo, ser uma seqüência de DNA que codifica um 20 marcador de resistência a antibióticos ou um gene que complementa uma possível auxotrofia do microorganismo. Mutações incluem, mas não são limitadas a, mutações de deleção-inserção.

Uma alteração no genoma do microorganismo que leva a 25 um polipeptídeo mais funcional também pode ser obtida por mutagenização aleatória do genoma do microorganismo com o uso, por exemplo, de mutágenos químicos, radiação ou transposons e seleção ou rastreamento por mutantes que são produtores melhores ou mais eficientes de um ou mais 30 produtos da fermentação. Métodos padrão para rastreamento e

seleção são conhecidos por uma pessoa habilitada.

Em uma modalidade específica, é desejado abolir ou suprimir um repressor do gene de TS08, TS09 e/ou CS07 da presente invenção, ou seja, quando sua expressão de gene repressor é artificialmente suprimida para melhorar o rendimento, produtividade, e/ou eficiência de produção do produto da fermentação quando introduzido em uma célula hospedeira adequada. Métodos de fornecer *knockouts* bem como microorganismos que carregam tais genes suprimidos são bem conhecidos na técnica. A supressão do gene repressor pode ser induzida por deleção de pelo menos uma parte do gene repressor ou da região reguladora desse. Como aqui usado, "supressão da expressão do gene" inclui supressão completa e parcial, bem como supressão sob condições específicas e também supressão da expressão de um dos dois alelos.

Para melhorar a produção de ácido cítrico de uma célula hospedeira recombinante em que a atividade de TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou TS08/TS09/CS07 é aumentada ou melhorada, a expressão de gene de BS08 pode ser inibida naquele organismo, por exemplo, por direcionamento da seqüências de nucleotídeos complementares à região reguladora de uma seqüência de nucleotídeos de BS08 (por exemplo, um promotor de BS08 e/ou intensificadores) para formar estruturas helicoidais triplas que evitam a transcrição de um gene de BS08 em células alvo. Veja, de modo geral, Helene, C. (1991) *AnticancerDrugDes.* 6 (6): 569-84; Helene, C. e cols. (1992) *Ann. N. Y Acad Sci.* 660: 27-36; e Maher, L. J. (1992) *Bioassays* 14 (12): 807-15.

A inibição ou prevenção da expressão de gene pode ser

atingida por modificação de um gene que codifica BS08, por exemplo, por introdução de uma ou mais mutações no gene que codifica BS08 em que a referida modificação leva a uma proteína BS08 com uma função que é significativamente
5 diminuída em comparação à proteína de tipo selvagem.

Portanto, em uma outra modalidade, o polinucleotídeo que carrega pelo menos uma mutação é derivado de um polinucleotídeo que codificam um polipeptídeo BS08 como representado por Id. de Seq. N°: 16 ou equivalentes desses.

10 Uma mutação como aqui usado pode ser qualquer mutação que leva a um polipeptídeo menos funcional ou instável, por exemplo, produtos de gene de BS08 menos funcionais ou instáveis. Isso pode incluir, por exemplo, uma alteração no genoma de um microorganismo, que interfere com a síntese de
15 BS08 ou leva à expressão de uma proteína BS08 com uma seqüência de aminoácidos alterada cuja função comparada com a contraparte de tipo selvagem que tem uma seqüência de aminoácidos não alterada é completamente ou parcialmente destruída. A interferência pode ocorrer no nível de
20 transcrição, tradução ou pós-tradução.

A alteração no genoma do microorganismo pode ser obtida, por exemplo, por substituição através de uma recombinação de cruzamento único ou duplo de uma seqüência de DNA de tipo selvagem por uma seqüência de DNA que contém
25 a alteração. Para seleção conveniente de transformantes do microorganismo com a alteração em seu genoma a alteração pode, por exemplo, ser uma seqüência de DNA que codifica um marcador de resistência a antibióticos ou um gene que complementa uma possível auxotrofia do microorganismo.
30 Mutações incluem, mas não são limitadas a, mutações de

deleção-inserção.

Uma alteração no genoma do microorganismo que leva a um polipeptídeo menos ou não funcional também pode ser obtida por mutagenização aleatória do genoma do microorganismo com o uso, por exemplo, de mutágenos químicos, radiação ou transposons e seleção ou rastreamento por mutantes que são produtores melhores ou mais eficientes de um ou mais produtos da fermentação. Métodos padrão para rastreamento e seleção são conhecidos por uma pessoa habilitada.

Em uma modalidade específica, é desejado suprimir o gene que codifica BS08 da presente invenção, ou seja, quando sua expressão de gene é artificialmente suprimida para melhorar o rendimento, produtividade, e/ou eficiência de produção do produto da fermentação quando introduzido em uma célula hospedeira adequada. Métodos de fornecer *knockouts* bem como microorganismos que carregam tais genes suprimidos são bem conhecidos na técnica. A supressão do gene de BS08 endógeno pode ser induzida por deleção de pelo menos uma parte do gene ou da região reguladora desse.

Como aqui usado, "supressão da expressão do gene" inclui supressão completa e parcial, bem como supressão sob condições específicas e também supressão da expressão de um dos dois alelos.

Para criar um microorganismo *knockout* em que a expressão de um gene de BS08 é artificialmente suprimida, primeiro o gene de BS08 pode ser clonado e então um vetor para recombinação homóloga pode ser construído pelo uso do gene para inativar o gene de BS08 endógeno no microorganismo alvo. O vetor para recombinação homóloga

então contém uma seqüência de ácidos nucleicos desenhada para inativar o gene endógeno de BS08 no microorganismo alvo. Tal ácido nucleico pode ser, por exemplo, uma seqüência de ácidos nucleicos do gene de BS08 ou a região reguladora desse, como a região flanqueadoras existente do gene a ser inativado (em cis), ou existente separadamente (em trans), contendo pelo menos uma deleção parcial, ou alternativamente ele pode ser uma seqüência de ácidos nucleicos do gene de BS08 ou a região reguladora desse que contém outros genes. O rompimento e substituição de gene são revelados em EP 635 574 e WO 98/46772 e WO 05/095624. Um gene que também pode funcionar como um marcador é preferivelmente selecionado como o gene a ser inserido no gene de BS08 ou a região reguladora desse. Os genes inseridos a serem usados incluem, por exemplo, genes de resistência a medicamento como acima definido. Não há qualquer limitação particular sobre a posição em que os genes podem ser inseridos no gene de BS08, desde que a inserção naquela posição resulte na supressão da expressão do gene endógeno de BS08 no alvo. Para evitar efeitos polares da inserção, deleções silenciosas em estrutura podem ser introduzidas pelo uso, por exemplo, do sistema sacB ou PCR de homologia de flanqueamento longo. Essas técnicas são bem conhecidas por pessoa habilitada na técnica.

As estratégias de mutagênese anteriormente mencionadas para proteínas BS08 podem resultar em rendimento aumentados de um composto desejado em particular ácido cítrico. Essa lista não deve ser limitante; variações dessas estratégias de mutagênese estarão facilmente aparentes para pessoa de

habilidade comum na técnica. Por esses mecanismos, o ácido nucleico e moléculas de proteína da invenção podem ser utilizados para gerar microorganismos como *Aspergillus niger* ou cepas relacionadas de fungos que expressam ácido nucleico e moléculas de proteína BS08 mutados de modo que o rendimento, produtividade, e/ou eficiência de produção de um composto desejado, como ácido cítrico é melhorada.

As estratégias de mutagênese anteriormente mencionadas para uma proteína TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, TS08/TS09/CS07, TS08/BS08, TS09/BS08, CS07/BS08, TS08/TS09/BS08, TS08/CS07/BS08, TS09/CS07/BS08, ou TS08/TS09/CS07/BS08 podem resultar em rendimento aumentados de um composto desejado em particular ácido cítrico. Essa lista não deve ser limitante; variações dessas estratégias de mutagênese estarão facilmente aparentes para pessoa de habilidade comum na técnica. Por esses mecanismos, o ácido nucleico e moléculas de proteína da invenção podem ser utilizados para gerar microorganismos como *Aspergillus niger* ou cepas relacionadas de que expressam ácido nucleico e moléculas de proteína TS08, TS09, CS07 e/ou BS08 mutada de modo que o rendimento, produtividade, e/ou eficiência de produção de um composto desejado, como ácido cítrico é melhorada.

Em um aspecto da invenção, são fornecidos microorganismos (em particular fungos filamentosos como *Aspergillus*) que são capazes de produzir ácido cítrico a partir de um carboidrato adequado como, por exemplo, glicose, frutose, sacarose, melado, mandioca, amido ou milho. A medição de ácido cítrico é feita por simples titulação ácido-base com NaOH mantendo em mente que todos

os ácidos são medidos desse modo. Para medir ácido cítrico na presença de outros ácidos, HPLC é usada (por exemplo, com coluna de troca aniônica IonPac AS-11 de Dionex, como descrito em seu pedido publicamente disponível nota nº 123

5 de Dec. 1998 "The determination of inorganic anions and organic acids in fermentation broths", Dionex Corp., Sunnyvale, California). Quando medidos, por exemplo, por HPLC ou titulação, esses organismos são capazes de produzir ácido cítrico a partir de sacarose até um nível de 100 g/l

10 respectivamente. Em um outro aspecto da invenção, é fornecido um microorganismo capaz de produzir ácido cítrico em quantidades de 300 g/l quando produzido por fermentação submersa iniciando de sacarose. Tal pode ser realizado por aumento da atividade de um polipeptídeo TS e/ou CS,

15 preferivelmente um polipeptídeo TS08, TS09 e/ou CS07. O rendimento de ácido cítrico produzido a partir, por exemplo, de sacarose pode ser tão alto quanto 1, 5, 2, 4, 10, 20, 50 g/l ou mesmo exceder 400, 600, 1000 g/l. Tal pode ser realizado por aumento ou melhoria da atividade de

20 um polipeptídeo TS, ou CS, preferivelmente um polipeptídeo TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou TS08/TS09 e CS07, opcionalmente combinado com diminuição ou eliminação da atividade de uma proteína BS, preferivelmente uma proteína BS08. O rendimento de ácido cítrico produzido

25 a partir, por exemplo, de sacarose pode ser tão alto quanto 1, 5, 2, 4, 10, 20, 50 g/l ou mesmo exceder 400, 600, 1000 g/l. O rendimento de ácido cítrico que usa um microorganismo que carrega o gene modificado como aqui descrito pode ser aumentado em pelo menos 1%, 2%, 3%, 4%,

30 8%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 100%, 200%, 500% ou mais

comparado à quantidade de ácido cítrico produzida pela cepa de tipo selvagem como, por exemplo, *A. niger* CBS 513.88.

O microorganismo recombinante que carrega, por exemplo, um gene modificado de TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, 5 TS08/CS07, TS09/CS07, TS08/TS09/CS07, TS08/BS08, TS09/BS08, CS07/BS08, TS08/TS09/BS08, TS08/CS07/BS08, TS09/CS07/BS08, ou TS08/TS09/CS07/BS08 e que é capaz de produzir o produto da fermentação em rendimento, produtividade, e/ou eficiência significativamente maior pode ser cultivado em 10 um meio aquoso suplementado com nutrientes adequados sob condições adequadas. A produção de ácido cítrico pode ser conduzida via fermentação submersa ou de superfície iniciando a partir de diferentes carboidratos e/ou materiais brutos.

15 Em uma modalidade, ácido cítrico é produzido via fermentação submersa iniciando a partir de um carboidrato, material bruto como, por exemplo, mandioca e/ou milho, que pode ser moído e misturado com água. Uma fermentação de semente pode ser preparada em um fermentador separado. A 20 liquefação do amido pode ser realizada na presença de uma enzima amilolítica como, por exemplo, amilases, celulasas, lactases ou maltases e aditivos e nutrientes como anti-espuma podem ser adicionados antes ou durante a fermentação. Para a fermentação principal, a concentração 25 de carboidrato, por exemplo, amido, na mistura pode ser na faixa de 150 a 200 g/l, preferivelmente cerca de 180 g/l.

Em uma modalidade adicional, ácido cítrico é produzido via fermentação de superfície iniciando a partir de um carboidrato material bruto, como, por exemplo, uma mistura 30 de melado de beterraba ou cana ou sacarose.

As moléculas de ácido nucleico, polipeptídeos, vetores, iniciadores, e microorganismos recombinantes aqui descritos podem ser usados em um ou mais dos seguintes métodos: identificação de *Aspergillus niger* e organismos relacionados; mapeamento de genomas de organismos relacionados a *Aspergillus niger*, identificação e localização de seqüências de *Aspergillus niger* de interesse; estudos de evolução; determinação de regiões de proteína TS08, TS09, CS07 e/ou BS08 necessárias para função; modulação de uma atividade ou função da proteína TS08, TS09, CS07 e/ou BS08; modulação da atividade de uma via de TS; e modulação da produção celular de um composto desejado, como ácido cítrico.

A invenção fornece métodos para rastreamento de moléculas que modulam a atividade de uma proteína TS08, TS09 e/ou CS07, por interação com a proteína em si ou um substrato ou parceiro de ligação de uma proteína TS08, TS09 e/ou CS07, ou por modulação da transcrição ou tradução de uma molécula de ácido nucleico de TS08, TS09, CS07 e/ou SB08 da invenção. Em tais métodos, um microorganismo que expressa uma proteína TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, TS08/TS09/CS07, TS08/BS08, TS09/BS08, CS07/BS08, TS08/TS09/BS08, TS08/CS07/BS08, TS09/CS07/BS08, ou TS08/TS09/CS07/BS08 da invenção faz contato com um ou mais compostos de teste, e o efeito de cada composto de teste sobre a atividade ou nível de expressão da proteína TS08, TS09, CS07 e/ou BS08 é avaliado.

A atividade biológica, enzimática ou outra de proteínas TS, CS e/ou BS pode ser medida por métodos bem conhecidos por uma pessoa habilitada, como, por exemplo,

por incubação de uma fração de membrana contendo a proteína TS08, TS09, CS07 e/ou BS08 com o açúcar marcado radioativamente, álcool de açúcar ou carboxilatos que podem ser ativamente transportados por uma proteína TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, TS08/TS09/CS07, TS08/BS08, TS09/BS08, CS07/BS08, TS08/TS09/BS08, TS08/CS07/BS08, TS09/CS07/BS08, ou TS08/TS09/CS07/BS08. A incorporação de radioatividade na massa de célula é diretamente proporcional à atividade do transportador.

Portanto, por exemplo, a atividade de um transportador pode ser medida em um ensaio em que células intactas contendo transportador específico são incubadas na presença de tampão de fosfato em pH 6 e a fonte de carbono radioativamente marcada, como, por exemplo, glicose. A taxa de assimilação da fonte de carbono radioativo como, por exemplo, glicose pelas células pode ser medida por métodos conhecidos por uma pessoa habilitada, e é diretamente proporcional à atividade de proteína TS, CS e/ou BS presente na fração de membrana.

Em um ensaio alternativo, a atividade biológica, enzimática ou outra atividade das proteínas TS, CS e/ou BS pode ser medida por métodos bem conhecidos por uma pessoa habilitada, como, por exemplo, por complementação de um mutante de rompimento de *Saccharomyces* a um gene transportador correspondente (ortólogo) com um clone de cDNA de *A. niger* que codifica uma proteína TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, TS08/TS09/CS07, TS08/BS08, TS09/BS08, CS07/BS08, TS08/TS09/BS08, TS08/CS07/BS08, TS09/CS07/BS08, ou TS08/TS09/CS07/BS08 da invenção. A complementação positiva de um transportador

menos fenótipo é uma indicação para atividade de transportador.

Pode ser evidente a partir da descrição acima que o produto da fermentação do métodos de acordo com a invenção
5 pode não ser limitado a ácido cítrico isoladamente. O "composto desejado" ou "produto da fermentação" como aqui usado pode ser quaisquer produtos naturais ou heterólogos de *Aspergillus niger*, que incluam os produtos finais e intermediários das vias de biossíntese, como, por exemplo,
10 metabólitos primários e secundários como, por exemplo, beta-lactamas, proteínas ou enzimas em particular a geração biossintética de ácido cítrico.

Portanto, a presente invenção é direcionada ao uso de um polinucleotídeo, polipeptídeo, vetor, iniciador e
15 microorganismo recombinante como aqui descrito na produção de ácido cítrico, ou seja, a conversão de uma fonte de carbono em ácido cítrico. Em uma modalidade preferida, um polinucleotídeo modificado, polipeptídeo, vetor e microorganismo recombinante como aqui descritos é usado
20 para melhorar o rendimento, produtividade, e/ou eficiência da produção de ácido cítrico.

Os termos "produção" ou "produtividade" são reconhecidos na técnica e incluem a concentração do produto da fermentação (por exemplo, ácido cítrico) formado em dado
25 tempo e um dado volume de fermentação (por exemplo, kg de produto por hora por litro). O termo "eficiência de produção" inclui o tempo necessário para um nível particular de produção ser atingido (por exemplo, quanto tempo leva para a célula atingir uma taxa particular de
30 resultado da produto da fermentação). O termo "rendimento"

é reconhecido na técnica e inclui a eficiência da conversão de o carboidrato no produto (ou seja, ácido cítrico). Isso é geralmente escrito como, por exemplo, kg de produto por kg de fonte de carbono. Por "aumento do rendimento e/ou 5 produção", ou aumento da performance de produção" do composto entende-se que a quantidade de moléculas recuperadas, ou de moléculas recuperadas úteis daquele composto em uma dada quantidade de cultura por uma dada quantidade de tempo é aumentada. Os termos "biossíntese" ou 10 uma "via biossintética" são reconhecidos na técnica e incluem a síntese de um composto, preferivelmente um composto orgânico, por uma célula de compostos intermediários em que pode ser um processo de multi-etapas e processo altamente regulado. A palavra "metabolismo" é 15 reconhecida na técnica e inclui a totalidade das reações bioquímicas que ocorrem em um organismo. O metabolismo de um composto particular, então, (por exemplo, o metabolismo de um aminoácido como glicina) compreende as vias biossintéticas, de modificação, e de degradação gerais na 20 célula relacionada a esse composto. A palavra "transporte" ou "importação" é reconhecida na técnica e inclui o movimento facilitado de uma ou mais moléculas por toda a membrana celular através da qual a molécula seria incapaz de passar ou passaria de forma ineficiente.

25 Ácido cítrico como aqui usado pode ser qualquer forma química de ácido cítrico encontrada em soluções aquosas, como, por exemplo, não dissociada, em sua forma livre ou dissociada como um ânion. A forma de sal solubilizado de ácido cítrico pode ser caracterizada como o ânion na 30 presença de qualquer tipo de cátions comumente encontrados

em sobrenadantes de fermentação, como, por exemplo, potássio, sódio, cálcio ou amônio. Também podem ser incluídos cristais isolados da forma de ácido livre de ácido cítrico. Por outro lado, cristais isolados de uma
5 forma de sal de ácido cítrico são chamados por seu nome de sal correspondente, ou seja, citrato de sódio, citrato de potássio, citrato de cálcio e outros.

Em uma modalidade preferida, a presente invenção é relacionada a um processo para a produção de ácido cítrico
10 em que um nucleotídeo de acordo com a invenção ou uma seqüência de polinucleotídeos modificada como acima descrito é introduzida em um microorganismo adequado, o microorganismo recombinante é cultivado sob condições que permitem a produção de ácido cítrico em alta produtividade,
15 rendimento, e/ou eficiência, o produto da fermentação produzido é isolado do meio de cultura e opcionalmente também purificado.

Em um aspecto adicional, o processo para a produção de ácido cítrico como acima descrito pode ser combinado com
20 etapas adicionais de separação e/ou purificação do ácido cítrico produzido a partir de outros componentes no caldo de fermentação, ou seja, as chamadas etapas de processamento *downstream*. Essas etapas podem incluir qualquer meio conhecido por pessoa habilitada, como, por
25 exemplo, concentração, cristalização, precipitação, adsorção, troca iônica, eletrodialise, eletrodialise de membrana bipolar e/ou osmose reversa. Ácido cítrico pode ser também purificado como a forma de ácido livre ou qualquer uma de suas formas de sal conhecidas por meio de
30 operações como, por exemplo, tratamento com carbono

ativado, troca iônica, adsorção e eluição, concentração, cristalização, filtração e secagem. A combinação dessas etapas mencionadas, por exemplo, eletrodiálise e eletrodiálise de membrana bipolar em uma etapa deve ser
5 também usada bem como combinação das etapas mencionadas, por exemplo, várias etapas da troca iônica por uso de métodos de cromatografia de leito móvel simulado. Qualquer um desses procedimentos isoladamente ou em combinação constitui um meio conveniente para isolamento e purificação
10 do produto, ou seja ácido cítrico. O produto assim obtido pode ser também isolado em uma maneira como, por exemplo, por concentração, cristalização, precipitação, lavagem e secagem dos cristais e/ou purificado por, por exemplo, tratamento com carbono ativado, troca iônica e/ou
15 recristalização.

O procedimento de processamento *downstream* pode incluir, por exemplo, o isolamento de ácido cítrico por meio de precipitação com cal, cromatografia ou extração de solvente. A purificação pode incluir tratamento com carbono
20 ativado, etapas de troca iônica, cristalização e/ou filtração. As formas do produto final são obtidas por concentração e cristalização, ou para as formas de sal, por neutralização de ácido cítrico com a base desejada (como NaOH, KOH, NH₃ e outras). Esses cristais podem ser
25 separados, lavados e secos. Se necessário, os cristais podem ser novamente ressolubilizados em água, tratados com carbono ativado e/ou resinas de troca iônica e recristalizados. Esses cristais podem então ser separados, lavados e secos.

30 Ácido cítrico pode ser convertido, por exemplo, em

citrato monossódico, citrato trissódico, citrato tricálcico, dihidrato citrato trissódico, citrato tripotássico, citrato monossódico anidro, ou cristalizado como ácido cítrico anidro ou ácido cítrico monohidrato.

5 Ácido cítrico e seus sais como produzido por um método aqui descrito pode ser também usados como ingrediente ou aditivo para, por exemplo, alimento (como, por exemplo, produtos de confeitaria, alimentos para bebês, gorduras e óleos, doces, queijo, produtos laticínios), bebidas como,
10 por exemplo, refrigerantes carbonados, xaropes, sucos de frutas e drinques, vinhos, chás prontos para beber), fármacos (como, por exemplo, comprimidos, xaropes, suspensões/soluções), agentes de limpeza e detergentes (como, por exemplo, sabão desodorante, líquidos/pós de
15 lavagem de louça), em produtos de higiene pessoal (como, por exemplo, xampus, cremes e loções, produtos de higiene, pastas de dente) ou em outras aplicações industriais como em adesivos, alimentação animal, fotoquímicos e outros.

Portanto, em uma modalidade a presente invenção é
20 relacionada a produtos alimentícios, bebidas, fármacos, agentes de limpeza, detergente ou produto de higiene pessoal que compreendem ácido cítrico como produzido por um processo aqui descrito.

Essa invenção é também ilustrada pelos exemplos a
25 seguir que não devem ser interpretados como limitantes. O conteúdo de todas as referências, pedidos de patente, patentes e pedidos de patente publicados, citados por todo esse pedido são aqui incorporados por referência.

EXEMPLOS

30 **Cepas**

WT 1: Essa cepa de *A. niger* é usada como uma cepa de tipo selvagem. Essa cepa é depositada no Instituto CBS sob o número de depósito CBS 513.88.

WT 2: Essa cepa de *A. niger* é uma cepa de tipo selvagem 1 que compreende uma deleção do gene que codifica glicoamilase (*glaA*). WT 2 foi construída pelo uso da abordagem "MARKER-GENE FREE" como descrito em EP 0 635 574 B1. Essa patente revela como deletar seqüências de DNA específicas de *glaA* no genoma de CBS 513.88. O procedimento resultou em uma cepa de *A. niger* recombinante MARKER-GENE FREE delta-g/aA CBS 513.88, que não possui seqüências de DNA estanhas.

WT 3: Essa cepa de *A. niger* é uma cepa de tipo selvagem 2 que compreende uma mutação que resulta em uma cepa de *A. niger* deficiente de oxalato. WT 3 foi construída pelo uso do método como descrito em EP1590444. Esse pedido de patente, revela como rastrear por cepa de *A. niger* deficiente de oxalato. A cepa WT3 foi construída de acordo com o métodos dos exemplos 1 e 2 de EP1590444, a cepa WT 3 é cepa mutante 22 de EP1590444 (designada FINAL em EP1590444).

Exemplo 1

Preparação de DNA cromossômico e amplificação de fragmento de DNA por PCR

DNA cromossômico de *Aspergillus niger* CBS 513.88 foi preparado a partir de células cultivadas em frascos de 500 ml com septo com 100 ml de caldo de fermentação (MM-G) como indicado a 30°C e 15,7 rad/s por 16-20 h. Meio MM-G contém por litro: 20 g D-glicose, 6 g NaNO₃, 0,25 g KCl, 1,5 g KH₂PO₄, 1,13 ml 4 M KOH, 0,5 g MgSO₄.7H₂O, 1 ml de elementos

de traço de estoque (elementos de traço de estoque por litro: 22 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 11 g H_3BO_3 , 5 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,7 g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 1,6 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 5 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 1,5 g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 50 g EDTA, ajustado ao pH 6,5 com 4 M KOH, esterilizado por filtro e estocado no escuro a 4°C). Fermentação de agitação de frasco e isolamento de DNA cromossômico estão descritas em maiores detalhes em WO 98/46772.

Fragmentos de DNA foram preparados por PCR com o DNA cromossômico preparado acima e um conjunto de iniciadores, Pf (Id. de Seq. N°s: 3, 8, 13 e 18 respectivamente) e Pr (Id. de Seq. N°s: 4, 9, 14 e 19, respectivamente). Para a reação, a Pfx polymerase de platina (Invitrogen) e 50 ng do DNA cromossômico foram usados em volume total de 50 µl de acordo com as instruções do fornecedor para gerar os produtos respectivos de PCR contendo as seqüências de DNA respectivas (Id. de Seq. N°s: 1, 6, 11 e 16). Os produtos de PCR foram recuperados da mistura de reação e as seqüências corretadas foram confirmadas.

20 **Construção de vetores de superexpressão e knock-out**

Técnicas de clonagem e de isolamento de DNA de plasmídeo foram realizadas de acordo com princípios conhecidos e técnicas rotineiras de isolamento de plasmídeo (Sambrook, J. e cols., 1989). Seqüências, que são candidatas para rompimento, compreendem a estrutura de leitura aberta (ORF) (com íntrons) e aproximadamente 1.500 por seqüência 5' e 3' dos genes. Um vetor de substituição de gene para o gene SB 08 foi desenhado de acordo com princípios conhecidos e construído de acordo com procedimentos rotineiros de clonagem (veja, a Figura 1). Em essência, esses vetores

compreendem aproximadamente 1.500 por regiões flanqueadoras da ORF SB 08, para recombinação homóloga no lócus genômico de SB 08 predestinado. Em adição, eles contêm o marcador de seleção de *A. nidulans* bi-direcional amdS, em repetições 5 diretas. O desenho geral desses vetores de deleção foi previamente descrito em EP635574B e WO 98/46772.

Vetores de superexpressão para os genes de TS08, TS09 e CS07 foram desenhados de acordo com princípios conhecidos e construídos de acordo com procedimentos rotineiros de 10 clonagem. Exemplos do desenho geral de vetores de expressão e o uso de vetores de expressão para superexpressão de gene podem ser encontrados em WO199932617, WO200121779 e WO2005100573.

Em essência, vetores de expressão compreendem pelo 15 menos um promotor e terminador para expressão adequada de um gene. Os DNAs ou cDNAs genômicos de TS08, TS09 e CS07 como listado na Tabela 1, por exemplo, foram usados para clonagem e superexpressão dos genes mencionados. Um marcador de seleção para transformação, como o marcador de 20 seleção de *A. nidulans* bi-direcional amdS pode estar no vetor ou pode ser usado como vetor separado em co-transformação. Exemplos de vetores de expressão com base em pGBTOP ou com base em pGBFIN podem ser encontrados na Figura 3 ou 4. todos os genes de TS08, TS09 e CS07 de *A.* 25 *niger* foram clonados em um vetor de superexpressão com base em pGBFIN. O vetor pGBFINMNR-1 é um exemplo de um vetor com base em pGBFIN para vetor de superexpressão da proteína TS08 (Figura 5).

Exemplo 2

30 Rompimento do gene de BS08 em *A. niger* WT3

DNA linear de um vetor de deleção digerido com enzimas de restrição adequadas, como pGBDEL-SODA (Figura 3), foi isolado e usado para transformar *A. niger* WT 3 com o uso dos métodos anteriormente descritos (Biotechnology of Filamentous fungi: Technology and Products. (1992) Reed Publishing (USA); capítulo 6: Transformation páginas 113 a 156). Esse DNA linear pode se integrar no genoma no locus homólogo, assim substituindo o gene endógeno BS08, que codifica o polipeptídeo BS08, pelo gene de amdS. Uma ilustração desse evento é como mostrado na Figura 2. Transformantes foram selecionados em meio de acetamida e purificados de acordo com procedimentos padrão com descrito em EP 635 574. os esporos foram plaqueados em meio de flúor-acetamida para selecionar cepas, que perderam o marcador de amdS. As colônias em crescimento foram diagnósticos por PCR para integração no locus homólogo e cepas candidatas testadas por análise *Southern* para deleções do gene endógeno de BS08. A deleção do gene de BS08 foi detectável por redução de tamanho de aproximadamente 0,9 kb de fragmentos de DNA que cobrem o locus inteiro e hibridizados a marcadores adequados de seqüências flanqueadoras. Aproximadamente 3 cepas mostraram uma remoção do gene genômico de BS08 de um conjunto de aproximadamente 100 transformantes iniciais. A cepa delta BS08 foi selecionada como uma cepa representativa com o gene endógeno de *sodA* inativado.

Exemplo 3

Superexpressão dos genes de TS08, TS09 e CS07 em *A. niger* WT3 e delta BS08

Os genes de TS08, TS09 e CS07 obtidos no Exemplo 1

foram clonados em um vetor de superexpressão pGBFIN (WO99/32617). Após linearização com uma enzima de restrição adequada, o DNA linear foi usado para transformar *A. niger* cepa WT 3 e delta SB 08 [para transformação, veja, por exemplo, Biotechnology of Filamentous fungi: Technology and Products. (1992) Reed Publishing (USA); capítulo 6: Transformations páginas 113 a 156].

O DNA linear foi integrado no genoma e transformantes para *A. niger* que superexpressam TS08, TS09, e CS07 foram selecionados em meio de acetamida e purificados de acordo com procedimentos padrão com descrito em EP 635 574. A transformação e subsequente seleção de transformante são revelados em WO 98/46772. Cepas WT3-TS08, WT3-TS09, WT3-0507, delta BS08-TS08, delta BS08-TS09 e delta BS08-0507 foram selecionadas como cepas representativas com os genes indicados superexpressos e o gene endógeno de BS08 inativado, respectivamente.

Pelo uso de co-transformação como todas as três construções de superexpressão de pGBFIN (TS08, TS09 e CS07) foram construídas cepas que têm múltiplas construções de superexpressão (delta BS08-TS08/TS09, delta BS08-TS08/CS07, delta BS08-TS09/CS07 e delta BS08-TS08/TS09/CS07). Essas cepas foram diagnósticos e selecionadas por PCR para integração de um ou mais dos respectivos genes de interesse.

Cepas representativas, com um conjunto genético como indicado na Tabela 2, foram selecionadas para experimentos adicionais.

Cepa	TS08	TS09	CS07	BS08
WT 3				

delta BS08				delta
WT3- TS08	+			
WT3-TS09		+		
WT3-CS07			+	
WT3-TS08/TS09	+	+		
WT3-TS08/CS07	+		+	
WT3-TS09/CS07		+	+	
WT3- TS08/TS09/CS09	+	+	+	
delta BS08- TS08	+			Delta
delta BS08- TS09		+		Delta
delta BS08- CS07			+	Delta
delta BS08- TS08/TS09	+	+		Delta
delta BS08- TS08/CS07	+		+	Delta
delta BS08- TS09/CS07		+	+	Delta
delta BS08- TS08/TS09/CS07	+	+	+	delta

Tabela 2 constituição genética de clones obtidos de *Aspergillus niger*

Exemplo 4

Produção de ácido cítrico por fermentação de superfície co
5 o uso de rompimento e superexpressão de cepas de *A. niger*

Uma mistura de melado de beterraba e de cana foi diluída com água desmineralizada para obter 240 g de

sacarose por litro. A essa mistura 3 ml de ácido fosfórico 5%, 0,5 g $\text{Na}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$, 0,45 g carbono ativado em pó e 1,0 mg Zn foram adicionados. O pH foi ajustado a 6,15 com ácido sulfúrico e a mistura foi colocada em uma bandeja com uma profundidade de 10 cm. Essa bandeja foi pasteurizada a 70°C deixada para resfriar até 40°C. Os esporos das cepas transformadas de *A. niger* obtidas no Exemplo 3 bem como as cepas WT 3 e delta BS08 foram adicionados ao meio e as bandejas foram incubadas em uma sala climatizada em uma temperatura de 35°C e uma umidade relativa de pelo menos 70%. O micélio foi cultivado para formar uma camada na superfície do líquido e sacarose do líquido foi convertida a ácido cítrico. A fermentação foi interrompida quando a concentração de sacarose, glicose e frutose caiu abaixo de 4 g/l como medido por HPLC. Depois de pasteurização para interromper a atividade enzimática, a concentração de ácido cítrico no líquido foi medida por HPLC ou titulação. A performance de produção das várias cepas foi calculada como o rendimento de produção de ácido cítrico comparado ao rendimento da cepa WT3, que foi ajustado a 100%. As cepas de *A. niger* que superexpressam o gene de CS07, o gene de TS08 ou o gene de TS09, e cepas de *A. niger* que superexpressam combinações desses genes, produziram pelo menos aproximadamente 3% a mais de 20% mais de ácido cítrico que o obtido com a cepa de *A. niger* WT 3 quando cultivada sob as mesmas condições. Esses resultados são mostrados na Figura 6.

As cepas com o BS08 rompido produziram pelo menos aproximadamente 5% mais ácido cítrico sob as mesmas condições que as obtidas com a cepa WT 3 de *A. niger*. Nessa

situação de BS08 rompido, as cepas de *A. niger* que superexpressam o gene de CS07, o gene de TS08 ou p gene de TS09, e cepas de *A. niger* que superexpressam combinações desses genes, produziram pelo menos aproximadamente 1% a 5 mais de 15% mais de ácido cítrico que o obtido com a cepa de *A. niger* delta BS08 quando cultivada sob as mesmas condições. Esses resultados são mostrados na Figura 7.

Esses resultados confirmam que a superexpressão de TS08 e/ou TS09 e/ou CS07 tem um efeito positivo sobre a 10 produção de ácido cítrico na fermentação de superfície, que possivelmente pode ser combinada com rompimento de BS08 ou expressão reduzida, em uma célula produtora de ácido cítrico. Essa melhoria é encontrada em uma cepa com uma melhor base para a produção de ácido cítrico comparada ao 15 *A. niger* de tipo selvagem CBS513.88.

Exemplo 5

Produção de ácido cítrico por fermentação submersa com uso de rompimento e superexpressão de cepas de *A. niger*

O material bruto de carboidrato, por exemplo, mandioca 20 e/ou milho, foram moídos e misturados com água. Uma fermentação de semente é iniciada em um fermentador separado, contendo um caldo de farinha de milho como carboidrato, liquefeito com uma enzima amilolítica em uma temperatura de 90°C. Após resfriamento a 37°C, os esporos 25 da cepa WT 3, delta SB08 de *A. niger* ou as cepas transformantes de *A. niger* como construídas no Exemplo 3 foram colocadas no fermentador e a fermentação de semente foi realizada em uma taxa de fluxo de ar de 0,1 a 0,2 vvm e a temperatura foi controlada a 37°C. Depois de 30 aproximadamente 20 horas, o conteúdo do fermentador de

semente foi transferido para o fermentador principal. O fermentador principal foi preparado com uma mistura de farinha de milho e/ou mandioca por adição de água, aditivos e nutrientes, em que a concentração de carboidrato na
5 mistura foi preferivelmente 180 g/l e uma enzima amilolítica e anti-espuma foram adicionados. Depois de aquecimento a 90°C para liquefazer o amido e subseqüentemente resfriamento a 35°C, o conteúdo do fermentador de semente foi transferido para o fermentador
10 principal. Depois da transferência, a fermentação foi controlada por resfriamento em uma taxa de fluxo de ar de 0,1 vvm e interrompida quando o carboidrato foi consumido, o que levou tipicamente 60 - 100 horas. A concentração de ácido cítrico no líquido foi medida por HPLC ou titulação.
15 A performance das várias cepas foi calculada como o rendimento de produção de ácido cítrico comparado ao rendimento da cepa WT3, que foi ajustado a 100%. O rendimento de monohidrato de ácido cítrico obtido por conversão de glicose foi de pelo menos aproximadamente 1% a
20 acima de 8% mais para cepas de *A. niger* que superexpressam o gene de CS07, o gene de TS08 ou o gene de TS09, e cepas de *A. niger* que superexpressam combinações desses genes, que o obtido com a cepa WT 3 de *A. niger* quando cultivadas sob as mesmas condições. Esses resultados são mostrados na
25 Figura 8.

Em adição, as cepas com o BS08 rompido produziram pelo menos aproximadamente 5% mais ácido cítrico sob as mesmas condições que as obtidas com a cepa WT 3 de *A. niger*. Nessa situação de BS08 rompido, as cepas de *A. niger* que
30 superexpressam o gene de CS07, o gene de TS08 ou p gene de

TS09, e cepas de *A. niger* que superexpressam combinações desses genes, produziram pelo menos aproximadamente 15% ou mais de ácido cítrico que o obtido com a cepa de *A. niger* delta BS08 quando cultivada sob as mesmas condições. Esses resultados são mostrados na Figura 9.

Esses resultados confirmam que a superexpressão de TS08 e/ou TS09 e/ou CS07 tem um efeito positivo sobre a produção de ácido cítrico na fermentação submersa, que possivelmente pode ser combinada com rompimento de BS08 ou expressão reduzida, em uma célula produtora de ácido cítrico. Essa melhoria é encontrada em uma cepa com uma melhor base para a produção de ácido cítrico comparada ao *A. niger* de tipo selvagem CBS513.88.

REIVINDICAÇÕES

1. Polinucleotídeo TS08 e/ou TS09 caracterizado por ser selecionado do grupo que consiste em:

(a) polinucleotídeos que codificam um polipeptídeo
5 TS08 ou TS09 que compreende uma seqüência de aminoácidos de acordo com Id. de Seq. N°: 2 ou Id. de Seq. N°: 7, respectivamente;

(b) polinucleotídeos que compreendem uma seqüência de nucleotídeos de acordo com Id. de Seq. N°: 1 ou Id. de Seq.
10 N°: 6;

(c) polinucleotídeos que compreendem uma seqüência de nucleotídeos obtenível por amplificação de ácido nucleico como reação em cadeia de polimerase, usando DNA genômico de um microorganismo como um modelo e um conjunto de iniciador
15 de acordo com Id. de Seq. N°:3 e Id. de Seq. N°:4, ou Id. de Seq. N°:8 e Id. de Seq. N°:9, respectivamente;

(d) polinucleotídeos que compreendem uma seqüência de nucleotídeos que codifica um fragmento ou derivado de um polipeptídeo codificado por um polinucleotídeo de qualquer
20 um de (a) a (c) em que no referido derivado um ou mais resíduos de aminoácido são substituídos de modo conservador comparados ao referido polipeptídeo, e o referido fragmento ou derivado tem a atividade de um polipeptídeo TS08 ou TS09;

(e) polinucleotídeos cujo filamento complementar hibridiza sob condições rigorosas a um polinucleotídeo como definido em qualquer um de (a) a (d) e que codifica um polipeptídeo TS08 ou TS09;

(f) polinucleotídeos que são pelo menos 70%, como 75,
30 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%,

homólogos a um polinucleotídeo como definido em qualquer um de (a) a (d) e que codifica um polipeptídeo TS08 ou TS09, ou

o filamento complementar de tal polinucleotídeo.

5 2. Vetor caracterizado por compreender o polinucleotídeo TS08 e/ou TS09, de acordo com a reivindicação 1.

 3. Vetor, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo TS08 e/ou
10 TS09 é operacionalmente ligado à seqüências de controle de expressão que permitem a expressão em células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas.

 4. Microorganismo, caracterizado por ser geneticamente construído com um polinucleotídeo TS08, TS09,
15 ou TS08/TS09, de acordo com a reivindicação 1 e/ou com um vetor da reivindicação 2 e/ou 3.

 5. Microorganismo de TS08, TS09, ou TS08/TS09, caracterizado por estar de acordo com a reivindicação 4, adicionalmente geneticamente construído com um
20 polinucleotídeo que compreende um polinucleotídeo que codificam um polipeptídeo CS07.

 6. Microorganismo de TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou TS08/TS09/CS07 caracterizado por estar de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 ou 5,
25 adicionalmente geneticamente construído com um polinucleotídeo que compreende um polinucleotídeo para rompimento ou infra-regulação de um polinucleotídeo BS08.

 7. Microorganismo de TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, TS08/TS09/CS07, deltaBS08-TS08,
30 deltaBS08-TS09, deltaBS08-CS07, deltaBS08-TS08/TS09,

deltaBS08- TS08/CS07, deltaBS08-TS09/CS07, ou deltaBS08-TS08/TS09/CS07 caracterizado por estar de acordo com qualquer uma das reivindicações 4, 5 ou 6, em que adicionalmente, a produção ou atividade reduzida de um polipeptídeo BS08 é obtido por modificação ou inativação de uma seqüência de ácidos nucleicos presente na célula necessária para expressão do polinucleotídeo BS08.

8. Microorganismo, de acordo com com qualquer uma das reivindicações 4, 5, 6 ou 7 caracterizado por ser capaz de produzir ácido cítrico a partir de sacarose em quantidades de 100 g/l ou mais.

9. Polipeptídeo caracterizado por ser codificado por um polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 1.

10. Polipeptídeo caracterizado por ter a atividade de uma proteína TS08 ou TS09, em que o referidopolipeptídeo é polipeptídeo que tem uma seqüência de aminoácidos que tem pelo menos 70% de homologia, como 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ou 99.5% com a seqüência de aminoácidos de Id. de Seq. N°: 2 ou Id. de Seq. N°: 7, respectivamente.

11. Processo para a produção de células capazes de expressar um polipeptídeo TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou TS08/TS09/CS07, caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de construção genética de células com:

- um vetor de acordo com a reivindicação 2 e/ou
- um vetor de acordo com a reivindicação 3 e/ou
- um polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 1 e/ou
- um polinucleotídeo que compreende um polinucleotídeo

para rompimento ou infra-regulação de um polinucleotídeo BS08.

- um polinucleotídeo que compreende um polinucleotídeo que codificam um polipeptídeo CS07.

5 12. Uso de um polinucleotídeo TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou TS08/TS09/CS07, preferivelmente um polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1 e/ou um vetor, de acordo com as reivindicações 2 e/ou 3 caracterizado para a produção de
10 ácido cítrico a partir de um carboidrato.

13. Uso, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que é usado adicionalmente um polinucleotídeo que compreende um polinucleotídeo para rompimento ou infra-regulação de um polinucleotídeo BS08.

15 14. Uso, de acordo com qualquer um das reivindicações 12 ou 13, caracterizado pelo fato de que o polinucleotídeo TS08, TS09, CS07, 10 TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou TS08/TS09/CS07 é operacionalmente ligado a seqüências de controle de expressão e transferido em uma microorganismo.

20 15. Uso, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que as seqüências de controle de expressão compreendem uma seqüência de regulação, e/ou promotora, e/ou terminadora e em que pelo menos uma dessas seqüências é alterada de tal modo que ela leva a um melhor
25 rendimento e/ou eficiência de produção de ácido cítrico a partir de um carboidrato produzido pelo referido microorganismo.

16. Uso, de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que as seqüências de controle de
30 expressão compreendem uma seqüência de regulação, e/ou

promotora, e/ou terminadora e em que pelo menos uma dessas seqüências é alterada de tal modo que ela leva a uma atividade aumentada e/ou melhorada do respectivo polipeptídeo codificado TS08, TS09 e/ou CS07 e/ou que ela
5 leva uma atividade diminuída ou abolida de um polipeptídeo BS08.

17. Uso, de acordo com qualquer um das reivindicações 12, 13, 14, 15 ou 16 caracterizado pelo fato de que o carboidrato é selecionado do grupo que consiste em glicose,
10 frutose, sacarose, melado, amido, milho, mandioca e polialcoóis.

18. Processo para a produção de um gene endógeno melhorado de TS08, TS09 ou TS08/TS09 em um microorganismo, o referido microorganismo que compreende um
15 polinucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, o referido processo caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de alteração do referido polinucleotídeo em uma tal forma que ele leva a um melhor rendimento e/ou eficiência de produção de ácido cítrico produzido a partir de um
20 carboidrato pelo referido microorganismo.

19. Processo, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que adicionalmente no referido microorganismo com gene endógeno melhorado de TS08, TS09 ou TS08/TS09, um gene de CS07 é melhorado por alteração de um
25 polinucleotídeo que compreende um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo CS07, contido no referido microorganismo.

20. Processo, de acordo com qualquer um das reivindicações 18 ou 19, caracterizado pelo fato de que
30 adicionalmente no referido microorganismo com melhor TS08,

TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou TS08/TS09/CS07, um gene endógeno de BS08 é rompido e/ou infra-regulado por alteração de um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo BS08, contido no referido
5 microorganismo.

21. Processo, de acordo com qualquer um das reivindicações 18, 19 ou 20, caracterizado pelo fato de que adicionalmente no referido microorganismo com melhor TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou
10 TS08/TS09/CS07, ou com melhor TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou TS08/TS09/CS07, combinado com um gene de BS08 rompido ou infra-regulado, a expressão reduzida de um gene endógeno de BS08 é obtida por modificação ou inativação de uma seqüência de
15 polinucleotídeos, preferivelmente a seqüência de controle, necessária para a expressão de BS08.

22. Processo para a produção de um polipeptídeo, de acordo com qualquer um das reivindicações 9 ou 10 em um microorganismo, caracterizado pelo fato de que compreende a
20 etapa de alteração do referido microorganismo de modo que o microorganismo produza o referido polipeptídeo com atividade aumentada e/ou melhorada de TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou a TS08/TS09/CS07, opcionalmente combinado com atividade de BS08 diminuída ou
25 abolida levando a um melhor rendimento e/ou eficiência de produção de ácido cítrico produzido a partir de um carboidrato pelo referido microorganismo.

23. Processo por ser para a produção de um microorganismo capaz de produzir ácido cítrico,
30 caracterizado pelo fato de que compreendem a etapa de

alteração do referido microorganismo de modo que o microorganismo produza um polipeptídeo com atividade aumentada e/ou melhorada de TS08, TS09, CS07, TS08/TS09, TS08/CS07, TS09/CS07, ou TS08/TS09/CS07, opcionalmente
5 combinado com atividade de BS08 diminuída ou abolida levando a um melhor rendimento e/ou eficiência de produção de ácido cítrico produzido a partir de um carboidrato pelo referido microorganismo.

24. Processo por ser para a produção de um
10 microorganismo que contém pelo menos um gene endógeno que compreendem um polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 1 e/ou um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo CS07, caracterizado pelo fato de que compreendem a etapa de alteração do referido microorganismo
15 de modo que o pelo menos um gene endógeno é superexpresso, levando a um melhor rendimento e/ou eficiência de ácido cítrico produzido a partir de um carboidrato pelo referido microorganismo.

25. Processo, de acordo com a reivindicação 24,
20 adicionalmente caracterizado por compreender a etapa de alteração do referido microorganismo de modo que um gene endógeno que compreendem um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo BS08 é infra-regulado ou rompido.

26. Microorganismo caracterizado por ser obtível
25 por um processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25.

27. Microorganismo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 26 ou com reivindicações 4, 5, 6, 7, ou 8, caracterizado por ser selecionado do grupo de fungos
30 filamentosos, preferivelmente de *Aspergillus*, mais

preferivelmente de *A. niger*, *A. awamori*, *A. aculeatus*, *A. japonicus*, *A. oryzae*, *A. vadensis*, *A. carbonarius*, *A. tubingensis*, *A. lacticoffeatus*, *A. brasiliensis*, *A. piperis*, *A. costaricaensis* ou *A. foetidus*, ainda mais preferivelmente *A. foetidus* variante *acidus* ou *A. foetidus* variante *pallidus*, ainda mais preferivelmente de *A. niger* variante *awamori*, ainda mais preferivelmente de *A. niger* ATCC1015 e mais preferivelmente de *A. niger* CBS 513.88.

28. Processo por ser para a produção de ácido cítrico a partir de um carboidrato caracterizado pelo fato de que um microorganismo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 26, 27 ou reivindicações 4, 5, 6, 7 ou 8, é cultivado em um meio nutriente aquoso sob condições que permitem a produção de ácido cítrico a partir do referido carboidrato e em que o ácido cítrico é isolado como o produto da fermentação.

29. Processo para a produção de ácido cítrico com um microorganismo de acordo com as reivindicações 26, 27 ou reivindicações 4, 5, 6, 7, ou 8, caracterizado pelo fato de que o referido microorganismo é cultivado em um meio nutriente aquoso sob condições que permitem a produção de ácido cítrico a partir de um carboidrato e em que o ácido cítrico é isolado como o produto da fermentação.

30. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25 ou reivindicações 28 ou 29, caracterizado pelo fato de que o carboidrato é selecionado do grupo que consiste em glicose, frutose, sacarose, melado, amido, milho, mandioca e polialcoóis.

31. Uso de ácido cítrico conforme produzido por um

processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 28, 29 ou 30 ou como produzido por um microorganismo de acordo com as reivindicações 26 ou 27, caracterizado por ser como ingrediente para um alimento, ração, bebida, fármaco, agente de limpeza, detergente ou produto de higiene pessoal.

32. Alimento, ração, bebida, fármaco, agente de limpeza, detergente ou produto de higiene pessoal caracterizado por compreender ácido cítrico como produzido por um processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 28, 29 ou 30 ou como produzido por um microorganismo de acordo com as reivindicações 26 ou 27.

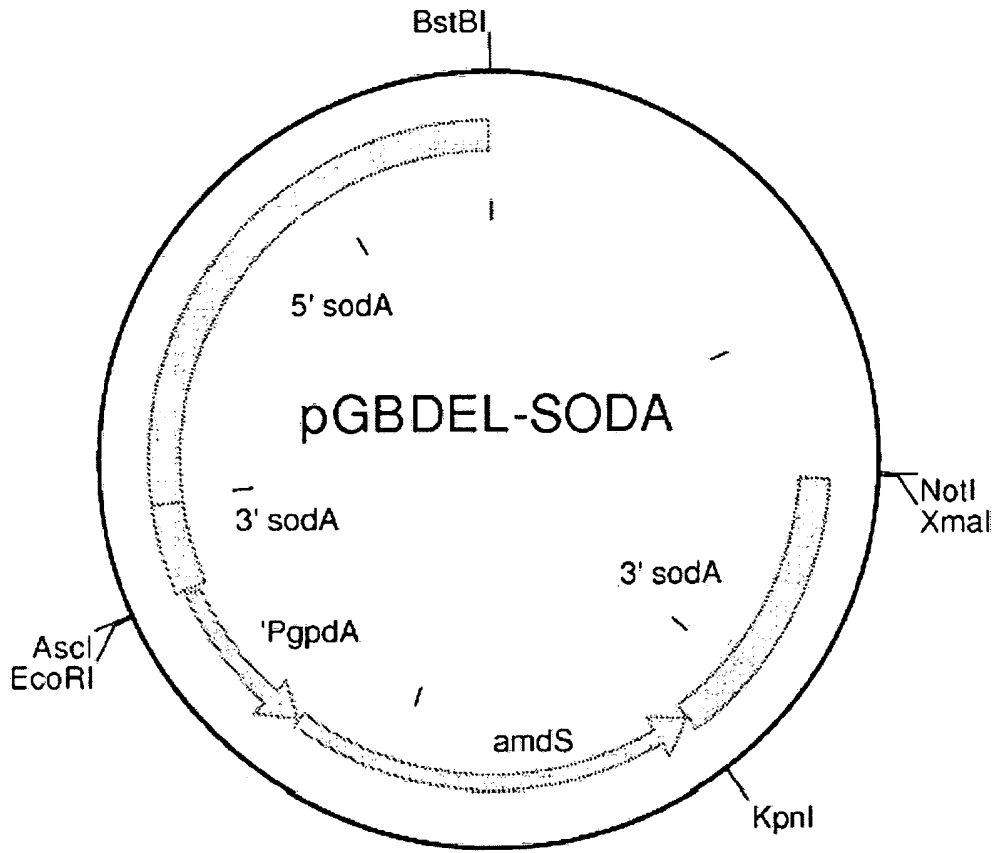


Figura 1

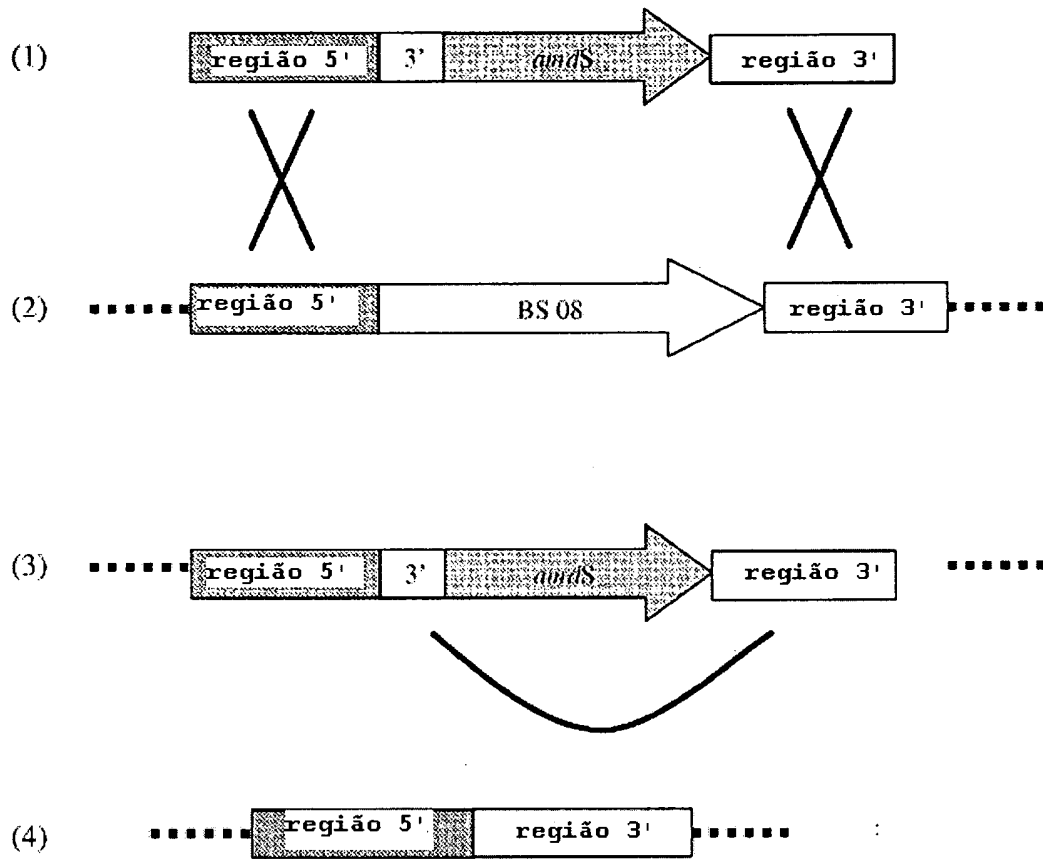


Figura 2

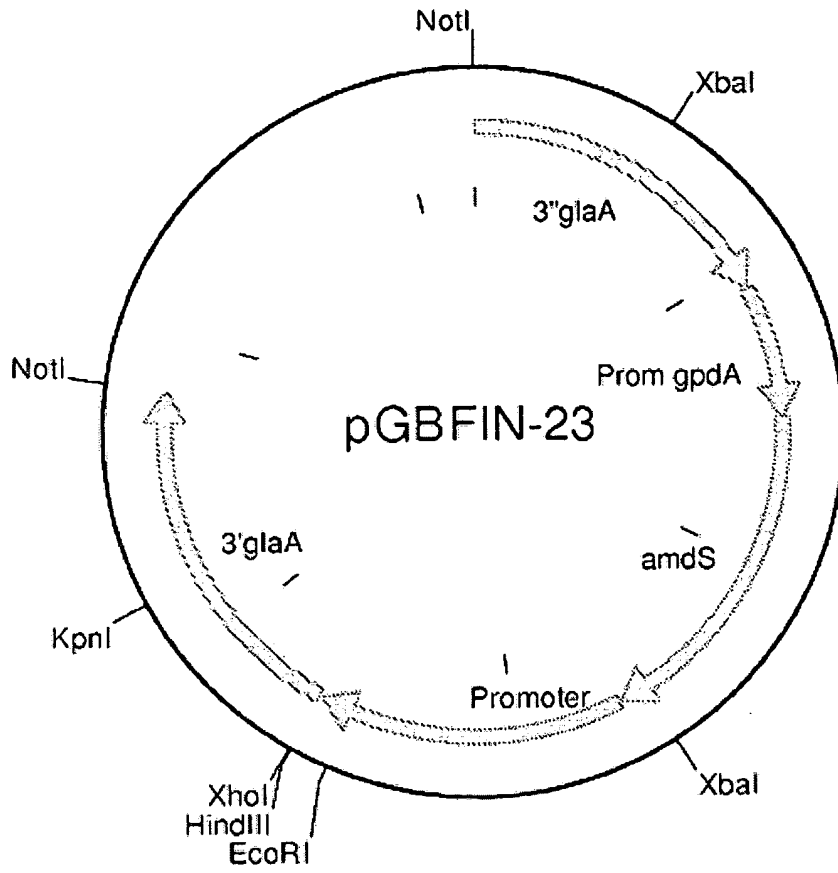


Figura 3

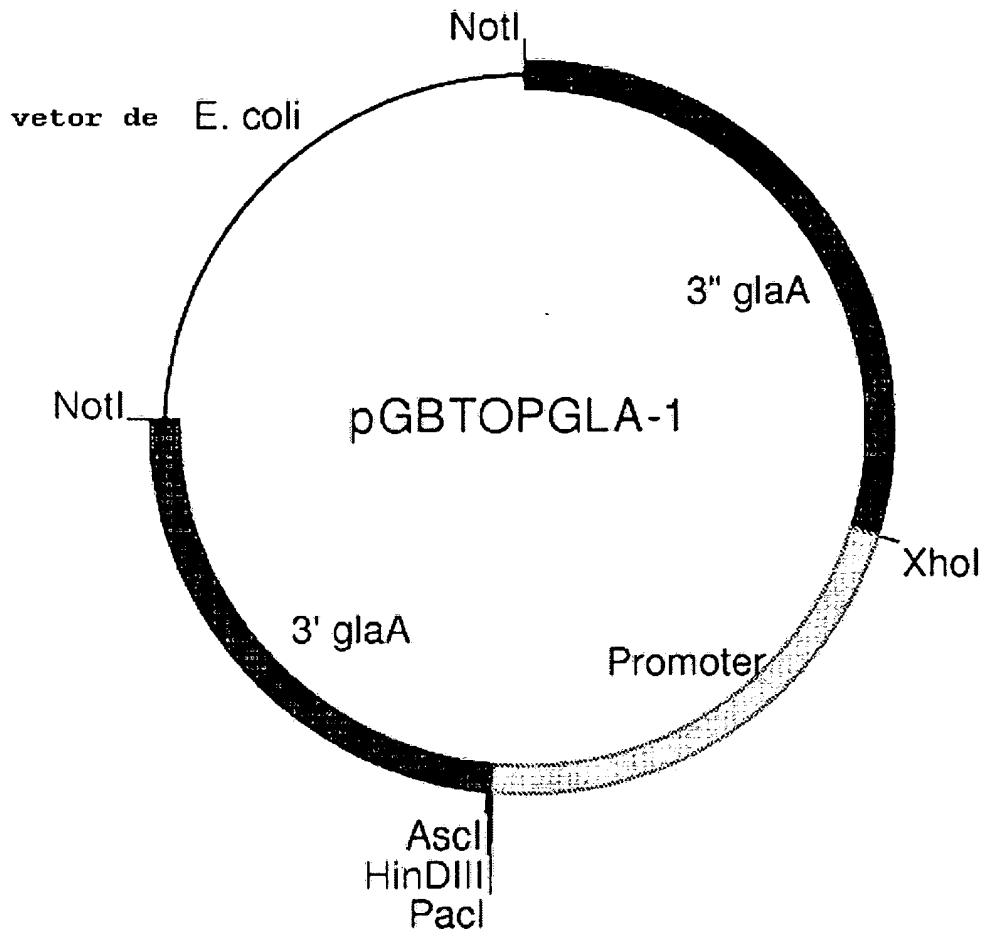


Figura 4

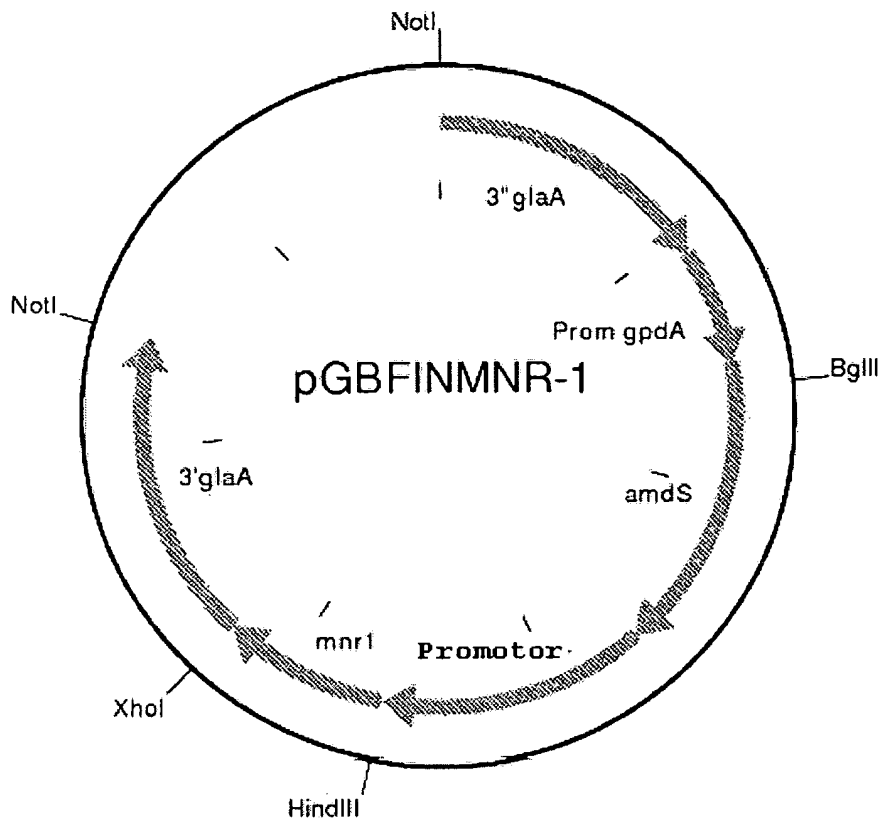


Figura 5

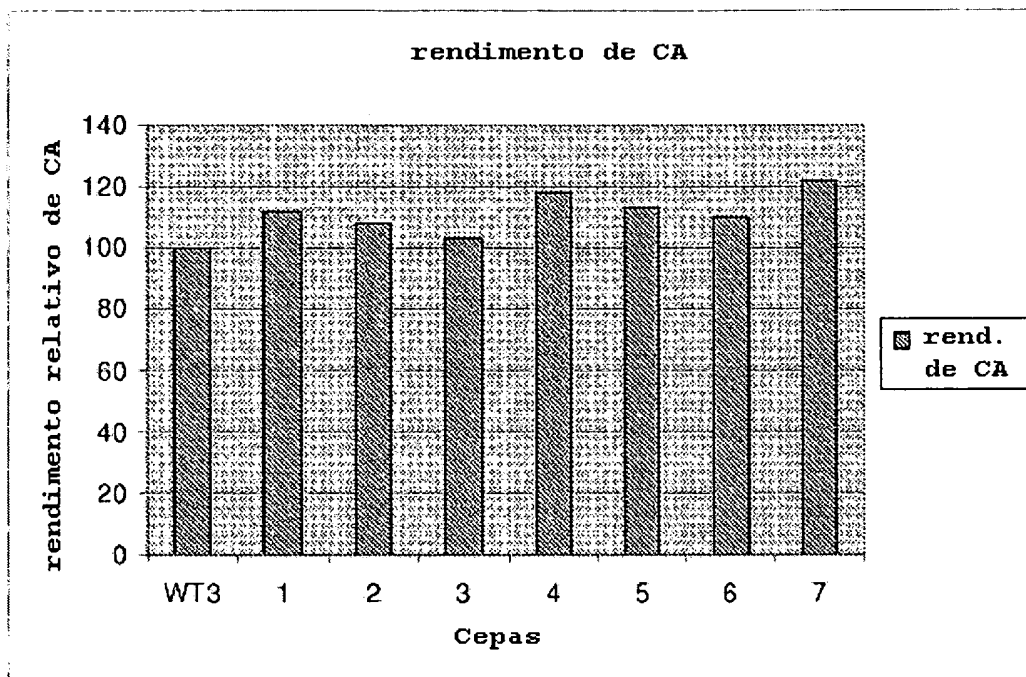


Figura 6

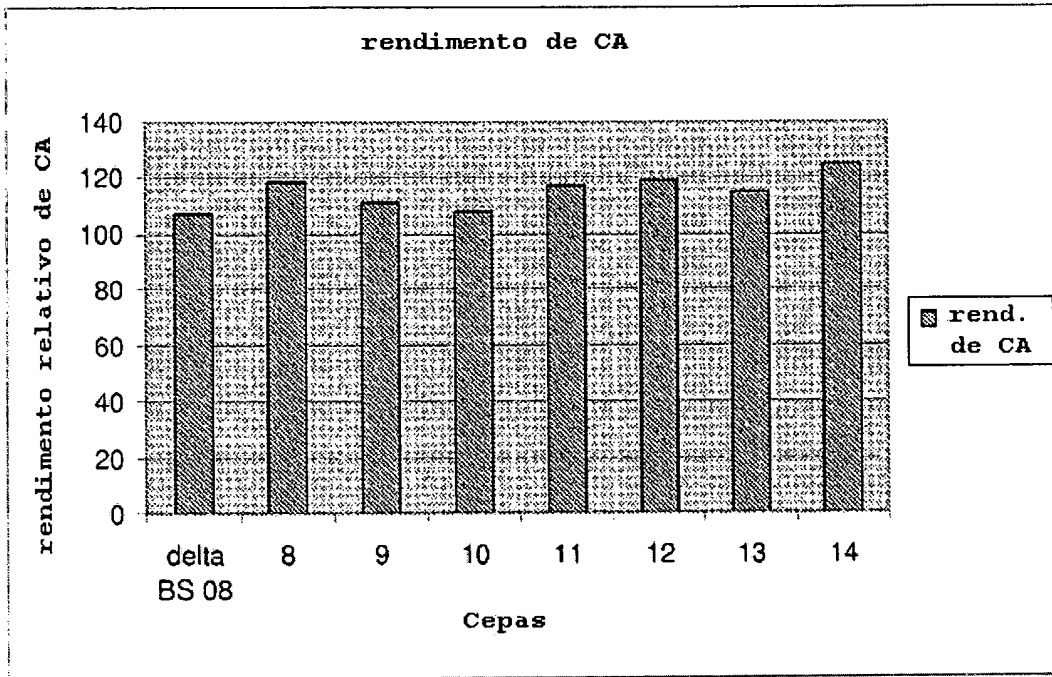


Figura 7

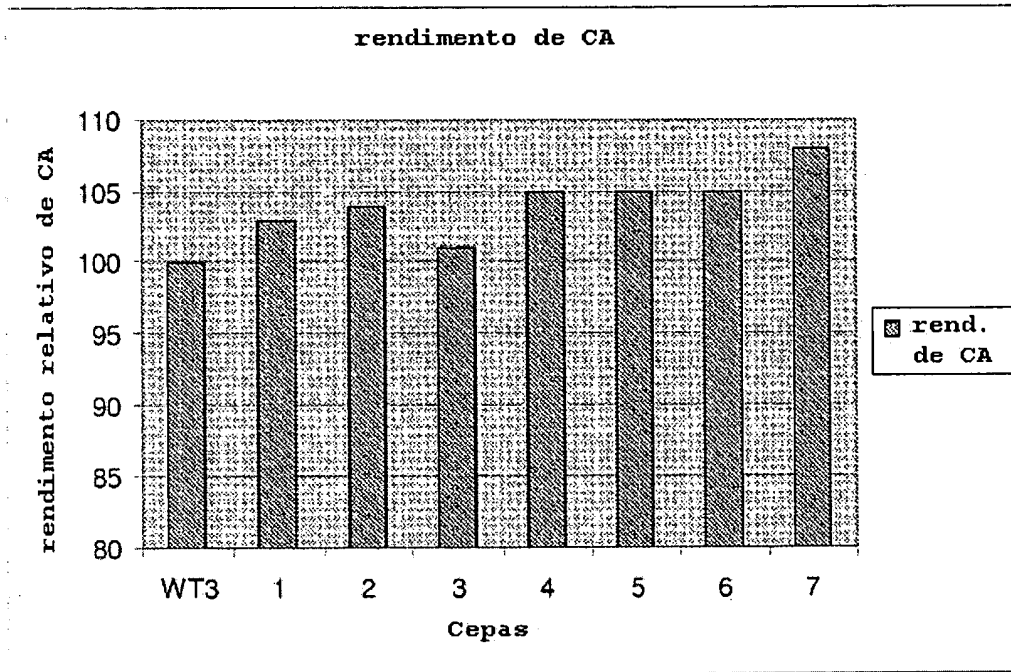


Figura 8

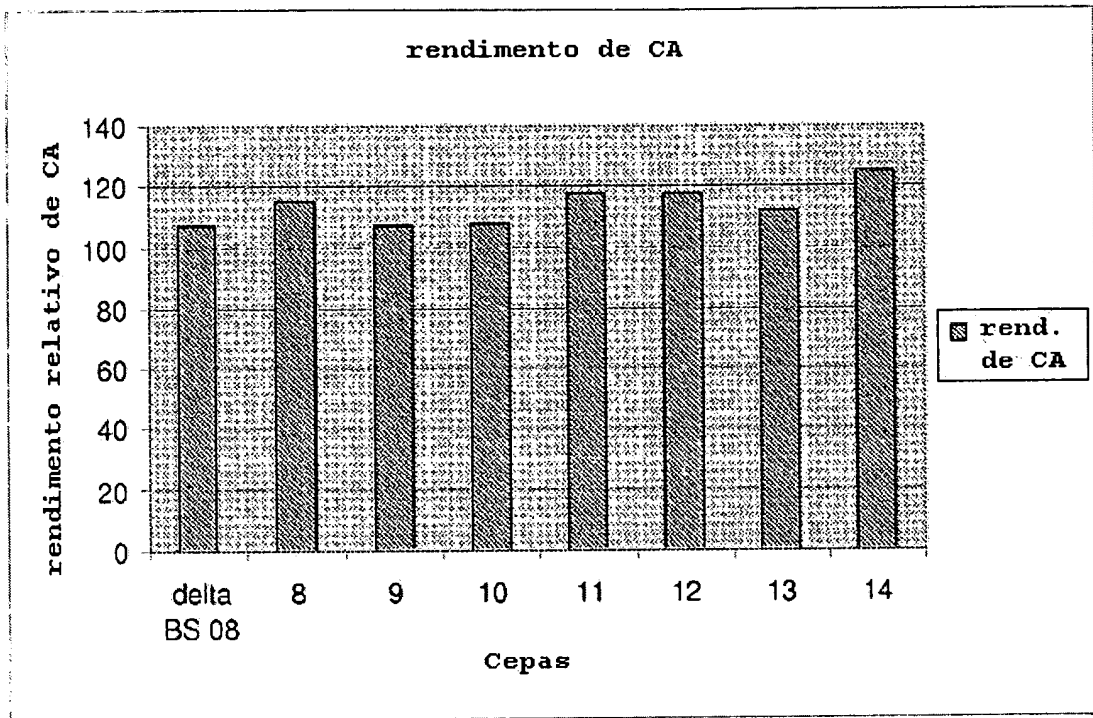


Figura 9

NOVOS GENES ÚTEIS PARA A PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE ÁCIDO
CÍTRICO

A presente invenção relaciona-se a genes recém
identificados que codificam proteínas que são envolvidas na
5 biossíntese de ácido cítrico. A invenção também apresenta
polinucleotídeos que compreendem as seqüências de
polinucleotídeos de comprimento total dos novos genes e
fragmentos destas, os novos polipeptídeos codificados pelos
polinucleotídeos e fragmentos destes, bem como seus
10 equivalentes funcionais. A presente invenção também se
relaciona ao uso dos referidos polinucleotídeos e
polipeptídeos como ferramentas biotecnológicas na produção
de ácido cítrico a partir de microorganismos, em que uma
modificação dos referidos polinucleotídeos e/ou
15 polipeptídeos codificados tem um impacto direto ou indireto
sobre o rendimento, produção e/ou eficiência de produção do
produto de fermentação no referido microorganismo. Também
são incluídos métodos/processos de uso dos polinucleotídeos
e seqüências de polinucleotídeos modificadas para
20 transformar microorganismos hospedeiros. A invenção também
se relaciona a microorganismos geneticamente construídos e
a seu uso para a produção de ácido cítrico.