

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 473**

51 Int. Cl.:
C12N 15/60 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
C12P 7/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08851601 .8**
96 Fecha de presentación: **14.11.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2220233**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.08.2010**

54 Título: **Producción de ácido dicarboxílico en eucariotas**

30 Prioridad:
20.11.2007 EP 07121120
20.11.2007 EP 07121117
20.11.2007 EP 07121113
27.05.2008 EP 08156960
27.05.2008 EP 08156961
27.05.2008 EP 08156959

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.06.2012

73 Titular/es:
DSM IP ASSETS B.V.
HET OVERLOON 1
6411 TE HEERLEN, NL

72 Inventor/es:
VERWAAL, René;
WU, Liang;
DAMVELD, Robbertus, Antonius y
SAGT, Cornelis, Maria, Jacobus

74 Agente/Representante:
Lehmann Novo, Isabel

ES 2 383 473 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Producción de ácido dicarboxílico en eucariotas

- 5 La presente invención se refiere a una célula eucariótica recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima que cataliza la conversión de fosfoenolpiruvato en oxaloacetato, y a un procedimiento para la producción de un ácido dicarboxílico, a saber ácido succínico.
- 10 Los ácidos dicarboxílicos de 4 carbonos, ácido málico, ácido fumárico y ácido succínico son potenciales precursores para numerosos productos químicos. Por ejemplo, el ácido succínico se puede convertir en 1,4-butanodiol (BDO), tetrahidrofurano y gamma-butirolactona. Otro producto derivado de ácido succínico es un polímero de poliéster que se prepara enlazando ácido succínico y BDO.
- 15 El ácido succínico se produce predominantemente a través de procedimientos petroquímicos mediante hidrogenación de butano. Se considera que estos procedimientos son perjudiciales para el medio ambiente y costosos. La producción fermentativa de ácido succínico puede ser un procedimiento alternativo atractivo para la producción de ácido succínico, en el que se puede utilizar un material de alimentación renovable como fuente de carbono.
- 20 Se conoce que un cierto número de diferentes bacterias tales como *Escherichia coli* y las bacterias de la panza *Actinobacillus*, *Anaerobiospirillum*, *Bacteroides*, *Mannheimia* o *Succinimonas* sp. producen ácido succínico. La ingeniería metabólica de estas cepas bacterianas ha mejorado el rendimiento y/o productividad de ácido succínico, o ha reducido la formación de subproductos.
- 25 Lin *et al.*, 2005, *Metabolic Engineering* 7, págs. 116-127, por ejemplo, describen que la sobre-expresión de fosfoenolpiruvato carboxilasa a partir de *Sorghum* en *E. coli* era eficaz para aumentar la producción de succinato en sistemas de producción aerobios de *E. coli*.
- 30 El documento WO 2007/061590 describe una levadura piruvato descarboxilasa negativa para la producción de ácido málico y/o ácido succínico, la cual se transforma con una enzima piruvato carboxilasa o una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una enzima malato deshidrogenasa y una proteína transportadora de ácido málico (MAE).
- 35 Bauer *et al.*, 1999, *FEMS Microbiology Letters* 179, págs. 107-112 describen que la expresión de la fosfoenolpiruvato carboxilasa a partir de *Escherichia coli* en *Saccharomyces cerevisiae* y cepas de *S. cerevisiae* que sobre-expresan piruvato carboxilasa producía una mayor cantidad de malato en comparación con el tipo salvaje.
- 40 Kubo *et al.*, 2000, *J. Bioscience and Bioengineering*, 90, págs. 619-624 describe que la interrupción de genes de succinato deshidrogenasa en *S. cerevisiae* incrementaba la producción de ácido succínico bajo condiciones de sacudimiento, pero no bajo condiciones estáticas y de elaboración de sake.
- 45 Goldberg *et al.*, 2006, *J. Chem. Techn. Biotechnol.* 81, pág. 1601-1611 reseña la importancia del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) citosólico reductivo, que incluye las actividades citosólicas de piruvato carboxilasa, malato deshidrogenasa y fumarasa para la producción de ácido fórmico y ácido málico en hongos filamentosos.
- 50 Sanville Millard *et al.*, 1996, *Appl. Environm. Microbiol.* 62, págs. 1808-1810 describe que la producción fermentativa de ácido succínico a partir de glucosa por parte de *Escherichia coli* se incrementó significativamente mediante la sobre-expresión de fosfoenolpiruvato carboxilasa. En contraposición, la sobre-expresión de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa no tenía efecto alguno.
- 55 A pesar de las mejoras que se han realizado en la producción fermentativa de ácido dicarboxílico, sigue existiendo una necesidad de microorganismos mejorados para la producción fermentativa de ácidos dicarboxílicos, en particular ácido succínico.
- El objetivo de la presente invención es un microorganismo eucariótico alternativo para la producción de un ácido dicarboxílico, a saber ácido succínico.
- 60 El objetivo se consigue de acuerdo con la invención con una célula microbiana eucariótica recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima que cataliza la conversión de fosfoenolpiruvato en oxaloacetato, con lo que se genera ATP, en donde la enzima comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 5% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3 y/o SEQ ID NO:5, en donde la secuencia de nucleótidos es expresada en el citosol, y la enzima es activa en el citosol.

Preferiblemente, la enzima tiene actividad de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, preferiblemente la enzima es una fosfoenolpiruvato (PEP) carboxiquinasa (E.C. 4.1.1.49). Preferiblemente, la PEP carboxiquinasa es activa bajo condiciones anaerobias o limitadas en oxígeno en presencia de una fuente de carbono fermentable o glicerol. Una fuente de carbono fermentable puede ser glucosa, fructosa, galactosa, rafinosa, arabinosa o xilosa. Se encontró ventajoso que la célula eucariótica comprendiera una PEP carboxiquinasa de acuerdo con la presente invención, dado que la PEP carboxiquinasa, que cataliza la conversión de PEP en OAA fija CO₂ y genera energía en forma de ATP.

Sorprendentemente, se encontró que una célula eucariótica recombinante de acuerdo con la presente invención produce una cantidad incrementada de ácido dicarboxílico tal como ácido succínico y ácido fumárico en comparación con la cantidad de ácido dicarboxílico producido por una célula eucariótica de tipo salvaje. Preferiblemente, una célula eucariótica de acuerdo con la presente invención produce al menos 1,2, preferiblemente al menos 1,5, 1,6, 1,8, preferiblemente al menos 2 veces más de ácido dicarboxílico que una célula eucariótica de tipo salvaje que no comprende la secuencia de nucleótidos que codifica una enzima que cataliza la conversión de fosfoenolpiruvato en oxaloacetato de la invención.

Preferiblemente, una célula microbiana eucariótica de acuerdo con la presente invención expresa una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima con actividad de PEP carboxiquinasa, preferiblemente una PEP carboxiquinasa en donde la PEP carboxiquinasa comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 55%, preferiblemente de al menos 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3 y/o SEQ ID NO: 5. Preferiblemente, la PEP carboxiquinasa comprende la SEQ ID NO: 3 y/o SEQ ID NO: 5.

La identidad de la secuencia se define en esta memoria como una relación entre dos o más secuencias de aminoácidos (poliipéptidos o proteínas) o dos o más secuencias de ácidos nucleicos (polinucleótidos), según se determina comparando las secuencias. Habitualmente, las identidades o similitudes entre secuencias se comparan a lo largo de toda la longitud de las secuencias comparadas. En la técnica, "identidad" significa también el grado de relación de la secuencia entre secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos, según sea el caso, según se determina por el apareamiento entre hebras de dichas secuencias.

Se diseñan métodos preferidos para determinar la identidad y para dar el apareamiento mayor entre las secuencias sometidas a ensayo. Métodos para determinar la identidad y similitud son codificados en programas de ordenador públicamente disponibles. Métodos de programa de ordenador preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen BLASTP y BLASTN, públicamente disponibles de NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894). Parámetros preferidos para la comparación de secuencias de aminoácidos utilizando BLASTP son hueco abierto 11.0, extensión de hueco 1, matriz Blosum 62.

Una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima expresada en una célula según se describe también se puede definir por su capacidad de hibridarse con secuencias de nucleótidos que codifican una enzima que tiene actividad de PEP carboxiquinasa de SEQ ID NO: 1, 3 y/o 5, o con la secuencia de nucleótidos que codifica una malato deshidrogenada de SEQ ID NO: 14 o con la secuencia de nucleótidos que codifica fumarasa de SEQ ID NO: 16, bajo condiciones de hibridación moderadas o, preferiblemente, bajo condiciones de hibridación rigurosas. Condiciones de hibridación rigurosas se definen en esta memoria como condiciones que permiten que una secuencia de ácidos nucleicos de al menos aproximadamente 25, de preferencia aproximadamente 50 nucleótidos, 75 ó 100 y, lo más preferiblemente, de aproximadamente 200 o más nucleótidos, se hibride a una temperatura de aproximadamente 65°C en una disolución que comprende una sal aproximadamente 1 M, preferiblemente 6 x SSC (cloruro de sodio, citrato de sodio) o cualquier otra disolución que tenga una fuerza iónica equiparable, y el lavado a 65°C en una disolución que comprende una sal aproximadamente 0,1 M, o menor, preferiblemente 0,2 x SSC, o cualquier otra disolución que tenga una fuerza iónica equiparable. Preferiblemente, la hibridación se realiza durante una noche, es decir, al menos durante 10 horas y, preferiblemente, el lavado se realiza durante al menos una hora con al menos dos cambios de la disolución de lavado. Habitualmente, estas condiciones permitirán la hibridación específica de secuencias con una identidad de la secuencia de aproximadamente 90% o más.

Condiciones moderadas se definen en esta memoria como condiciones que permiten que una secuencia de ácidos nucleicos de al menos 50 nucleótidos, de preferencia de aproximadamente 200 o más nucleótidos, se hibride a una temperatura de aproximadamente 45°C en una disolución que comprende una sal aproximadamente 1 M, preferiblemente 6 x SSC o cualquier otra disolución que tenga una fuerza iónica equiparable, y el lavado a temperatura ambiente en una disolución que comprende una sal aproximadamente 1 M, preferiblemente 6 x SSC o cualquier otra disolución que tenga una fuerza iónica equiparable. Preferiblemente, la hibridación se realiza durante una noche, es decir, al menos durante 10 horas y, preferiblemente, el lavado se realiza durante al menos una hora con al menos dos cambios de la disolución de lavado. Habitualmente, estas condiciones permitirán la hibridación específica de secuencias con una identidad de la secuencia de hasta 50%. La persona experta en la técnica será

capaz de modificar estas condiciones de hibridación con el fin de identificar específicamente secuencias que varíen en la identidad entre 50% y 90%.

5 Una célula microbiana eucariótica recombinante de acuerdo con la presente invención se define en esta memoria como una célula que contiene, o es transformada o modificada genéticamente con una secuencia de nucleótidos que no se produce de forma natural en la célula eucariótica, o que contiene una copia o copias adicionales de una secuencia de ácidos nucleicos endógena. Una célula eucariótica de tipo salvaje se define en esta memoria como la célula parental de la célula recombinante.

10 El término "homóloga", cuando se utiliza para indicar la relación entre una molécula de ácido nucleico o polipéptido (recombinante) dada y un organismo hospedante o célula hospedante dado, se entiende que significa que en la naturaleza la molécula de ácido nucleico o polipéptido se produce por parte de una célula hospedante o de organismos de la misma especie, preferiblemente de la misma variedad de cepa.

15 El término "heterólogo", cuando se utiliza con respecto a un ácido nucleico (ADN o ARN) o proteína se refiere a un ácido nucleico o proteína que no se produce de forma natural como parte del organismo, célula, genoma o secuencia de ADN o ARN en la que está presente, o que se encuentra en una célula o lugar o lugares en el genoma o la secuencia de ADN o ARN que difieren de la que se encuentra en la naturaleza. Ácidos nucleicos o proteínas heterólogos no son endógenos para la célula en la que se introducen, pero han sido obtenidos a partir de otra célula o han sido producidos por vía sintética o recombinante.

20 El término "gen", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que contiene un molde para una ácido nucleico polimerasa, en eucariotas, ARN polimerasa II. Los genes se transcriben en ARNs que luego se traducen en proteínas.

25 La expresión "ácido nucleico", tal como se utiliza en esta memoria, incluye la referencia a un polímero de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, es decir, un polinucleótido, en una forma de una sola cadena o de doble cadena y, a menos que se limite de otro modo, comprende análogos conocidos que tienen la naturaleza esencial de nucleótidos naturales, debido a que se hibridan a ácidos nucleicos de cadena sencilla de una manera similar a nucleótidos que se producen en la naturaleza (p. ej. ácidos nucleicos peptídicos). Un polinucleótido puede ser de longitud completa o una sub-secuencia de un gen estructural o regulador nativo o heterólogo. A menos que se indique de otro modo, el término incluye la referencia a la secuencia específica, así como a la secuencia complementaria de la misma.

30 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan de forma indistinta en esta memoria para aludir a un polímero de residuos aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos aminoácidos son un análogo químico artificial de un correspondiente aminoácido que se produce en la naturaleza, así como a polímeros de aminoácidos que se producen en la naturaleza. La naturaleza esencial de análogos de este tipo de aminoácidos que se producen en la naturaleza es que, cuando se incorporan en una proteína, esa proteína es específicamente reactiva a anticuerpos inducidos a la misma proteína, pero que consisten enteramente en aminoácidos que se producen en la naturaleza. Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteínas" incluyen también modificaciones que incluyen, pero no se limitan a la glicosilación, fijación de lípidos, sulfatación, gamma-carboxilación de residuos ácido glutámico, hidroxilación y ADP-ribosilación.

35 El término "enzima" tal como se utiliza en esta memoria se define como una proteína que cataliza una reacción (bio)química en una célula.

40 Para aumentar la probabilidad de que la enzima introducida se exprese en forma activa en una célula eucariótica de la invención, se puede adaptar la correspondiente secuencia de nucleótidos codificadora para optimizar su uso del codón con el de la célula hospedante eucariótica elegida. En la técnica se conocen varios métodos para la optimización de codones. Un método preferido para optimizar el uso de codones de las secuencias de nucleótidos a la célula eucariótica de acuerdo con la presente invención es la tecnología de la optimización del par de codones según se describe en el documento WO 2008/000632. La optimización del par de codones es un método para producir un polipéptido en una célula hospedante, en el que las secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido han sido modificadas con respecto a su uso de codones, en particular los pares de codones que se utilizan para obtener una expresión mejorada de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido y/o la producción mejorada del polipéptido. Pares de codones se definen como un conjunto de dos tripletes (codones) subsiguientes en una secuencia codificadora.

55 Habitualmente, una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima tal como una enzima con actividad de PEP carboxiquinasa, o cualquier otra enzima descrita en esta memoria está enlazada de forma operativa a un promotor que determina una suficiente expresión de la correspondiente secuencia de nucleótidos en la célula eucariótica de

acuerdo con la presente invención, con el fin de conferir a la célula la capacidad de producir un ácido dicarboxílico.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión “operativamente enlazada” se refiere a un enlace de elementos de polinucleótidos (o secuencias codificadoras o secuencias de ácidos nucleicos) en una relación funcional. Una secuencia de ácidos nucleicos está “operativamente enlazada” cuando está situada en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un promotor o reforzador está operativamente enlazado a una secuencia codificadora si afecta a la transcripción de la secuencia codificadora.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término “promotor” se refiere a un fragmento de ácido nucleico que actúa para controlar la transcripción de uno o más genes situados aguas arriba con respecto a la dirección de la transcripción del lugar de inicio de la transcripción del gen, y está estructuralmente identificado por la presencia de un sitio de unión para la ARN polimerasa ADN-dependiente, sitios de iniciación de la transcripción y cualesquiera otras secuencias de ADN conocidas por un experto en la técnica. Un promotor “constitutivo” es un promotor que es activo bajo condiciones medioambientales y de desarrollo. Un promotor “inducible” es un promotor que es activo bajo la regulación medioambiental o de desarrollo.

Un promotor que podría utilizarse para conseguir la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima, p. ej. una enzima con actividad de PEP carboxiquinasa, puede no ser nativo a la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima a expresar, es decir, un promotor que es heterólogo a la secuencia de nucleótidos (secuencia codificadora) a la que está operativamente enlazado. Preferiblemente, el promotor es homólogo, es decir, endógeno a la célula hospedante.

Promotores adecuados en células hospedantes eucarióticas son conocidos por la persona experta en la técnica. Promotores adecuados pueden ser, pero no se limitan a TDH, GPDA, GAL7, GAL10 o GAL 1, CYC1, HIS3, ADH1, PGL, PH05, GAPDH, ADC1, TRP1, URA3, LEU2, ENO, TPI y AOX1. Otros promotores adecuados incluyen PDC, GPD1, PGK1 y TEF1.

Habitualmente, una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima comprende un terminador. En la presente invención se puede utilizar cualquier terminador que sea funcional en la célula. Terminadores preferidos se obtienen a partir de genes naturales de la célula hospedante. Secuencias de terminador adecuadas son bien conocidas en la técnica. Preferiblemente, terminadores de este tipo se combinan con mutaciones que evitan el deterioro del ARNm mediado sin sentido en la célula hospedante de la invención (véase, por ejemplo: Shirley et al., 2002, Genetics 161: 1465-1482).

En una realización preferida, se sobre-expresa una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima tal como una enzima con actividad de PEP carboxiquinasa. Se encontró que una producción incrementada de ácido málico, ácido fumárico o ácido succínico por parte de la célula se puede conseguir cuando se sobre-expresan las secuencias de nucleótidos.

Se conocen métodos en la técnica para la sobre-expresión de secuencias de nucleótidos que codifican enzimas. Una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima se puede sobre-expresar aumentando el número de copias del gen que codifica la enzima en la célula, p. ej. integrando copias adicionales del gen en el genoma de la célula, expresando el gen a partir de un vector centromérico, a partir de un vector de expresión de múltiples copias episomal o introduciendo un vector de expresión (episomal) que comprende múltiples copias de uno o más genes. Preferiblemente, la sobre-expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima de acuerdo con la invención se consigue con un promotor constitutivo (fuerte).

La invención se refiere también a una construcción de nucleótidos que comprende una o más secuencias de nucleótidos seleccionadas de SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10.

Una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima se puede ligar en una construcción de ácido nucleico, por ejemplo un plásmido tal como un plásmido de bajo número de copias o un plásmido de alto número de copias. La célula eucariótica de acuerdo con la presente invención puede comprender una sola copia, pero preferiblemente comprende múltiples copias de la secuencia de nucleótidos que codifica una enzima que cataliza la conversión de PEP en OAA, por ejemplo mediante múltiples copias de una construcción de nucleótidos.

Una construcción de ácidos nucleicos se puede mantener episomalmente y, así, comprende una secuencia para la replicación autónoma tal como una secuencia de replicación autosomal. Si la célula eucariótica es de origen fúngico, una construcción de ácido nucleico episomal adecuada puede basarse, p. ej., en los plásmidos 2 μ o pKD1 de levadura (Gleer et al., 1991, Biotechnology 9: 968-975), o en los plásmidos AMA (Fierro et al., 1995, Curr Genet. 29: 482-489). Alternativamente, cada una de las construcciones de ácido nucleico puede integrarse en una o más copias en el genoma de la célula eucariótica. La integración en el genoma de la célula puede producirse aleatoriamente

mediante recombinación no homóloga pero, preferiblemente, la construcción de ácido nucleico se puede integrar en el genoma de la célula mediante recombinación homóloga, tal como se conoce bien en la técnica.

5 En una realización preferida, una célula microbiana eucariótica de acuerdo con la presente invención comprende una enzima que tiene actividad de PEP carboxiquinasa, en donde la enzima es una enzima heteróloga, preferiblemente la enzima heteróloga se deriva de una bacteria, más preferiblemente la enzima con actividad de PEP carboxiquinasa se deriva de *Escherichia coli*, *Mannheimia sp.*, *Actinobacillus sp.*, o *Anaerobiospirillum sp.*, más preferiblemente de *Mannheimia succinicoproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, o *Anaerobiospirillum succinicoproducens*.

10 En una realización preferida, una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima con actividad de PEP carboxiquinasa en la célula eucariótica de acuerdo con la presente invención se expresa en el citosol. Sorprendentemente, la actividad citosólica de la enzima dio como resultado una producción incrementada de un ácido dicarboxílico por parte de la célula eucariótica.

15 Se encontró que una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima con actividad de PEP carboxiquinasa puede comprender una señal diana peroxisomal o mitocondrial, por ejemplo según se determina por el método descrito por Schlüter et al, Nucleic Acid Research 2007, Vol 25, D815-D822.

20 Se encontró que la PEP carboxiquinasa derivada de *Actinobacillus succinogenes* comprende una señal diana peroxisomal. Sorprendentemente, se encontró que cuando la señal diana peroxisomal se reemplazaba por el correspondiente motivo en la PEP carboxiquinasa derivada de *Mannheimia succinicoproducens*, se evitó la fijación como diana peroxisomal.

25 Una célula eucariótica de acuerdo con la presente invención expresa una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima con PEP carboxiquinasa, en donde la enzima es una PEP carboxiquinasa, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de la secuencia de al menos 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98 ó 99% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y/o SEQ ID NO: 5. Preferiblemente, la PEP carboxiquinasa comprende la SEQ ID NO: 3 y/o SEQ ID NO: 5.

30 En una realización, puede preferirse que la actividad de una enzima nativa o endógena u homóloga que cataliza la conversión de OAA en PEP en la célula eucariótica de acuerdo con la presente invención se reduzca o se inactive por completo. La inactivación o reducción de la actividad de una enzima que cataliza la conversión de OAA en PEP son métodos conocidos para la persona experta en la técnica. Esto se puede conseguir, por ejemplo, mediante mutación, interrupción o delección de la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima con actividad de PEP
35 carboxiquinasa. Se prefiere una actividad reducida de una PEP carboxiquinasa nativa con el fin de evitar que se produzca la reacción inversa de OAA a PEP.

40 Una célula microbiana eucariótica de acuerdo con la presente invención se selecciona del grupo que consiste en una levadura y en un hongo filamentoso. Una célula eucariótica pertenece preferiblemente a los géneros *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia*, *Candida*, *Hansenula*, *Humicola*, *Torulaspota*, *Trichosporon*, *Brettanomyces*, *Rhizopus*, *Zygosaccharomyces*, *Pachysolen* o *Yamadazyma*. Preferiblemente, la célula eucariótica pertenece a una especie de *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces bayanus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *P. symplissicum*, *Pichia stipidis*, *Kluyveromyces marxianus*, *K. lactis*, *K. thermotolerans*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida sonorensis*, *C. glabrata*,
45 *Hansenula polymorpha*, *Torulaspota delbrueckii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Rhizopus oryzae* o *Zygosaccharomyces bailii*.

50 Preferiblemente, una célula eucariótica de acuerdo con la invención es una levadura, preferiblemente *Saccharomyces cerevisiae*, preferiblemente una *Saccharomyces cerevisiae* que comprende una o más de las secuencias de nucleótidos seleccionadas de SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10. La célula eucariótica también puede ser un hongo filamentoso, preferiblemente *A. niger*, preferiblemente *A. niger* que comprende una o más secuencias de nucleótidos heterólogas seleccionadas de SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.

55 Además de una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima con actividad de PEP carboxiquinasa, la célula eucariótica de acuerdo con la presente invención puede ser modificada o transformada genéticamente de forma adicional con secuencias de nucleótidos que codifican enzimas homólogas y/o heterólogas que catalizan reacciones en la célula, dando como resultado un flujo incrementado hacia el ácido málico, el ácido fumárico y/o el ácido succínico. Por ejemplo, puede ser favorable introducir y/o sobre-expresar secuencias de nucleótidos que codifiquen i) una malato deshidrogenasa que cataliza la conversión de OAA en ácido málico; ii) una fumarasa que cataliza la
60 conversión de ácido málico en ácido fumárico; o iii) una fumarato reductasa que cataliza la conversión de ácido fumárico en ácido succínico, dependiendo del ácido dicarboxílico a producir.

Preferiblemente, una célula eucariótica de acuerdo con la presente invención sobre-expresa una secuencia de nucleótidos que codifica una piruvato carboxilasa (PYC), preferiblemente una piruvato carboxilasa que es activa en el citosol tras la expresión de la secuencia de nucleótidos, por ejemplo una piruvato carboxilasa que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 26. Preferiblemente, se sobre-expresa una piruvato carboxilasa endógena u homóloga. Sorprendentemente, se encontró que la sobre-expresión de una piruvato carboxilasa endógena daba como resultado niveles de producción de ácido succínico incrementados por parte de la célula eucariótica de acuerdo con la presente invención que comprende una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa según se describe en esta memoria. Se encontró que la (sobre)expresión concomitante de una piruvato carboxilasa y una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa daba como resultado un incremento sorprendente de los niveles de producción de ácido succínico de al menos 1,5 en comparación con una célula eucariótica que comprende piruvato carboxilasa o una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa según se describe en esta memoria.

En otra realización preferida, una célula de acuerdo con la presente invención comprende, además, una secuencia de nucleótidos que codifica una malato deshidrogenasa (MDH) activa en el citosol tras la expresión de la secuencia de nucleótidos. Una MDH citosólica puede ser cualquier malato deshidrogenasa homóloga o heteróloga adecuada. Preferiblemente, la MDH es una MDH de *S. cerevisiae* tal como MDH3 o MDH1. Preferiblemente, la MDH carece de una señal diana peroxisomal o mitocondrial con el fin de localizar la enzima en el citosol. Alternativamente, la MDH es MDH2 de *S. cerevisiae* que ha sido modificada de modo que no sea inactivada en presencia de glucosa y sea activa en el citosol. Es conocido que la transcripción de MDH2 se reprime y Mdh2p se degrada tras la adición de glucosa a células privadas de glucosa. Mdh2p suprimida para los 12 aminoácidos amino-terminales es menos susceptible a una degradación inducida por glucosa (Minard y McAlister-Henn, J Biol Chem. 1992 25 agosto;267(24):17458-64). Preferiblemente, una célula eucariótica de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una malato deshidrogenasa que tiene una identidad de la secuencia de al menos el 70%, preferiblemente de al menos el 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99% o 100% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. Preferiblemente, la actividad de malato deshidrogenasa se incrementa al sobre-expresar la secuencia de nucleótidos codificadora por métodos conocidos en la técnica.

Preferiblemente, una célula eucariótica de acuerdo con la presente invención comprende, además, una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima que cataliza la conversión de ácido málico en ácido fumárico, que puede ser una enzima heteróloga u homóloga. Una enzima que cataliza la conversión de ácido málico en ácido fumárico, por ejemplo una fumarasa, puede proceder de cualquier origen adecuado, preferiblemente de un origen microbiano, por ejemplo una levadura tal como *Saccharomyces* o un hongo filamentoso tal como *Rhizopus oryzae*. Preferiblemente, una célula eucariótica de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una fumarasa que tiene una identidad de la secuencia de al menos el 70%, preferiblemente de al menos el 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, preferiblemente la fumarasa comprende SEQ ID NO: 16.

Preferiblemente, la enzima que cataliza la conversión de ácido málico en ácido fumárico es activa en el citosol tras la expresión de la secuencia de nucleótidos. La actividad citosólica de la enzima con actividad de fumarasa se prefiere para una elevada productividad de un ácido dicarboxílico por parte de la célula eucariótica. En el caso de que una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima con actividad de fumarasa comprenda una señal diana peroxisomal o mitocondrial (por ejemplo según se determina por el método descrito por Schlüter et al., Nucleic Acid Research 2007, Vol 25, D815-D822), se puede preferir suprimir dicha señal diana para localizar una enzima con actividad fumarasa en el citosol. Preferiblemente, una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima que cataliza la conversión de ácido málico en ácido fumárico se sobre-expresa por métodos conocidos en la técnica.

Se describe también una célula en donde al menos un gen que codifica alcohol deshidrogenasa no es funcional. Un gen de alcohol deshidrogenasa que no es funcional se utiliza en esta memoria para describir una célula eucariótica que comprende una actividad de alcohol-deshidrogenasa reducida en comparación con una célula en donde todos los genes que codifican una alcohol deshidrogenasa son funcionales. Un gen se puede convertir en no funcional por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo por mutación, interrupción o delección, por ejemplo mediante el método descrito por Gueldener et al. 2002 Nucleic Acids Research, Vol. 30, N° 6, e23. Preferiblemente, la célula es una *Saccharomyces cerevisiae* en donde uno o más genes *adh1* y/o *adh2* que codifican alcohol deshidrogenasa están inactivados.

Se describe también una célula que comprende, además, al menos un gen que codifica glicerol-3-fosfato deshidrogenasa que no es funcional. Un gen de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa que no es funcional se utiliza en esta memoria para describir una célula eucariótica que comprende una actividad de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa reducida, por ejemplo mediante mutación, interrupción o delección del gen que codifica glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, dando como resultado una formación disminuida de glicerol en comparación con la célula de tipo salvaje.

En otra realización preferida, la célula eucariótica recombinante de acuerdo con la presente invención comprende al menos un gen que codifica succinato deshidrogenasa que no es funcional. Una succinato deshidrogenasa que no es funcional se utiliza en esta memoria para describir una célula eucariótica que comprende una actividad de succinato deshidrogenasa reducida mediante mutación, interrupción o delección de al menos un gen que codifica succinato deshidrogenasa, dando como resultado una formación incrementada de ácido succínico en comparación con la célula de tipo salvaje. Una célula eucariótica que comprende un gen que codifica succinato deshidrogenasa, que no es funcional, puede ser, por ejemplo, *Aspergillus niger*, preferiblemente un *Aspergillus niger*, en donde uno o más genes que codifican succinato deshidrogenasa tales como *sdhA* no son funcionales.

5
10 Preferiblemente, una célula eucariótica de acuerdo con la presente invención que comprende una cualquiera de las modificaciones genéticas descritas en esta memoria es capaz de producir al menos 0,3, 0,5, 0,7 g/L de ácido succínico, preferiblemente al menos 1 g/L de ácido succínico, preferiblemente al menos 1,5, preferiblemente al menos 2 ó 2,5, 4,5, preferiblemente al menos 8, 10, 15 ó 20 g/L de ácido succínico, pero habitualmente es menor que 200 o menor que 150 g/L.

15 Una célula eucariótica preferida de acuerdo con la presente invención puede ser capaz de crecer en cualquier fuente de carbono adecuada conocida en la técnica y convertirse en un ácido dicarboxílico deseable según se menciona antes en esta memoria. La célula eucariótica puede ser capaz de convertir directamente biomasa vegetal, celulosas, hemicelulosas, pectinas, ramnosa, galactosa, fucosa, maltosa, maltodextrinas, ribosa, ribulosa, o almidón, derivados de almidón, sacarosa, lactosa y glicerol. Así, un organismo hospedante preferido expresa enzimas tales como celulasas (endocelulasas y exocelulasas) y hemicelulasas (p. ej. endo- y exo-xilanasas, arabinasas), necesarias para la conversión de celulosa en monómeros de glucosa y de hemicelulosa en monómeros de xilosa y arabinosa, pectinas capaces de convertir pectinas en ácido glucurónico y ácido galacturónico, o amilasas para convertir el almidón en monómeros de glucosa. Preferiblemente, la célula es capaz de convertir una fuente de carbono seleccionada del grupo que consiste en glucosa, fructosa, galactosa, xilosa, arabinosa, sacarosa, lactosa, rafinosa y glicerol.

20
25 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un ácido dicarboxílico, a saber ácido succínico, que comprende fermentar la célula eucariótica de acuerdo con la presente invención en un medio de fermentación adecuado y preparar el ácido dicarboxílico. Se encontró ventajoso utilizar una célula eucariótica según se define antes en esta memoria en el procedimiento para la producción de un ácido dicarboxílico tal como ácido succínico, ya que la mayoría de las células eucarióticas no requieren condiciones estériles para su propagación y son insensibles a las infecciones por bacteriófagos. El procedimiento de acuerdo con la presente invención puede realizarse en condiciones aerobias y anaerobias. Preferiblemente, el procedimiento se lleva a cabo en condiciones anaerobias o bajo condiciones micro-aerófilas o limitadas en oxígeno. Un proceso de fermentación anaerobio se define en esta memoria como un proceso de fermentación realizado en ausencia de oxígeno, o en el que no se consume esencialmente oxígeno, preferiblemente menos de 5, 2,5 ó 1 mmol/L/h, y en donde las moléculas orgánicas sirven tanto como donantes de electrones como aceptores de electrones.

30
35 Un proceso de fermentación limitado en oxígeno es un proceso en el que el consumo de oxígeno está limitado por la transferencia de oxígeno desde el gas al líquido. El grado de limitación en oxígeno se determina por la cantidad y composición del flujo de gas entrante, así como por las propiedades de mezclado/transferencia de masa reales del equipo de fermentación utilizado. Preferiblemente, en un proceso bajo condiciones limitadas en oxígeno, la tasa de consumo de oxígeno es de al menos 5,5, lo más preferiblemente de al menos 6 e incluso más preferiblemente de al menos 7 mmol/L/h.

40
45 El procedimiento para la producción de un ácido dicarboxílico de acuerdo con la presente invención se puede llevar a cabo a cualquier pH adecuado entre 1 y 9. Preferiblemente, el pH en el caldo de fermentación oscila entre 2 y 7, preferiblemente entre 3 y 5. Se encontró ventajoso poder llevar a cabo el procedimiento de acuerdo con la presente invención a un pH bajo, ya que esto evita la contaminación bacteriana y se necesitan menos sales alcalinas para la titulación para mantener el pH a un nivel deseado en el procedimiento para la producción de un ácido dicarboxílico.

50 Una temperatura adecuada a la que se puede llevar a cabo el procedimiento de acuerdo con la presente invención oscila entre 5 y 60°C, preferiblemente entre 10 y 50°C, más preferiblemente entre 15 y 35°C, lo más preferiblemente entre 18°C y 30°C. El experto en la técnica conoce las temperaturas óptimas para fermentar una célula eucariótica específica.

55 El ácido dicarboxílico que se produce en el procedimiento de acuerdo con la presente invención es ácido succínico. Se describen adicionalmente ácido fumárico y ácido málico.

60 Preferiblemente, el ácido dicarboxílico se recupera del caldo de fermentación por un método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo mediante cristalización, precipitación con amonio o tecnología de intercambio de iones.

Preferiblemente, el ácido dicarboxílico que se prepara en el procedimiento de acuerdo con la presente invención se convierte ulteriormente en un producto farmacéutico, cosmético, alimentario, para piensos o químico. El ácido succínico puede convertirse adicionalmente, por ejemplo, en un polímero tal como poli(succinato de butileno) (PBS) u otros polímeros adecuados derivados del mismo.

La presente invención se refiere también a un caldo de fermentación que comprende un ácido dicarboxílico, a saber ácido succínico, que se puede obtener mediante el procedimiento de acuerdo con la presente invención.

La invención se refiere a un procedimiento para la producción de un ácido dicarboxílico, a saber ácido succínico, en el que se utiliza una célula eucariótica en calidad de productor de ácido dicarboxílico, en donde se utiliza fosfoenolpiruvato carboxiquinasa para incrementar la producción de ácido dicarboxílico, preferiblemente en donde la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa es activa en el citosol. Preferiblemente, la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa es una enzima heteróloga, derivada preferiblemente de *Actinobacillus succinogenes* o *Mannheimia succiniciproducens*.

Modificaciones genéticas

Técnicas genéticas convencionales tales como la sobre-expresión de enzimas en las células hospedantes, la modificación genética de células hospedantes o técnicas de hibridación son métodos conocidos en la técnica tal como se describen en Sambrook y Russel (2001) "Molecular Cloning; A Laboratory Manual (3ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press o F. Ausubel et al. comps., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987). Métodos para la transformación, modificación genética, etc. de células hospedantes fúngicas se conocen, p. ej., de los documentos EP-A-0 635 574, WO 98/46772, WO 99/60102 y WO 00/37671, WO90/14423, EP-A-0481008, EP-A-0635 574 y US 6.265.186.

Descripción de las figuras

Figura 1: Mapa del vector pGBTOP-11 utilizado para la expresión fosfoenolpiruvato carboxiquinasa en *A. niger*.

Figura 2: Mapa del plásmido de pGB414SUS-01 que codifica PEP carboxiquinasa procedente de *Actinobacillus succinogenes* para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. CPO designa el par de codones optimizado.

Figura 3: Mapa del plásmido de pGB414SUS-04 que codifica PEP carboxiquinasa procedente de *Mannheimia succiniciproducens* para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. CPO designa el par de codones optimizado.

Figura 4: Mapa del plásmido de pDEL-SDHA.

Figura 5: Esquema de reemplazamiento de *sdhA*.

Figura 6: Mapa de pGBTOPAn5, en donde el promotor constitutivo *gpdA* impulsa la expresión de PCKa. Se utilizaron los flancos *GlaA* para la integración. ADN de *E. coli* se separó mediante digestión con *NotI*.

Figura 7: Mapa de pGBTOPAn6, en donde el promotor constitutivo *gpdA* impulsa la expresión de PCKa. Se utilizaron los flancos *GlaA* para la integración. ADN de *E. coli* se separó mediante digestión con *NotI*.

Figura 8: Mapa del plásmido de pGBS416PPK-1, que codifica PEP carboxiquinasa procedente de *Actinobacillus succinogenes* para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. CPO indica par de codones optimizado.

Figura 9: Mapa del plásmido de pGBS416PEK-1, que codifica PEP carboxiquinasa procedente de *Mannheimia succiniciproducens* para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. CPO indica par de codones optimizado.

Figura 10: Mapa del plásmido de pGBS415FUM-3 que contiene fumarasa procedente de *Rhizopus oryzae* (FUMR) y malato deshidrogenasa peroxisomal procedente de *Saccharomyces cerevisiae* (MDH3) para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. Las construcciones de genes sintéticas promotor de TDH1-FUMR-terminador de TDH1 y promotor de TDH3-MDH3-terminador de TDH3 se clonaron en el vector de expresión pRS415. CPO indica par de codones optimizado.

Figura 11: Niveles de ácido succínico (líneas discontinuas) y de ácido fumárico (líneas continuas) en cepas SUC-101 (O, control de vectores *vario*), SUC -152 (□, sobre-expresión de PCKa, MDH3, FUMR), SUC-154 (■, PCKm, MDH3, FUMR). Todos los genes sobre-expresados fueron optimizados en el par de codones para la expresión en *S. cerevisiae*. Todos los datos representan medias y desviaciones estándar de 3 experimentos de crecimiento independientes de SUC-152 y 2 experimentos de crecimiento independiente de SUC-154 y desviaciones medias y

estándares de 6 experimentos de crecimiento independiente de SUC-101.

Figura 12: Mapa del plásmido de pGBS414PPK-3, que contiene PEP carboxiquinasa procedente de *Actinobacillus succinogenes* (PCKa) y fumarato reductasa glicosomal procedente de *Trypanosoma brucei* (FRDg) para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. Las construcciones de genes sintéticas promotor de TDH1-PCKa-terminador de TDH1 y promotor de TDH3-FRDg-terminador de TDH3 se clonaron en el vector de expresión pRS414.

Figura 13: Mapa del plásmido de pGBS426PYC-2 que contiene piruvato carboxilasa procedente de *Saccharomyces cerevisiae* para expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. La secuencia de nucleótidos codificadora de PYC2 se obtuvo mediante PCR utilizando ADN genómico procedente de la cepa CEN.PK113-5D en calidad de molde y el producto de la PCR se clonó en el vector de expresión p426GPD.

Figura 14: Mapa del plásmido de pGBS414FRE-1 que codifica fumarato reductasa glicosomal (FRDg) procedente de *Trypanosoma brucei* para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. La construcción de genes sintética promotor de TDH3-FRDg-terminador de TDH3 se clonó en el vector de expresión pRS414.

Figura 15: Niveles de ácido succínico en cepas SUC-226 (□, PCKa, MDH3, FUMR, FRDg)-227 (▲, PYC2, PCKa, MDH3, FUMR, FRDg), SUC-228 (■, PYC2, MDH3, FUMR, FRDg) y SUC-230 (○, MDH3, FUMR, FRDg). Los datos representan la media de 3 experimentos de crecimiento independientes.

Los ejemplos siguientes son sólo para fines ilustrativos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Clonación de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa procedente de *Actinobacillus succinogenes* y *Mannheimia succiniciproducens* en *Aspergillus niger*

1.1. Construcciones de expresión

Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa [E.C. 4.1.1.49], número de acceso de GenBank 152977907, procedente de *Actinobacillus succinogenes* se analizó en cuanto a la presencia de secuencias señal utilizando SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) Bendtsen, J. et al. (2004) Mol. Biol. 340:783-795 y TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) Emanuelsson, O. et al. (2007) Nature Protocols 2, 953-971. El análisis según se describe por Schlüter et al., (2007) NAR, 35, D815-D822 reveló una secuencia señal PTS2 putativa en la posición 115-123. La secuencia de *A. succinogenes* (secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2) se modificó para asemejarse a la secuencia proteica de *Mannheimia succiniciproducens* reemplazando los aminoácidos EGY en la posición 120-122 por DAF (secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3; secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 4). La secuencia SEQ ID NO: 3 se sometió al método del par de codones según se describe en el documento WO2008/000632 para *A. niger*. La secuencia resultante SEQ ID NO: 7 se colocó detrás de la secuencia del promotor de GPDA constitutiva SEQ ID NO: 11, en donde las últimas 10 secuencias de nucleótidos fueron reemplazadas por la secuencia Kozak CACCGTAAA óptima. Se añadieron sitios de restricción convenientes. La secuencia resultante se sintetizó en Sloning (Puchheim, Alemania). El fragmento era *Sna*BI, *Sfi*l clonado en el vector de expresión pGBTOP11 de *A. niger* (véase la figura 1) utilizando sitios de restricción apropiados.

De igual manera, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa [E.C. 4.1.1.49], número de acceso de GenBank 52426348, procedente de *Mannheimia succiniciproducens*, se analizó en cuanto a la presencia de secuencias señal según se describe en Schlüter et al., (2007) NAR, 35, D815-D822. La secuencia tal como se muestra en SEQ ID NO: 5 (secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 6) no requería modificaciones. Subsiguientemente, la secuencia se sometió al método del par de codones según se describe en el documento WO2008/000632 para *A. niger*. La secuencia SEQ ID NO: 8 resultante se colocó detrás de la secuencia del promotor de GPDA constitutiva SEQ ID NO: 11, y se añadieron sitios de restricción convenientes. La secuencia resultante se sintetizó en Sloning (Puchheim, Alemania). El fragmento era *Sna*BI, *Sfi*l clonado en el vector de expresión pGBTOP11 de *A. niger* (véase la figura 1) utilizando sitios de restricción apropiados. Después de la clonación del gen PCKa en pGBTOP11, el vector se renombró pGBTOPAn5 (figura 6). Después de la clonación del gen PCKa en pGBTOP11, el vector se renombró pGBTOPAn6 (figura 7).

1.2. Transformación de *A. niger*

WT-1 de *A. niger*. Esta cepa de *A. niger* es CBS513.88 que comprende delecciones de los genes que codifican glucoamilasa (*glaA*), amilasa fúngica y amilasa ácida. WT-1 de *A. niger* se construyó utilizando la estrategia "MARKER-GENE FREE" según se describe en el documento EP 0 635 574 B1.

Las construcciones de expresión se co-transformaron en la cepa WT-1 de *A. niger* de acuerdo con el método descrito por Tilburn, J. et al. (1983) Gene 26, 205-221 y Kelly, J y Hynes, M. (1985) EMBO J., 4.475-479, con las siguientes modificaciones:

Las esporas germinan y se cultivan durante 16 horas a 30 grados Celsius en un matraz oscilante colocado en un agitador rotatorio a 300 rpm en medio mínimo de *Aspergillus* (100 ml). El medio mínimo de *Aspergillus* contiene, por litro: 6 g de NaNO₃, 0,52 g de KCl, 1,52 g de KH₂PO₄, 1,12 ml de KOH 4 M, 0,52 g de MgSO₄·7H₂O, 10 g de glucosa, 1 g de casaminoácidos, 22 mg de ZnSO₄·7H₂O, 11 mg de H₃BO₃, 5 mg de FeSO₄·7H₂O, 1,7 mg de CoCl₂·6H₂O, 1,6 mg de CuSO₄·5H₂O, 5 mg de MnCl₂·2H₂O, 1,5 mg de Na₂MoO₄·2H₂O, 50 mg de EDTA, 2 mg de riboflavina, 2 mg de tiamina-HCl, 2 mg de nicotinamida, 1 mg de piridoxina-HCl, 0,2 mg de ácido pantoténico, 4 g de biotina, 10 ml de penicilina (5000 UI/ml), estreptomina (5000 UG/ml) (Gibco).

- Para la preparación de protoplastos se utiliza Novozym 234™ (Novo Industries) en lugar de helicasa;
- Después de la formación de los protoplastos (60-90 minutos), se añade tampón KCl (KCl 0,8 M, ácido cítrico 9,5 mM, pH 6,2) hasta un volumen final de 45 ml, la suspensión de protoplastos se centrifuga durante 10 minutos a 3000 rpm a 4 grados Celsius en un rotor con cubo oscilante. Los protoplastos se resuspenden en 20 ml de tampón KCl y subsiguientemente se añaden 25 ml de tampón STC (sorbitol 1,2 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, CaCl₂ 50 mM). La suspensión de protoplastos se centrifuga durante 10 minutos a 3000 rpm a 4 grados Celsius en un rotor con cubo oscilante, se lava con tampón STC y se resuspende en tampón STC a una concentración de 10⁸ protoplastos/ml;
- A 200 microlitos de la suspensión de protoplastos se añade el fragmento de ADN, disuelto en 10 microlitros de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 0,1 mM) y 100 microlitros de disolución PEG (PEG 4000 al 20% (Merck), sorbitol 0,8 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, CaCl₂ 50 mM);
- Después de la incubación de la suspensión de protoplastos de ADN durante 10 minutos a la temperatura ambiente se añade lentamente una disolución de 1,5 ml de PEG (PEG 4000 al 60%, (Merck), Tris-HCl 10 mM pH 7,5, CaCl₂ 50 mM), con mezclado repetido de los tubos. Después de incubación durante 20 minutos a la temperatura ambiente, las suspensiones se diluyen con 5 ml de sorbitol 1,2 M, se mezclan mediante inversión y se centrifugan durante 10 minutos a 4000 rpm a la temperatura ambiente. Los protoplastos se resuspenden suavemente en 1 ml de sorbitol 1,2 M y se extienden en placas sobre medio de regeneración selectivo sólido que consiste en medio mínimo de *Aspergillus* sin riboflavina, tiamina.HCl, nicotinamida, piridoxina, ácido pantoténico, biotina, casaminoácidos y glucosa. En el caso de la selección de acetamida, el medio contiene acetamida 10 mM en calidad de la única fuente de nitrógeno y sacarosa 1 M en calidad agente osmótico y fuente de C. Alternativamente, los protoplastos se extienden sobre PDA (agar de patata dextrosa, Oxoid) suplementado con 1-50 microgramos/ml de fleomicina y sacarosa 1 M en calidad de agente osmótico. Las placas de regeneración se solidifican utilizando agar al 2% (agar nº 1, Oxoid L11). Después de la incubación durante 6-10 días a 30 grados Celsius, conidiosporas de transformantes se transfieren a placas que consisten en medio selectivo de *Aspergillus* (medio mínimo con contenido en acetamida como única fuente de nitrógeno en el caso de la selección de acetamida o PDA suplementado con 1-50 microgramos/ml de fleomicina en el caso de la selección de fleomicina) con glucosa al 2% y agarosa al 1,5% (Invitrogen) y se incuban durante 5-10 días a 30 grados Celsius. Los transformantes sencillos se aíslan y esta etapa de purificación selectiva se repite una vez, tras lo cual se almacenan los transformantes purificados.

1.3. Crecimiento en matraz oscilante de *A. niger*

En total 10 transformantes se seleccionan para cada una de las construcciones y la presencia de la construcción se confirma mediante PCR utilizando cebadores específicos para las construcciones. Subsiguientemente, las esporas se inoculan en 100 ml de medio enriquecido mínimo de *Aspergillus* que comprende 100 g/l de glucosa. Las cepas se desarrollan en una incubadora a 250 revoluciones por minuto durante cuatro días a 34 grados Celsius. El sobrenadante del medio de cultivo se analiza en cuanto a la formación de ácido oxálico, ácido málico, ácido fumárico y ácido succínico mediante HPLC y se compara con una cepa no transformada.

1.4. Análisis por HPLC

La HPLC se realiza para la determinación de ácidos orgánicos y azúcares en diferentes tipos de muestras. El principio de la separación en una columna de monosacáridos de Phenomenex Rezex-RHM se basa en la exclusión por el tamaño, exclusión de iones e intercambio de iones utilizando mecanismos de fase inversa. La detección tiene lugar mediante el índice de refracción diferencial y detectores ultravioleta.

Ejemplo 2A**Clonación de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa procedente de *Actinobacillus succinogenes* o *Mannheimia succiniciproducens* en *Saccharomyces cerevisiae*.**

5
2A.1. Construcciones de expresión

Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa [E.C. 4.1.1.49] número de acceso de GenBank 152977907 procedente de *Actinobacillus succinogenes* se analizó en cuanto a la presencia de secuencias señal según se describe bajo el parágrafo 1.1. La SEQ ID NO: 3 se sometió al método del par de codones según se describe en el documento WO2008/000632 para *S. cerevisiae*. La secuencia SEQ ID NO: 9 resultante se colocó detrás de la secuencia del promotor TDH1 constitutiva SEQ ID NO: 12 y delante de la secuencia del terminador TDH1 SEQ ID NO: 13, y se añadieron sitios de restricción convenientes. La secuencia resultante se sintetizó en Sloning (Puchheim, Alemania). La construcción de expresión pGBS414SUS-01 se creó después de una restricción con *Bam*HI/*Not*I del vector de expresión pRS414 de *S. cerevisiae* (Sirkoski R.S. y Hieter P, Genetics, 1989, 122(1):19-27) y ligando subsiguientemente en este vector un fragmento de restricción *Bam*HI/*Not*I que consistía en la construcción del gen sintético de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (origen *Actinobacillus succinogenes*) (figura 2). La mezcla de ligamiento se utiliza para la transformación de DH10B de *E. coli* (Invitrogen), dando como resultado la construcción de expresión pGBS414SUS-01 en levaduras (figura 2).

20
Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa [E.C. 4.1.1.49] número de acceso de GenBank 52426348 procedente de *Mannheimia succiniciproducens*, se identificó y modificó según se describe en el parágrafo 1.1. La SEQ ID NO: 5 se sometió al método del par de codones según se describe en el documento WO2008/000632 para *S. cerevisiae*. La secuencia SEQ ID NO: 10 resultante se colocó detrás de la secuencia del promotor TDH1 constitutiva SEQ ID NO: 12 y delante de la secuencia del terminador TDH1 SEQ ID NO: 13, y se añadieron sitios de restricción convenientes. La secuencia resultante se sintetizó en Sloning (Puchheim, Alemania). La construcción de expresión pGBS414SUS-04 se creó después de una restricción con *Bam*HI/*Not*I del vector de expresión pRS414 de *S. cerevisiae* (Sirkoski R.S. y Hieter P, Genetics, 1989, 122(1):19-27) y ligando subsiguientemente en este vector un fragmento de restricción *Bam*HI/*Not*I que consistía en la construcción del gen sintético de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (origen *Mannheimia succiniciproducens*) (figura 3). La mezcla de ligamiento se utiliza para la transformación de DH10B de *E. coli* (Invitrogen), dando como resultado la construcción pGBS414SUS-04 de expresión en levaduras (figura 3).

2A.2. Transformación y crecimiento en matraz oscilante

35
Las construcciones pGBS414SUS-01 y pGBS414SUS-04 se transforman independientemente en las cepas CEN.PK113-6B de *S. cerevisiae* (MATA *ura3-52 leu2-112 trp1-289*), RWB066 (MATA *ura3-52 leu2-112 trp1-289 adh1::lox adh2::Kanlox*) y RWB064 (MATA *ura3-52 leu2-112 trp1-289 adh1::lox adh2::lox gpd1::Kanlox*). Las mezclas de transformación se extienden en placas sobre levadura con base de nitrógeno (YNB) sin AA (Difco) + glucosa al 2% suplementado con aminoácidos apropiados. Los transformantes se inoculan en medio de Verduyn que comprende glucosa, suplementado con aminoácidos apropiados (Verduyn et al., 1992, Yeast. Jul; 8(7):501-17) y se hacen crecer en condiciones aerobias, anaerobias y limitadas en oxígeno en matraces oscilantes. El medio para el cultivo anaerobio se suplementa con 0,01 g/l de ergosterol y 0,42 g/l de Tween 80 disuelto en etanol (Andreasen y Stier, 1953, J. Cell. Physiol. 41, 23-36; Andreasen y Stier, 1954, J. Cell. Physiol, 43: 271-281). Todos los cultivos de levaduras se hacen crecer a 30°C en una incubadora oscilante a 250-280 rpm. A diferentes tiempos de incubación, se retiran partes alícuotas de los cultivos, se centrifugan y el medio se analiza mediante HPLC en cuanto a la formación de ácido oxálico, ácido málico, ácido fumárico y ácido succínico según se describe en la sección 1.4.

Ejemplo 2B**50 Clonación de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa procedente de *Actinobacillus succinogenes* o *Mannheimia succiniciproducens* en *Saccharomyces cerevisiae*****2B.1. Construcciones de expresión**

55
De una manera similar a la descrita en el Ejemplo 2A.1, el gen PCKa (SEQ ID NO: 9) se ligó en el vector de expresión pRS416 de *S. cerevisiae* (Sirkoski R.S. y Hieter P, Genetics, 1989, 122(1):19-27). La mezcla de ligamiento se utilizó para la transformación de células TOP10 de *E. coli* (Invitrogen), dando como resultado la construcción de expresión en levaduras pGBS416PPK-1 (Figura 8).

60
De igual manera, el gen PCKm (SEQ ID NO: 10) se ligó en pRS416. La mezcla de ligamiento se utilizó para la transformación de células TOP10 de *E. coli* (Invitrogen), dando como resultado la construcción pGBS416PEK-1 de expresión en levaduras (figura 9).

2B.2. Experimentos de transformación y de crecimiento en placas de microtitulación (MTP's)

Las construcciones pGBS416PPK-1 y pGBS416PEK-1 se transformaron independientemente en la cepa CEN.PK113-5D de *S. cerevisiae* (MATA *ura3-52*). Como control negativo, el vector vacío pRS416 se transformó en la cepa CEN.PK 113-5D. Mezclas de transformación se extendieron en placas sobre levadura con base de nitrógeno (YNB) sin AA (Difco) + glucosa al 2%. Los siguientes números de transformantes individuales se inocularon por duplicado en 250 microlitros de medio de Verduyn que comprende glucosa al 2% en MTP's de 96 pocillos profundos y se pre-cultivaron a 30 grados Celsius, 550 rpm y una humedad de 80% en una incubadora oscilante Infors Microplate: 12 transformantes pGBS416PPK-1 (PCKa), 12 pGBS416PEK-1 (PCKm) y 24 de control vector vacío pRS416. Después de 3 días, 25 microlitros del pre-cultivo presente en los pocillos de las MTP's se transfirieron a nuevas placas de MTP de 96 pocillos profundos que contenían medio de Verduyn con contenido en glucosa y CaCO₃ (concentraciones finales: glucosa 10%, CaCO₃ 1% p/v en un volumen total de 250 microlitros). Después de 7 días de crecimiento a 30 grados Celsius, 550 rpm y una humedad de 80% en una incubadora oscilante Infors Microplate, las MTP's se centrifugaron durante 2 minutos a 2000 rpm, se recogieron 200 microlitros de sobrenadante utilizando el dispositivo Multimek 96 (Beckman) y el sobrenadante se analizó mediante HPLC según se describe en el Ejemplo 1.4 en cuanto a la presencia de ácido succínico. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 1. Efecto de la inserción de PCKa y PCKm en *S. cerevisiae* sobre los niveles de producción de ácido succínico, comparado con la cepa control que comprende el vector vacío pRS416 después de 7 días de cultivo.

Cepa CEN.PK 113-5D de <i>S. cerevisiae</i> que comprende el plásmido:	Ácido succínico (mg/L)
pRS416	203±48 (n=48)
pGBS416PPK-1 (PCKa)	259±63 (n=24)
pGBS416PEK-1 (PCKm)	268±49 (n=24)

Los resultados en la Tabla 1 demuestran que la introducción y la sobre-expresión de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa procedente de *Actinobacillus succinogenes* o *Mannheimia succiniciproducens* daba como resultado un nivel de producción incrementado de ácido succínico en *S. cerevisiae* (1,8 veces, $p=4,92E-$, y 1,32 veces $P=2,95E-6$ test t de Student, respectivamente).

Ejemplo 2C

Clonación de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa procedente de *Actinobacillus succinogenes* o *Mannheimia succiniciproducens*, malato deshidrogenasa procedente de *Saccharomyces cerevisiae* y fumarasa procedente de *Rhizopus oryzae* en *Saccharomyces cerevisiae*.

2C.1. Secuencias de genes

Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa:

Las secuencias de genes de PEP carboxiquinasa procedente de *A. succinogenes* (PCKa) y *M. succiniciproducens* (PCKm) se diseñaron y sintetizaron según se describe en el apartado 2A.1.

Malato deshidrogenasa:

Malato deshidrogenasa peroxisomal (Mdh3) [E.C. 1.1.1.37], número de acceso de GenBank 1431095 se analizó en cuanto a la fijación como diana peroxisomal en hongos filamentosos utilizando el predictor PTS1 <http://mendel.imp.ac.at/mendeljsp/sat/pts1/PTS1predictor.jsp> con la función de predicción específica para hongos. Se separaron los aminoácidos C-terminales en las posiciones 341-343 (SKL), dando como resultado la proteína de SEQ ID NO: 14. SEQ ID NO: 14 se sometió al método del par de codones según se describe en el documento WO2008/000632 para *S. cerevisiae*, dando como resultado la SEQ ID NO: 15. El codón de terminación TGA en la SEQ ID NO: 15 se modificó a TAAG. La secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 15, que contenía TAAG como codón de terminación, se sintetizó detrás de la secuencia del promotor TDH3 constitutiva SEQ ID NO: 18 (600 pb más arriba del codón de inicio) y delante de la secuencia del terminador TDH3 SEQ ID NO: 19 (300 pb más abajo del codón de terminación) y se añadieron sitios de restricción convenientes. La construcción TDH3p-MDH3-TDH-3t sintética (SEQ ID NO: 20) se sintetizó en Sloning (Puchheim, Alemania).

Fumarasa:

Fumarasa [E.C. 4.2.1.2], número de acceso de GenBank 469103, procedente de *Rhizopus oryzae* se analizó en

cuanto a la presencia de secuencias señal utilizando SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) Bendtsen, J. et al. (2004) Mol. Biol. 340:783-795 y TargetP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) Emanuelsson, O. et al. (2007) Nature Protocols 2, 953-971. Se identificó una secuencia diana mitocondrial putativa en los primeros 23 aminoácidos de la proteína. Para evitar una potencial fijación como objetivo a mitocondrias en *S. cerevisiae*, se separaron los primeros 23 aminoácidos, dando como resultado la SEQ ID NO: 16, y se reintrodujo un aminoácido metionina. La SEQ ID NO: 16 se sometió al método del par de codones según se describe en el documento WO2008/000632 para *S. cerevisiae*, proporcionando la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 17. El codón de terminación TAA en la SEQ ID NO: 17 se modificó a TAAG. La SEQ ID NO: 17 que contenía TAAG como codón de terminación se sintetizó detrás de la secuencia del promotor TDH1 constitutiva SEQ ID NO: 12 y delante de la secuencia del terminador TDH1 SEQ ID NO: 13, y se añadieron sitios de restricción convenientes. La construcción TDH1p-FumR-TDH1t sintética (SEQ ID NO: 21) se sintetizó en Sloning (Puchheim, Alemania).

2C.2. Construcción de construcciones de expresión.

La construcción de expresión pGBS415FUM-3 (figura 10) se creó después de una restricción *Bam*HI/*Not*I del vector de expresión pRS415 de *S. cerevisiae* (Sirkoski R.S. y Hieter P, Genetics, 1989, 122(1):19-27) y ligando subsiguientemente en este vector un fragmento de restricción *Bam*HI/*Not*I que consistía en la construcción del gen sintético fumarasa (origen *Rhizopus oryzae*) (SEQ ID NO: 21). La mezcla de ligamiento se utilizó para la transformación de TOP10 de *E. coli* (Invitrogen), dando como resultado la construcción pGBS415FUM-1 de expresión en levaduras. Subsiguientemente, pGBK415FUM-1 se restringió con *Asc*I y *Not*I. Para crear pGBS415FUM-3, un fragmento de restricción *Asc*I/*Not*I que consistía en malato deshidrogenasa peroxisomal procedente de la construcción génica sintética (*MDH3*) de *S. cerevisiae* (SEQ ID NO: 20) se ligó en el vector pGBS415FUM-1 restringido. La mezcla de ligamiento se utilizó para la transformación de TOP10 de *E. coli* (Invitrogen), dando como resultado la construcción pGBS415FUM-3 de expresión en levaduras (figura 10).

La construcción de las construcciones de expresión pGBS414SUS-01 y pGBS414SUS-04 se describe bajo el Ejemplo 2A.1.

2C.3. Cepas de *S. cerevisiae*

Los plásmidos pGBS414SUS-01, pGBS415FUM-3 y pRS416 se transformaron en la cepa CEN.PK113-6B (MATA *ura3-52 leu2-112 trp1-289*) de *S. cerevisiae* para crear la cepa SUC-152. Los plásmidos pGBS414SUS-04, pGBS415FUM-3 y pRS416 se transformaron en la cepa CEN.PK113-6B (MATA *ura3-52 leu2-112 trp1-289*) de *S. cerevisiae* para crear la cepa SUC-154. Una cepa control que sobre-expresa sólo vectores vacíos (SUC-101) se creó mediante transformación de pRS414, pRS415 y pRS416. Todos los genes se optimizaron mediante el par de codones para la expresión en *S. cerevisiae*. Los vectores de expresión se transformaron en levaduras mediante electroporación. Las mezclas de transformación se extendieron en placas sobre levadura con base de nitrógeno (YNB) sin AA (Difco) + glucosa al 2%. Los genes sobre-expresados en las cepas SUC-152 y SUC-154 se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas de levaduras construidas para el Ejemplo 2C.

Nombre	Antecedente	Plásmidos	Genes
SUC-152	CEN.PK113-6B	pGBS414SUS-01 pGBS415FUM-3 pRS416 (vector vacío)	PCKa FUMR, MDH3
SUC-154	CEN.PK113-6B	pGBS414SUS-04 pGBS415FUM-3 pRS416 (vector vacío)	PCKm FUMR, MDH3
SUC-101	CEN.PK113-6B	pRS414 (vector vacío) pRS415 (vector vacío) pRS416 (vector vacío)	

2D.4. Experimentos de crecimiento y producción de ácido succínico y ácido fumárico

Transformantes se inocularon en 20 ml de medio de pre-cultivo que consistía en medio de Verduyn (Verduyn et al., 1992, Yeast. Jul;8(7):501-17) que comprende galactosa al 2% (p/v) y se hacen crecer en condiciones aerobias en matraces oscilantes de 100 ml en una incubadora oscilante a 30°C a 250 rpm. Después de 72 horas, el cultivo se centrifugó durante 5 minutos a 4750 rpm. Se utilizó 1 ml de sobrenadante para medir los niveles de ácido succínico mediante HPLC según se describe en la sección 1.5. El sobrenadante remanente se decantó y el sedimento (células) se resuspendió en 1 ml de medio de producción. El medio de producción consistía en medio de Verduyn con galactosa al 10% (p/v) y CaCO₃ al 1% (p/v). Las células resuspendidas se inocularon en 50 ml de medio de

producción en matraces oscilantes de 100 ml y se hicieron crecer en una incubadora oscilante a 30°C a 100 rpm. A diversos instantes, se tomó del cultivo 1 ml de muestra. Los niveles de ácido succínico y ácido fumárico se midieron mediante HPLC según se describe en la sección 1.4 (Figura 11).

5 Cepas transformadas con vectores vacíos (cepa control) producían hasta 0,3 g/L de ácido succínico (figura 11, línea discontinua). La sobre-expresión de PEP carboxiquinasa procedente de *M. succiniciproducens* (PCKm), malato deshidrogenasa peroxisomal (MDH3) procedente de *S. cerevisiae* y fumarasa procedente de *R. oryzae* (FUMR) dio como resultado un nivel de producción de 0,9 g/L de ácido succínico. La sobre-expresión de PEP carboxiquinasa procedente de *A. succinogenes* (PCKa), MDH3 y FUMR dio como resultado un nivel de producción de ácido succínico de 1,0 g/L. Estos resultados demuestran que cuando *S. cerevisiae* se transformó con un MDH3 truncado y FUMR además de PCKa o PCKm, se produjo una cantidad adicionalmente incrementada de ácido succínico en comparación con una *S. cerevisiae* que sobre-expresa PCKa o PCKm solo (Tabla 1).

15 Cepas transformadas con vectores vacíos (cepa control) producían hasta 14 mg/L de ácido fumárico después de 8 días de crecimiento (figura 11, línea continua). La sobre-expresión de PEP carboxiquinasa procedente de *A. succinogenes* (PCKa), malato deshidrogenasa procedente de *S. cerevisiae* (MDH3) y fumarasa procedente de *R. oryzae* (FUMR) dieron como resultado una producción máxima de 55 mg/L de ácido fumárico después de 7 días de crecimiento. La sobre-expresión de PEP carboxiquinasa procedente de *M. succiniciproducens* (PCKm), malato deshidrogenasa procedente de *S. cerevisiae* (MDH3) y fumarasa procedente de *R. oryzae* (FUMR) dieron como resultado una producción máxima de 52 mg/L de ácido fumárico después de 8 días de crecimiento.

Estos datos demuestran que la sobre-expresión de PCKa o PCKm, MDH3 y FUMR en *S. cerevisiae* daba como resultado niveles de producción incrementados de ácido fumárico en comparación con una correspondiente *S. cerevisiae* de tipo salvaje.

25

Ejemplo 2D

30 **Clonación de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa procedente de *Actinobacillus succinogenes*, piruvato carboxilasa procedente de *Saccharomyces cerevisiae*, malato deshidrogenasa procedente de *Saccharomyces cerevisiae*, fumarasa procedente de *Rhizopus oryzae* en *Saccharomyces cerevisiae* y fumarato reductasa procedente de *Trypanosoma brucei*.**

2D.1. Secuencias de genes

35 Fumarato reductasa glicosomal (FRDg) [E.C. 1.3.1.6], número de acceso de GenBank 23928422, procedente de *Trypanosoma brucei* se analizó en cuanto a la fijación como objetivo peroxisomal en hongos filamentosos utilizando el predictor PTS1 <http://mendel.imp.ac.at/mendeljsp/sat/pts1/PTS1predictor.jsp> con la función de predicción específica para hongos. Los aminoácidos C-terminales en las posiciones 1140-1142 (SKI) se separaron de la proteína, dando como resultado la SEQ ID NO: 22. La SEQ ID NO: 22 se sometió al método del par de codones según se describe en la solicitud PCT/EP2007/05594 para la expresión en *S. cerevisiae*. La secuencia SEQ ID NO: 23 resultante se colocó detrás de la secuencia del promotor TDH3Sc constitutiva de SEQ ID NO: 24 y delante de la secuencia del terminador TDH3Sc SEQ ID NO: 25, y se añadieron sitios de restricción convenientes. El codón de terminación en SEQ ID NO: 23 se modificó a TAAG. La secuencia resultante se sintetizó en Sloning (Puchheim, Alemania).

45 La secuencia de genes de PEP carboxiquinasa procedente de *A. succinogenes* se describió en la sección 2A.1. Las secuencias de genes de malato deshidrogenasa procedente de *S. cerevisiae* y fumarasa procedente de *R. oryzae* se describieron bajo 2C.1.

50 Piruvato carboxilasa citoplásmica procedente de *Saccharomyces cerevisiae* (Pyc2p) [E.C. 6.4.1.1.], número de acceso de GenBank 1041734, SEQ ID NO: 26 es codificada por la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 27. ADN genómico procedente de la cepa CEN.PK113-5D (MATA *ura3-52*) de *S. cerevisiae* se utilizó como molde para amplificar la secuencia codificadora de *PYC2* (SEQ ID NO: 29), utilizando los cebadores P1 SEQ ID NO: 28 y P2 SEQ ID NO: 29 y la ADN polimerasa de Phusion (Finnzymes, Finlandia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se incluyeron sitios de restricción convenientes en los cebadores para fines de clonación posteriores.

55

2D.2. Construcción de construcciones de expresión

La construcción de expresión pGBS414PPK-3 (figura 12) se creó después de una restricción *Bam*HI/*Not*I del vector de expresión pRS414 de *S. cerevisiae* (Sirkoski R.S. y Hieter P, Genetics, 1989, 122(1):19-27) y subsiguientemente se ligó en este vector un fragmento de restricción *Bam*HI/*Not*I que consistía en la construcción del gen sintético de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (origen *Actinobacillos succinogenes*) (véase 2A.1). La mezcla de ligamiento se utilizó para la transformación de TOP10 de *E. coli* (Invitrogen), dando como resultado la construcción de expresión pGBS414PPK-1 en levaduras. Subsiguientemente, pGBK414PPK-1 se restringió con *Asc*I y *Not*I. Para crear pGBS414PPK-3, un fragmento de restricción *Asc*I/*Not*I, que consistía en la construcción del gen sintético de fumarato reductasa glicosomal procedente de *T. brucei* (FRDg) (véase 2D.1) se ligó en el vector pGBS414PPK-1 restringido. La mezcla de ligamiento se utilizó para la transformación de TOP10 de *E. coli* (Invitrogen), dando como resultado la construcción pGBS414PPK-3 de expresión en levaduras (figura 12).

La construcción de expresión pGBS426PYC-2 (figura 13) se creó después de una restricción *Spe*I/*Xho*I del vector de expresión p426GPD en *S. cerevisiae* (Mumberg et al., Gene. 1995, 14 abril 1995; 156(1):119-22) y ligando subsiguientemente en este vector un fragmento de restricción *Spe*I/*Xho*I que consistía en la secuencia de nucleótidos de *PYC2* amplificada (SEQ ID NO: 29). La mezcla de ligamiento se utilizó para la transformación de TOP10 de *E. coli* (Invitrogen), dando como resultado la construcción pGBS426PYC-2 de expresión en levaduras (figura 13).

La construcción de expresión pGBS414FRE-1 (figura 14) se creó después de una restricción *Bam*HI/*Not*I del vector de expresión pRS414 de *S. cerevisiae* (Sirkoski R.S. y Hieter P, Genetics, 1989, 122(1):19-27) y subsiguientemente se ligó en este vector un fragmento de restricción *Bam*HI/*Not*I que consistía en la construcción del gen sintético de fumarato reductasa glicosomal (origen *Trypanosoma brucei*) (véase 2D.1). La mezcla de ligamiento se utilizó para la transformación de TOP10 de *E. coli* (Invitrogen), dando como resultado la construcción pGBS414FRE-1 de expresión en levaduras (figura 14).

La construcción de la construcción de expresión pGBS415FUM-3 se describió en el apartado 2C.2.

2D.3. Cepas de *S. cerevisiae*

Las cepas SUC-226, SUC-227, SUC-228 y SUC-230 se obtuvieron mediante transformación de diferentes combinaciones de los plásmidos pGBS414FRE-1, pGBS414PPK-3, pGBS415FUM-1, pGBS426PYC-2 y p426GPD en la cepa CEN.PK113-6B (MATA *ura3-52 leu2-112 trp1-289*), según se representa en la Tabla 3.

Tabla 3. Cepas de levaduras construidas para el Ejemplo 2D.

Nombre	Antecedente	Plásmidos	Genes
SUC-226	CEN.PK113-6B	pGBS414PPK-3 pGBS415FUM-3 p426GPD (vector vacío)	PCKa, FRDg FUMR, MDH3
SUC-227	CEN.PK113-6B	pGBS414PPK-3 pGBS415FUM-3 pGBS426PYC-2	PCKa, FRDg FUMR, MDH3 PYC2
SUC-228	CEN.PK113-6B	pGBS414FRE-1 pGBS415FUM-3 pGBS426PYC-2	FRDg FUMR, MDH3 PYC2
SUC-230	CEN.PK113-6B	pGBS414FRE-1 pGBS415FUM-3 p426GPD (vector vacío)	FRDg FUMR, MDH3

2D.4. Experimentos de crecimiento y producción de ácido succínico

Los parámetros de crecimiento y los análisis de las muestras se realizaron según se describe en el ejemplo 2C.4 con las siguientes modificaciones: el pre-cultivo se realizó utilizando glucosa al 2% (p/v) como fuente de carbono. En el medio de producción se utilizó glucosa al 10% (p/v) como fuente de carbono.

Según se representa en la Figura 15, la cepa SUC-230 que sobre-expresa *MDH3*, *FUMR* y *FRDg* producía hasta 3,0 g/L de ácido succínico. La sobre-expresión adicional de *PCKa* incrementaba la producción de ácido succínico hasta 3,4 g/L (cepa SUC-226), y la sobre-expresión adicional de *PYC2* incrementaba la producción de ácido succínico hasta 3,7 g/L (cepa SUC-228). Sorprendentemente, la sobre-expresión tanto de *PCKa* como de *PYC2* (SUC-227) dio como resultado un incremento de 1,5 de los niveles de producción de ácido succínico hasta 5,0 g/L, en comparación

con el efecto de PCK y PYC solos. Estos resultados demuestran un efecto sinérgico de la sobre-expresión combinada procedente tanto de *A. succinogenes* (PCKa) como de piruvato carboxilasa procedente de *S. cerevisiae* (PYC2) sobre los niveles de producción de ácido succínico en *S. cerevisiae*.

5 **Ejemplo 3**

Inactivación de los genes codificadores de succinato deshidrogenasa en *Aspergillus niger*

3.1. Identificación

10 ADN genómico de la cepa CBS513.88 de *Aspergillus niger* se secuenció y analizó. Se identificaron dos genes con proteínas traducidas anotadas como proteínas homólogas a succinato deshidrogenasa, y se denominaron sdhA y sdhB, respectivamente. Secuencias de los loci de sdhA (An16g07150) y sdhB (An02g12770) están disponibles de GenBank con los números de acceso 145253004 y 145234071, respectivamente. Vectores de reemplazamiento
15 génico para sdhA y sdhB se diseñaron de acuerdo con principios conocidos y que se construyeron de acuerdo con procesos de clonación rutinarios (véanse las Figuras 4 y 5). Los vectores comprenden las regiones flanqueantes de aproximadamente 1000 pb de los ORFs de sdh para la recombinación homóloga en los locis genómicos predestinados. Además, contienen el marcador de selección *amdS* bi-direccional de *A. nidulans*, impulsado por el promotor *gpdA*, entre repeticiones directas. El diseño general de estos vectores de delección se describió previamente
20 en los documentos EP635574B y WO 98/46772.

3.2. Inactivación del gen *sdhA* en *Aspergillus niger*.

25 Se aisló ADN lineal del vector de delección pDEL-SDHA (figura 4) y se utilizó para transformar CBS513.88 de *Aspergillus niger* según se describe en: Biotechnology of Filamentous fungi: Technology and Products. (1992) Reed Publishing (EE.UU.); Capítulo 6: Transformation págs. 113 a 156. Este ADN lineal puede integrarse en el genoma en el locus *sdhA*, sustituyendo así al gen *sdhA* por el gen *amdS* según se representa en la Figura 6. Se seleccionaron transformantes en medios de acetamida y se purificaron colonias de acuerdo con los procesos convencionales según se describe en el documento EP635574B. Las esporas se extendieron en placas en medio de fluoroacetamida para
30 seleccionar las cepas que perdían el marcador *amdS*. Las colonias en crecimiento se diagnosticaron mediante PCR para la integración en el locus *sdhA*, y las cepas candidatas se sometieron a ensayo mediante análisis Southern para la delección del gen *sdhA*. La delección del gen *sdhA* era detectable mediante la reducción en tamaño de ~ 2,2 kb de fragmentos de ADN (fragmento de tipo salvaje de 4,6 kb frente a 2,4 kb para una delección con éxito de SDHA) que cubren el locus completo y se hibridaron a sondas apropiadas. Aproximadamente 9 cepas mostraban una separación
35 del gen *sdhA* genómico procedente de una agrupación de aproximadamente 96 transformantes iniciales.

La cepa dSDHA se seleccionó como una cepa representativa con un gen *sdhA* inactivado. La producción de ácido succínico por parte de la cepa dSDHA se midió según se describe en el Ejemplo 4.

40 **Ejemplo 4**

Clonación de PCKa y PCKm en dSDHA de *A. niger* y crecimiento en placas de microtitulación (MTP's)

45 La cepa dSDHA de *A. niger* del ejemplo 3.2 se transformó con la construcción de expresión pGBTOPAn5 (figura 6) que comprende PEP carboxiquinasa procedente de *Actinobacillus succinigenes* (PCKa, SEQ ID NO: 7) y la construcción de expresión pGBTOPAn6 (figura 7) que comprende PEP carboxiquinasa procedente de *Mannheimia succiniciproducens* (PCKm, SEQ ID NO: 8) según se describe en el Ejemplo 1.1., de acuerdo con el método de transformación según se describe en el Ejemplo 1.2.

50 Se tomaron transformantes de *A. niger* utilizando Qpix y se transfirieron a MTP's que contenían medio selectivo. Después de 7 días de incubación a 30 grados Celsius, la biomasa se transfirió a mano o con un recolector de colonias a MTP's que contenían PDA. Después de 7 días de incubación a 30 grados Celsius, se esporuló la biomasa. Estas esporas se resuspendieron utilizando el Multimek 96 (Beckman) en 100 microlitros de medio de *Aspergillus* enriquecido mínimo que contenía glucosa al 10%. Subsiguientemente, 2 MTP's con 170 microlitros de
55 medio de *Aspergillus* enriquecido mínimo que contenía glucosa al 10% y CaCO₃ al 1% se inocularon con 30 microlitros de la suspensión de esporas. De igual manera, dSDHA y la cepa GBS513.88 control de *A. niger* se inocularon en las MTP's. Estas MTP's se incubaron durante 5 días a 34 grados Celsius, 550 rpm a 80% de humedad. Al cabo de 5 días, se recolectaron 160 microlitros utilizando el Multimek 96 (Beckman). El ácido succínico en el medio se midió mediante HPLC según se describe en el Ejemplo 1.4. Los resultados se muestran en la Tabla
60 3.

Tabla 4. Efecto de la delección de succinato deshidrogenasa (SDHA) e inserción de PCKa y PCKm en *A. niger* sobre

los niveles de producción de ácido succínico

Cepa de <i>A. niger</i>	Ácido succínico mg/l
CBS513.88	38
dSDHA	50
dSDHA + PCKa	160
d,SDHA + PCKm	241

5 Los resultados en la Tabla 4 demuestran que la inserción de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa procedente tanto de *A. succinogenes* como de *M. succiniciproducens* aumentaba los niveles de producción de ácido succínico por parte de *A. niger*.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DSM IP Assets BV
 Verwaal, René
 Damveld, Robbertus Antonius
 Sagt, Cornelis, Maria, Jacobus
 Wu, Liang

<120> Producción de ácido dicarboxílico en eucariotas
 <130> 26347WO

<140> 26347WO
 <141> 2008-11-14

<160> 29

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
 <211> 538
 <212> PRT
 <213> Actinobacillus succinogenes

<400> 1

Met Thr Asp Leu Asn Lys Leu Val Lys Glu Leu Asn Asp Leu Gly Leu
 1 5 10 15

Thr Asp Val Lys Glu Ile Val Tyr Asn Pro Ser Tyr Glu Gln Leu Phe
 20 25 30

Glu Glu Glu Thr Lys Pro Gly Leu Glu Gly Phe Asp Lys Gly Thr Leu
 35 40 45

Thr Thr Leu Gly Ala Val Ala Val Asp Thr Gly Ile Phe Thr Gly Arg
 50 55 60

Ser Pro Lys Asp Lys Tyr Ile Val Cys Asp Glu Thr Thr Lys Asp Thr
 65 70 75 80

Val Trp Trp Asn Ser Glu Ala Ala Lys Asn Asp Asn Lys Pro Met Thr
 85 90 95

Gln Glu Thr Trp Lys Ser Leu Arg Glu Leu Val Ala Lys Gln Leu Ser
 100 105 110

Gly Lys Arg Leu Phe Val Val Glu Gly Tyr Cys Gly Ala Ser Glu Lys
 115 120 125

ES 2 383 473 T3

His Arg Ile Gly Val Arg Met Val Thr Glu Val Ala Trp Gln Ala His
 130 135 140

Phe Val Lys Asn Met Phe Ile Arg Pro Thr Asp Glu Glu Leu Lys Asn
 145 150 155 160

Phe Lys Ala Asp Phe Thr Val Leu Asn Gly Ala Lys Cys Thr Asn Pro
 165 170 175

Asn Trp Lys Glu Gln Gly Leu Asn Ser Glu Asn Phe Val Ala Phe Asn
 180 185 190

Ile Thr Glu Gly Ile Gln Leu Ile Gly Gly Thr Trp Tyr Gly Gly Glu
 195 200 205

Met Lys Lys Gly Met Phe Ser Met Met Asn Tyr Phe Leu Pro Leu Lys
 210 215 220

Gly Val Ala Ser Met His Cys Ser Ala Asn Val Gly Lys Asp Gly Asp
 225 230 235 240

Val Ala Ile Phe Phe Gly Leu Ser Gly Thr Gly Lys Thr Thr Leu Ser
 245 250 255

Thr Asp Pro Lys Arg Gln Leu Ile Gly Asp Asp Glu His Gly Trp Asp
 260 265 270

Glu Ser Gly Val Phe Asn Phe Glu Gly Gly Cys Tyr Ala Lys Thr Ile
 275 280 285

Asn Leu Ser Gln Glu Asn Glu Pro Asp Ile Tyr Gly Ala Ile Arg Arg
 290 295 300

Asp Ala Leu Leu Glu Asn Val Val Val Arg Ala Asp Gly Ser Val Asp
 305 310 315 320

Phe Asp Asp Gly Ser Lys Thr Glu Asn Thr Arg Val Ser Tyr Pro Ile
 325 330 335

Tyr His Ile Asp Asn Ile Val Arg Pro Val Ser Lys Ala Gly His Ala
 340 345 350

ES 2 383 473 T3

Thr Lys Val Ile Phe Leu Thr Ala Asp Ala Phe Gly Val Leu Pro Pro
 355 360 365

Val Ser Lys Leu Thr Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Tyr Phe Leu Ser Gly
 370 375 380

Phe Thr Ala Lys Leu Ala Gly Thr Glu Arg Gly Val Thr Glu Pro Thr
 385 390 395 400

Pro Thr Phe Ser Ala Cys Phe Gly Ala Ala Phe Leu Ser Leu His Pro
 405 410 415

Ile Gln Tyr Ala Asp Val Leu Val Glu Arg Met Lys Ala Ser Gly Ala
 420 425 430

Glu Ala Tyr Leu Val Asn Thr Gly Trp Asn Gly Thr Gly Lys Arg Ile
 435 440 445

Ser Ile Lys Asp Thr Arg Gly Ile Ile Asp Ala Ile Leu Asp Gly Ser
 450 455 460

Ile Glu Lys Ala Glu Met Gly Glu Leu Pro Ile Phe Asn Leu Ala Ile
 465 470 475 480

Pro Lys Ala Leu Pro Gly Val Asp Pro Ala Ile Leu Asp Pro Arg Asp
 485 490 495

Thr Tyr Ala Asp Lys Ala Gln Trp Gln Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala
 500 505 510

Asn Arg Phe Val Lys Asn Phe Val Lys Tyr Thr Ala Asn Pro Glu Ala
 515 520 525

Ala Lys Leu Val Gly Ala Gly Pro Lys Ala
 530 535

<210> 2
 <211> 1617
 <212> DNA
 <213> Actinobacillus succinogenes

 <400> 2
 atgactgact taaacaaact cgtaaagaa cttaatgact tagggcttac cgatgttaag 60
 gaaattgtgt ataaccgag ttatgaacaa cttttcgagg aagaaaccaa accggggttg 120

ES 2 383 473 T3

gagggtttcg ataaagggac gttaaccacg cttggcgcgg ttgccgtcga tacggggatt 180
 tttaccggtc gttcaccgaa agataaatat atcgtttgcg atgaaactac gaaagacacc 240
 gtttggtgga acagcgaagc ggcgaaaaac gataacaaac cgatgacgca agaaacttgg 300
 aaaagtttga gagaattagt ggcgaaaaca ctttcocggta aacgtttatt cgtggtagaa 360
 ggttactgcg gcgccagtga aaaacacogt atcgggtgtgc gtatggttac tgaagtggca 420
 tggcaggcgc attttgtgaa aaacatgttt atccgaccga ccgatgaaga gttgaaaaat 480
 ttcaaagcgg attttaccgt gttaaaocgg gctaaatgta ctaatccgaa ctggaaagaa 540
 caaggtttga acagtgaaaa ctttgcgcgt ttcaatatta ccgaaggtat tcagcttatt 600
 ggcggtactt ggtacggcgg tgaaatgaaa aaaggatgt tctcaatgat gaactacttc 660
 ctgccgttaa aagggtgtggc ttccatgcac tgttccgcca acgtaggtaa agacggtgac 720
 gtggctatth tcttcggttt atccggtagc ggtaaaaaca cgttttcgac cgatcctaaa 780
 cgccaattaa tcggtgatga cgaacacggg tgggatgaat ccggcgtatt taactttgaa 840
 ggcggttggt acgcgaaaac cattaactta tctcaagaaa acgaaccgga tatttacggc 900
 gcaatccgtc gtgacgcatt attagaaaac gtcgtggttc gtgcagacgg ttccggtgac 960
 tttgacgacg gttcaaaaaac agaaaatacc cgtgtttcat atccgattta ccacatcgac 1020
 aacatcgttc gtccggtatc gaaagccggg catgcaacca aagtgatttt cttaacccgcg 1080
 gacgcattcg gcgtattgcc gccggtttca aaactgactc cggaaacaaac cgaatactac 1140
 ttcttatccg gctttactgc aaaattagcg ggtacggaac gcggcgtaac cgaaccgact 1200
 ccgacattct cggcctgtht cggtgccgca ttcttaagcc tgcacccgat tcaatatgcy 1260
 gacgtgthtg tcgaacgcac gaaagcctcc ggtgcggaag cttatthtgg gaacaocggg 1320
 tggaacggca cgggtaaacg tatttcaatc aaagataccc gcggtattat cgatgcgatt 1380
 ttggacggtt caatcgaaaa agcggaaatg ggcgaattgc caatctthaa tttagcgtatt 1440
 cctaaagcat taccgggtgt tgatcctgct atthtggatc cgcgcgatac ttaocgagac 1500
 aaagcgaat ggcaagthaa agcggaaatg ttggcaaac gthtccgtgaa aaactthtgcg 1560
 aaatatacgg cgaatccgga agcggctaaa ttagthtggc cgggtccaaa agcataa 1617

<210> 3
 <211> 538
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> PEPCK A.s., en donde EGY está reemplazado por DAF

ES 2 383 473 T3

<400> 3

Met Thr Asp Leu Asn Lys Leu Val Lys Glu Leu Asn Asp Leu Gly Leu
1 5 10 15

Thr Asp Val Lys Glu Ile Val Tyr Asn Pro Ser Tyr Glu Gln Leu Phe
20 25 30

Glu Glu Glu Thr Lys Pro Gly Leu Glu Gly Phe Asp Lys Gly Thr Leu
35 40 45

Thr Thr Leu Gly Ala Val Ala Val Asp Thr Gly Ile Phe Thr Gly Arg
50 55 60

Ser Pro Lys Asp Lys Tyr Ile Val Cys Asp Glu Thr Thr Lys Asp Thr
65 70 75 80

Val Trp Trp Asn Ser Glu Ala Ala Lys Asn Asp Asn Lys Pro Met Thr
85 90 95

Gln Glu Thr Trp Lys Ser Leu Arg Glu Leu Val Ala Lys Gln Leu Ser
100 105 110

Gly Lys Arg Leu Phe Val Val Asp Ala Phe Cys Gly Ala Ser Glu Lys
115 120 125

His Arg Ile Gly Val Arg Met Val Thr Glu Val Ala Trp Gln Ala His
130 135 140

Phe Val Lys Asn Met Phe Ile Arg Pro Thr Asp Glu Glu Leu Lys Asn
145 150 155 160

Phe Lys Ala Asp Phe Thr Val Leu Asn Gly Ala Lys Cys Thr Asn Pro
165 170 175

Asn Trp Lys Glu Gln Gly Leu Asn Ser Glu Asn Phe Val Ala Phe Asn
180 185 190

Ile Thr Glu Gly Ile Gln Leu Ile Gly Gly Thr Trp Tyr Gly Gly Glu
195 200 205

ES 2 383 473 T3

Met Lys Lys Gly Met Phe Ser Met Met Asn Tyr Phe Leu Pro Leu Lys
 210 215 220

Gly Val Ala Ser Met His Cys Ser Ala Asn Val Gly Lys Asp Gly Asp
 225 230 235 240

Val Ala Ile Phe Phe Gly Leu Ser Gly Thr Gly Lys Thr Thr Leu Ser
 245 250 255

Thr Asp Pro Lys Arg Gln Leu Ile Gly Asp Asp Glu His Gly Trp Asp
 260 265 270

Glu Ser Gly Val Phe Asn Phe Glu Gly Gly Cys Tyr Ala Lys Thr Ile
 275 280 285

Asn Leu Ser Gln Glu Asn Glu Pro Asp Ile Tyr Gly Ala Ile Arg Arg
 290 295 300

Asp Ala Leu Leu Glu Asn Val Val Val Arg Ala Asp Gly Ser Val Asp
 305 310 315 320

Phe Asp Asp Gly Ser Lys Thr Glu Asn Thr Arg Val Ser Tyr Pro Ile
 325 330 335

Tyr His Ile Asp Asn Ile Val Arg Pro Val Ser Lys Ala Gly His Ala
 340 345 350

Thr Lys Val Ile Phe Leu Thr Ala Asp Ala Phe Gly Val Leu Pro Pro
 355 360 365

Val Ser Lys Leu Thr Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Tyr Phe Leu Ser Gly
 370 375 380

Phe Thr Ala Lys Leu Ala Gly Thr Glu Arg Gly Val Thr Glu Pro Thr
 385 390 395 400

Pro Thr Phe Ser Ala Cys Phe Gly Ala Ala Phe Leu Ser Leu His Pro
 405 410 415

Ile Gln Tyr Ala Asp Val Leu Val Glu Arg Met Lys Ala Ser Gly Ala
 420 425 430

Glu Ala Tyr Leu Val Asn Thr Gly Trp Asn Gly Thr Gly Lys Arg Ile

ES 2 383 473 T3

ctgccgttaa aaggtgtggc ttccatgcac tgttccgcca acgtaggtaa agacggtgac 720
 gtggctatatt tcttcggttt atccggtagc ggtaaaacaa cgctttcgac cgatcctaaa 780
 cgccaattaa tcggtgatga cgaacacggg tgggatgaat ccggcgtatt taactttgaa 840
 ggcggttggt acgcgaaaac cattaactta tctcaagaaa acgaaccgga tatttacggc 900
 gcaatccgtc gtgacgcatt attagaaaac gtcgtggttc gtgcagacgg ttccggtgac 960
 tttgacgacg gttcaaaaac agaaaatacc cgtgtttcat atccgattta ccacatcgac 1020
 aacatcgttc gtccggtatc gaaagccggg catgcaacca aagtgatttt cttaaccgcg 1080
 gacgcattcg gcgtattgcc gccggtttca aaactgactc cggaacaaaac cgaatactac 1140
 ttcttatccg gctttactgc aaaattagcg ggtacggaac gcggcgtaac cgaaccgact 1200
 ccgacattct cggcctgttt cggtgccgca ttcttaagcc tgcacccgat tcaatatgcg 1260
 gacgtggtgg tcgaacgcat gaaagcctcc ggtgcccgaag cttatttggg gaacaccggt 1320
 tggaacggca cgggtaaacy tattttcaatc aaagataccc gcggtattat cgatgcgatt 1380
 ttggaacggtt caatcgaaaa agcggaaatg ggcgaattgc caatctttaa tttagcgatt 1440
 cctaaagcat taccgggtgt tgatcctgct attttggatc cgcgcgatac ttacgcagac 1500
 aaagcgcaat ggcaagttaa agcgggaagat ttggcaaacc gtttcgtgaa aaactttgtg 1560
 aaatatacgg cgaatccgga agcgggctaaa ttagttggcg ccggtccaaa agcataa 1617

<210> 5
 <211> 538
 <212> PRT
 <213> Mannheimia succiniciproducens

<400> 5

Met Thr Asp Leu Asn Gln Leu Thr Gln Glu Leu Gly Ala Leu Gly Ile
 1 5 10 15

His Asp Val Gln Glu Val Val Tyr Asn Pro Ser Tyr Glu Leu Leu Phe
 20 25 30

Ala Glu Glu Thr Lys Pro Gly Leu Glu Gly Tyr Glu Lys Gly Thr Val
 35 40 45

Thr Asn Gln Gly Ala Val Ala Val Asn Thr Gly Ile Phe Thr Gly Arg
 50 55 60

ES 2 383 473 T3

Ser Pro Lys Asp Lys Tyr Ile Val Leu Asp Asp Lys Thr Lys Asp Thr
65 70 75 80

Val Trp Trp Thr Ser Glu Lys Val Lys Asn Asp Asn Lys Pro Met Ser
85 90 95

Gln Asp Thr Trp Asn Ser Leu Lys Gly Leu Val Ala Asp Gln Leu Ser
100 105 110

Gly Lys Arg Leu Phe Val Val Asp Ala Phe Cys Gly Ala Asn Lys Asp
115 120 125

Thr Arg Leu Ala Val Arg Val Val Thr Glu Val Ala Trp Gln Ala His
130 135 140

Phe Val Thr Asn Met Phe Ile Arg Pro Ser Ala Glu Glu Leu Lys Gly
145 150 155 160

Phe Lys Pro Asp Phe Val Val Met Asn Gly Ala Lys Cys Thr Asn Pro
165 170 175

Asn Trp Lys Glu Gln Gly Leu Asn Ser Glu Asn Phe Val Ala Phe Asn
180 185 190

Ile Thr Glu Gly Val Gln Leu Ile Gly Gly Thr Trp Tyr Gly Gly Glu
195 200 205

Met Lys Lys Gly Met Phe Ser Met Met Asn Tyr Phe Leu Pro Leu Arg
210 215 220

Gly Ile Ala Ser Met His Cys Ser Ala Asn Val Gly Lys Asp Gly Asp
225 230 235 240

Thr Ala Ile Phe Phe Gly Leu Ser Gly Thr Gly Lys Thr Thr Leu Ser
245 250 255

Thr Asp Pro Lys Arg Gln Leu Ile Gly Asp Asp Glu His Gly Trp Asp
260 265 270

Asp Glu Gly Val Phe Asn Phe Glu Gly Gly Cys Tyr Ala Lys Thr Ile
275 280 285

Asn Leu Ser Ala Glu Asn Glu Pro Asp Ile Tyr Gly Ala Ile Lys Arg

ES 2 383 473 T3

Gln Ala Leu Val Ala Ala Gly Pro Lys Ala
530 535

<210> 6
<211> 1617
<212> DNA
<213> Mannheimia succiniciproduces

<400> 6
atgacagatc ttaatcaatt aactcaagaa cttgggtgctt taggtattca tgatgtacaa 60
gaagttgtgt ataacccgag ctatgaactt ctttttgcgg aagaaaccaa accaggttta 120
gaaggttatg aaaaaggtac tgtgactaat caaggagcgg ttgctgtaaa taccggtatt 180
ttcaccggtc gttctccgaa agataaatat atcgttttag acgacaaaac taaagatacc 240
gtatgggtgga ccagcgaaaa agttaaaaaac gataacaaac caatgagcca agatacctgg 300
aacagtttga aaggtttagt tgccgatcaa ctttccggta aacgtttatt tgttgttgac 360
gcattctgcg gcgcgaataa agatacgcgt ttagctgttc gtgtggttac tgaagttgca 420
tggcaggcgc attttgtaac aaatatgttt atccgccctt cagcgggaaga attaaaaggt 480
ttcaaacctg atttcgtggt aatgaacggg gcaaaatgta caaatcctaa ctggaaagaa 540
caagggttaa attccgaaaa cttcgttgcg ttcaacatta cagaaggcgt tcaattaatc 600
ggcggactt ggtacgggtg tgaaatgaaa aaaggatgt tctcaatgat gaactacttc 660
ttaccgcttc gtggtattgc atcaatgcac tgttccgcaa acgttggtaa agacggcgat 720
accgcaattt tcttcggttt gtcaggcaca ggtaaaacga cattatcaac agatcctaaa 780
cgtcaactaa tcggtgatga cgaacacggg tgggacgatg aaggcgtatt taacttcgaa 840
ggtggttgct acgcgaaaaac cattaactta tccgctgaaa acgagccgga tatctatggc 900
gctatcaaac gtgacgcatt attggaaaac gtggttggtt tagataacgg tgacgttgac 960
tatgcagacg gttccaaaac agaaaataca cgtgtttctt atccgattta tcacattcaa 1020
aatatcgtta aacctgtttc taaagctggt ccggcaacta aagttatctt cttgtctgcc 1080
gatgcattcg gtgtattacc gccggtgtct aaattaactc cggaacaaac caaatactat 1140
ttcttatccg gtttcaactgc gaaattagcg ggtacggaac gcggtattac agagcctaca 1200
ccaacattct ctgcatgttt tgggtgcggct tttttaagct tgcacccgac acaatatgcc 1260
gaagtgttag taaaacgtat gcaagaatca ggtgcggaag cgtatcttgt taatacaggt 1320
tggaacggta ccggcaaacg tatctcaatt aaagatacc gtggtattat tgatgcaatt 1380

ES 2 383 473 T3

ttagacggct caattgataa agcggaaatg ggctcattac caatcttoga tttctcaatt 1440
 cctaaagcat tacctgggtg taaccctgca atcttagatc cgcgcgatac ttatgcggat 1500
 aaagcgcgat ggggaagaaaa agctcaagat cttgcaggtc gctttgtgaa aaactttgaa 1560
 aaatataccg gtacggcgga aggtcaggca ttagttgctg cgggtcctaa agcataa 1617

<210> 7
 <211> 1617
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> PEPCK A.s., optimizado para A. niger

<400> 7
 atgaccgacc tcaacaagct cgtcaaggaa ttgaacgacc ttggattgac tgatgtcaag 60
 gagatcgtct acaaccccag ctacgagcag ctgttcgaag aagaaaccaa gcccggtctg 120
 gaaggattcg acaagggcac cctcaccact ctgggtgctg ttgctgttga cactggtatc 180
 ttcaccggcc gctctcccaa ggacaagtac attgtctgcg atgagactac caaggacacc 240
 gtctgggtgga actccgagggc tgccaagaac gacaacaagc ccatgactca ggaaacctgg 300
 aagtcctctc gtgagcttgt tgccaagcag ctctccggca agcgtctggt cgttgttgat 360
 gctttctgcg gtgcctccga gaagcaccgt atcgggtgccc gcatgggtcac cgaggttgcc 420
 tggcaggctc acttcgtcaa gaacatgttc atccgccccca ccgacgagga gctcaagaac 480
 ttcaaggccg acttcaccgt cctcaacggg gccaaagtgca ccaaccccaa ctggaaggag 540
 cagggtctga actccgagaa cttcgtcgct ttcaacatca ccgaggggtat ccagctgact 600
 ggtggtacct ggtacgggtg tgagatgaag aagggcatgt tctccatgat gaactacttc 660
 ctctctctca aggggtgttc ctccatgcac tgctctgcca acgtcggcaa ggacgggtgat 720
 gttgcatctt tottcgggtct gtctggcaact ggcaagaoca ccctctccac cgaccccaag 780
 cgcagttgga ttgggtgatga ogaacacggc tgggatgaga gcggtgtttt caacttcgag 840
 ggtggctgct acgccaagac catcaacctg agccaggaga acgagcctga catctacggg 900
 gccatccgcc gtgatgctct cctcgagaac gttgttgtcc gcgccgatgg cagcgttgac 960
 ttgatgacg gcagcaagac cgagaacact cgtgtctctc accccatcta ccacattgac 1020
 aacattgtcc gccctgtctc caaggccggg cacgccacca aggtcatctt cttgactgcc 1080
 gatgctttcg gtgtccttcc tctgtctccc aagctcacc cagagcagac ogaatactac 1140

ES 2 383 473 T3

ttcctgtctg gcttcaactgc caagcttgcg ggcaccgagc gtggtgtgac cgagcctact 1200
 cctaccttct ctgcttgctt cgggtgctgct ttcctctccc tgcaccccat ccagtacgcc 1260
 gatgtccttg ttgagcgcac gaaggcctcc ggtgctgagg cctacctggt caacactggc 1320
 tggaacggca ctggcaagcg tatctccatc aaggacaccc gtggtatcat tgatgccatt 1380
 ttggatggca gcattgagaa ggctgagatg ggtgagctcc ccatcttcaa cctggccatc 1440
 cccaaggctc tccccgggtg tgaccccgcc atcctggacc ctcgtgacac ctacgccgac 1500
 aaggcccagt ggcaggctca ggctgaggac cttgcccaacc gcttcgtcaa gaacttcgctc 1560
 aagtacactg ccaacccoga ggctgccaaag ctcgctcggtg ctggtcccaa ggcgtaa 1617

<210> 8
 <211> 1617
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial 2

<220>
 <223> PEPCK M.s., optimizado para A. niger

<400> 8
 atgaccgacc tcaaccagct caccagagc cttggtgctc ttggtatcca cgatgtgcag 60
 gaggttgtct acaaccccag ctacgagctt ctgttcgctg aggaaaccaa gcccggtctg 120
 gaaggatacg agaagggtac cgtcaccaac cagggtgctg ttgctgtcaa cactggtatc 180
 ttcactggcc gctcccccaa ggacaagtac attgtcctcg atgacaagac caaggacacc 240
 gtctggtgga cctccgagaa ggtcaagaac gacaacaagc ccatgagcca ggacacctgg 300
 aactcgctga agggctctgt tgccgaccag ctctccggca agcgtctggt cgtcgtcgat 360
 gctttctgcg gtgccaaaca ggacaccgct ctggccgctc gcgttgtcac cgaggttgcc 420
 tggcaggctc acttcgtcac caacatgtc atccgccct ctgctgagga gctcaagggt 480
 ttcaagcccg acttcgtcgt catgaacggt gccaaagtga ccaaccccaa ctggaaggag 540
 cagggtctga actccgagaa cttegttgct ttcaacatca ccgaggggtg gcagctgatc 600
 ggtggtacct ggtacggtgg tgagatgaag aaggcatgt tctccatgat gaactacttc 660
 cttoctctcc gtggcattgc ctccatgcac tgctctgcca acgtcggcaa ggacgggtgac 720
 actgccatct tcttcggtct gtctggcact ggcaagacca ccctcagcac tgaccccaag 780
 cgccagttga ttggtgatga cgaacacggc tgggatgatg aggggtgttt caacttcgag 840
 ggtggctgct acgccaaagc catcaacctg tctgctgaga acgagcctga catctacggt 900
 gccatcaagc gtgatgccct cctcgagaac gttggtgtcc tcgacaacgg cgatgttgac 960

ES 2 383 473 T3

taogccgatg gcagcaagac tgagaacacc cgtgtcagct accccatcta ccacatccag 1020
aacattgtca agcctgtctc caaggccggt cctgccacca aggtcatctt cctgtctgcc 1080
gatgctttcg gtgtccttcc tcctgtctcc aagctcacc ccgagcagac caagtactac 1140
ttcctgtctg gcttcactgc caagctggct ggtactgagc gtggtatcac cgagcctact 1200
cccaccttct ccgctgctt cgggtgctgct ttcctgagct tgcacccac ccagtacgct 1260
gaggttctcg tcaagcgcac gcaggagtcc ggtgctgagg cctacctcgt caaactggc 1320
tggaacggca ccggcaagcg tatctccatc aaggacacc gtggtatcat tgatgccatt 1380
ttggatggct ccattgacaa ggctgagatg ggctccctcc ccactctcga cttctccatc 1440
ccaagggccc tccccgggtg caaccccgcc atcctcgacc ctctgtgacac ctacgccgac 1500
aaggcccagt gggaggagaa ggcccaggat cttgctggcc gcttcgtcaa gaacttcgag 1560
aagtacactg gtactgcgga aggccaggcc ttggttctg ctggtcctaa agcgtaa 1617

<210> 9

<211> 1617

<212> DNA

<213> **Secuencia artificial**

<220>

<223> **PEPCK A.s., optimizado para S. cerevisiae**

<400> 9

atgactgatt tgaacaaatt ggtcaaggaa ttgaatgatt tgggtttgac tgacgtcaag 60
gaaattgtct acaaccatc ttacgaacaa ttattcgaag aagaaaccaa gccaggtttg 120
gaaggtttcg acaagggtag tttgaccact ttaggtgctg ttgctgttga caccggtatt 180
ttcaccggtc gttctccaaa ggacaaatac attgtttgtg atgaaaccac caaggacacc 240
gtctggtgga actctgaagc tgccaagaac gataacaagc caatgactca agaaacctgg 300
aaatctttga gagaattggg tgccaagcaa ttgtctggta agagattatt cgttgttgac 360
gctttctgtg gtgcttctga aaagcacaga attggtgtca gaatggtcac tgaagttgct 420
tggcaagctc atttcgtcaa gaacatgttc atcagaccaa ctgacgaaga attgaagaac 480
ttcaaggctg acttcaccgt tttgaatggg gccaaagtga ccaacccaaa ctggaaggaa 540
caaggtttga actctgaaaa ctttgttgct ttcaacatca ctgaaggat ccaattgatt 600
ggtggtacct ggtacggtgg tgaaatgaag aagggtatgt tctccatgat gaactatctc 660
ttgccattga aagggtttgc ttccatgcac tgttctgcca atgtcggtaa ggatggtgac 720

ES 2 383 473 T3

gttgccatct tcttcgggtct atccgggtact ggtaagacca ctctatccac tgacccaaag 780
agacaattga ttgggtgatga cgaacacggg tgggacgaat ctgggtgtctt taactttgaa 840
gggtggttgtt acgccaagac catcaactta tctcaagaaa acgaaccaga tatctacggg 900
gccatccgtc gtgatgcttt gttggaaaac gttggtgtca gagctgacgg ttctgttgac 960
ttcgacgacg gttccaagac tgaaaacacc agagtttctt acccaatcta ccacattgac 1020
aacattgtca gacctgtttc caaggctggt cacgctacca aggttatctt cttgactgct 1080
gatgctttcg gtgtcttgcc acctgtttcc aaattgactc cagaacaaac cgaatactac 1140
ttcttgtccg gtttctactgc caaattggct ggtactgaaa gaggtgtcac tgaaccaact 1200
ccaactttct ctgcttgttt cgggtgctgct ttottatctt tgcacccaat ccaatacgct 1260
gatgtcttgg ttgaaagaat gaaggcttct ggtgctgaag cttacttggg caacaccggg 1320
tggaacggta ccggtgaagag aatctccatc aaggatacca gaggtatcat tgatgctatc 1380
ttggacgggt ccattgaaaa ggctgaaatg ggtgaattgc caatcttcaa cttggccatt 1440
ccaaaggctt tgccagggtg tgaccagacc atcttagatc caagagacac ctacgctgac 1500
aaggctcaat ggcaagtcaa ggctgaagat ttggctaaca gattcgtcaa gaactttgtc 1560
aaatacactg ctaaccacaga agctgccaaa ttggttggtg ctggtccaaa ggcttaa 1617

<210> 10

<211> 1617

<212> DNA

<213> **Secuencia artificial**

<220>

<223> **PEPCK M.s., optimizado para S. cerevisiae**

<400> 10

atgaccgatt tgaaccaatt gactcaagaa ttgggtgctt tgggtattca cgatgtccaa 60
gaagttgtct acaaccatc ttacgaattg ttgtttgctg aagaaccaa gccaggtttg 120
gaaggttacg aaaagggtac tgttaccaac caagggtgctg ttgctgtcaa caccgggtatc 180
ttcaccggtc gttctccaaa ggacaaatac attgtcttgg atgacaagac caaggacact 240
gtctggtgga cttctgaaaa ggtcaagaac gacaacaaa caatgtccca agacacttgg 300
aactctttaa agggtttagt cgctgaccaa ttgtctggta agagattatt cgttgtcgat 360
gctttctgtg gtgccaacaa ggacaccaga ttagctgtca gagttgtcac tgaagttgct 420
tggcaagctc acttcgttac caacatgttc atcagacat ctgctgaaga attgaaaggt 480
ttcaagccag atttcgttgt catgaacggg gccaaatgta ccaaccctaaa ctggaaggaa 540

ES 2 383 473 T3

caaggtttga actctgaaaa ctttgttgct ttcaacatca ctgaaggtgt tcaattgatt 600
 ggtggtacct ggtacggtgg tgaatgaag aagggtatgt tctccatgat gaactacttc 660
 ttgccattga gaggtattgc ttccatgcac tgttctgcca atgtcggtaa ggacggtgac 720
 actgccatct tcttcggtct atccggtacc ggtaagacca ctttgtccac tgacccaaag 780
 agacaattga ttggtgatga cgaacacggt tgggatgacg aagggtgttt caactttgaa 840
 ggtggttggt acgccaagac catcaactta tctgctgaaa atgaaccaga tatctacggt 900
 gccatcaagc gtgacgctct attggaaaac gttggtgttt tggacaatgg tgacgtcgat 960
 tatgctgacg gttccaagac tgaaaacacc agagtttctt acccaatcta ccatattcaa 1020
 aacattgtca agccagtttc caaggctggt ccagctacca aagttatctt cttgtctgct 1080
 gatgctttcg gtgttttgcc tctgtttcc aagttgactc cagaacaaac caagtactac 1140
 ttcttgtctg gtttcaccgc caagttggct ggtactgaaa gaggtatcac tgaaccaact 1200
 ccaactttct ctgcttgttt cgggtctgcc tttttgtctt tgcacccaac tcaatacgct 1260
 gaagttttgg tcaagagaat gcaagaatct ggtgctgaag cttacttggc caacactggt 1320
 tggaacggta ccggtgaag aatctccatc aaagatacca gaggtatcat cgatgccatc 1380
 ttggatggtt ccattgacaa ggctgaaatg ggttctttgc caattttcga tttctccatt 1440
 ccaaaggctt tgccaggtgt caaccagcc atcttagacc caagagacac ctacgctgac 1500
 aaagctcaat ggggaagaaa ggctcaagac ttggctggta gattcgtcaa gaacttcgaa 1560
 aaatacactg gtactgctga aggtcaagct ttggttgctg ctggtccaaa ggctaa 1617

<210> 11
 <211> 898
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Promotor GPDA

<400> 11
 tcagcgcca attcgagctc tgtacagtga ccggtgactc tttctggcat gcggagacac 60
 ggacggtcgc agagaggagg gctgagtaat aagcgcactc atgtcagctc tggcgctctg 120
 aggtgcagtg gatgattatt aatccgggac cggccgcccc tccgccccga agtggaaagg 180
 ctggtgtgcc cctcgttgac caagaatcta ttgcatcatc ggagaatatg gagcttcac 240
 gaatcaccgg cagtaagcga aggagaatgt gaagccaggg gtgtatagcc gtcggcgaaa 300

ES 2 383 473 T3

tagcatgcc a ttaacctagg tacagaagtc caattgcttc cgatctggta aaagattcac 360
gagatagtac cttctccgaa gtaggtagag cgagtacccg gcgcgtaagc tccctaattg 420
gcccattccg catctgtagg gcgtccaaat atcgtgcctc tctgctttg cccgggtgat 480
gaaaccggaa aggccgctca ggagctggcc agcggcgcag accgggaaca caagctggca 540
gtcgacccat ccgggtgctct gcactcgacc tgctgaggtc cctcagtccc tggtaggcag 600
ctttgccccg tctgtccgcc cgggtgtgctg gcggggttga caaggctggt gcgtcagtc 660
aacatttggt gccatatttt cctgctctcc ccaccagctg ctcttttctt ttctctttct 720
tttccatct tcagtatatt catcttcca tccaagaacc tttatttccc ctaagtaagt 780
actttgctac atccatactc catccttccc atcccttatt cctttgaacc tttcagttcg 840
agctttcca cttcatcgca gcttgactaa cagctacccc gcttgagcca ccgtcaaa 898

<210> 12
<211> 1000
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Promotor TDH1

<400> 12
cttccctttt acagtgcttc ggaaaagcac agcgttgtcc aaggaacaa tttttcttca 60
agttaatgca taagaaatat ctttttttat gtttagctaa gtaaaagcag cttggagtaa 120
aaaaaaaaat gagtaaattt ctcgatggat tagtttctca caggtaacat aacaaaaacc 180
aagaaaagcc cgcttctgaa aactacagtt gacttgatg ctaaagggcc agactaatgg 240
gaggagaaaa agaaacgaat gtatatgctc atttactc tatatcacca tatggaggat 300
aagttgggct gagcttctga tccaatttat tctatccatt agttgctgat atgtcccacc 360
agccaacact tgatagtatc tactcgccat tcaactccag cagcgccagt agggttggtg 420
agcttagtaa aaatgtgctc accacaagcc tacatgactc cacgtcacat gaaaccacac 480
cgtggggcct tgttgcgcta ggaataggat atgcgacgaa gacgcttctg cttagtaacc 540
acaccacatt ttcagggggt cgatctgctt gcttccttta ctgtcacgag cggcccataa 600
tcgctctttt tttttaaag gcgcgagaca gcaaacagga agctcgggtt tcaacctctg 660
gagtggtcgc agatctggag actggatctt tacaatacag taaggcaagc caccatctgc 720
ttcttaggtg catgctgacg tatccacgtg cagaacaaca tagtctgaag aaggggggga 780
ggagcatggt cattctctgt agcagtaaga gcttggtgat aatgaccaa actggagtct 840

ES 2 383 473 T3

cgaaatcata taaatagaca atatattttc acacaatgag atttgtagta cagttctatt 900
 ctctctcttg cataaataag aaattcatca agaacttggt ttgatatttc accaacacac 960
 acaaaaaaca gtacttcact aaatttacac acaaaaacaaa 1000

<210> 13
 <211> 500
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Terminador TDH1

<400> 13
 ataaagcaat cttgatgagg ataatgattt ttttttgaat atacataaat actaccgttt 60
 ttctgctaga ttttgtgaag acgtaaataa gtacatatta ctttttaagc caagacaaga 120
 ttaagcatta actttaccct tttctcttct aagtttcaat actagttatc actgtttaaa 180
 agttatggcg agaacgtcgg cggttaaaat atattaccct gaacgtggtg aattgaagtt 240
 ctaggatggt ttaaagattt ttcctttttg ggaaataagt aaacaatata ttgctgcctt 300
 tgcaaaacgc acataccac aatatgtgac tattggcaaa gaacgcatta tcctttgaag 360
 aggtggatac tgatactaag agagtctcta ttccggctcc acttttagtc cagagattac 420
 ttgtcttctt acgtatcaga acaagaaagc atttccaaag taattgcatt tgcccttgag 480
 cagtatatat atactaagaa 500

<210> 14
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> MDH3 de S. cerevisiae que carece de señal diana SKL

<400> 14

Met Val Lys Val Ala Ile Leu Gly Ala Ser Gly Gly Val Gly Gln Pro
 1 5 10 15

Leu Ser Leu Leu Leu Lys Leu Ser Pro Tyr Val Ser Glu Leu Ala Leu
 20 25 30

Tyr Asp Ile Arg Ala Ala Glu Gly Ile Gly Lys Asp Leu Ser His Ile
 35 40 45

ES 2 383 473 T3

Asn Thr Asn Ser Ser Cys Val Gly Tyr Asp Lys Asp Ser Ile Glu Asn
50 55 60

Thr Leu Ser Asn Ala Gln Val Val Leu Ile Pro Ala Gly Val Pro Arg
65 70 75 80

Lys Pro Gly Leu Thr Arg Asp Asp Leu Phe Lys Met Asn Ala Gly Ile
85 90 95

Val Lys Ser Leu Val Thr Ala Val Gly Lys Phe Ala Pro Asn Ala Arg
100 105 110

Ile Leu Val Ile Ser Asn Pro Val Asn Ser Leu Val Pro Ile Ala Val
115 120 125

Glu Thr Leu Lys Lys Met Gly Lys Phe Lys Pro Gly Asn Val Met Gly
130 135 140

Val Thr Asn Leu Asp Leu Val Arg Ala Glu Thr Phe Leu Val Asp Tyr
145 150 155 160

Leu Met Leu Lys Asn Pro Lys Ile Gly Gln Glu Gln Asp Lys Thr Thr
165 170 175

Met His Arg Lys Val Thr Val Ile Gly Gly His Ser Gly Glu Thr Ile
180 185 190

Ile Pro Ile Ile Thr Asp Lys Ser Leu Val Phe Gln Leu Asp Lys Gln
195 200 205

Tyr Glu His Phe Ile His Arg Val Gln Phe Gly Gly Asp Glu Ile Val
210 215 220

Lys Ala Lys Gln Gly Ala Gly Ser Ala Thr Leu Ser Met Ala Phe Ala
225 230 235 240

Gly Ala Lys Phe Ala Glu Glu Val Leu Arg Ser Phe His Asn Glu Lys
245 250 255

Pro Glu Thr Glu Ser Leu Ser Ala Phe Val Tyr Leu Pro Gly Leu Lys
260 265 270

ES 2 383 473 T3

Asn Gly Lys Lys Ala Gln Gln Leu Val Gly Asp Asn Ser Ile Glu Tyr
 275 280 285

Phe Ser Leu Pro Ile Val Leu Arg Asn Gly Ser Val Val Ser Ile Asp
 290 295 300

Thr Ser Val Leu Glu Lys Leu Ser Pro Arg Glu Glu Gln Leu Val Asn
 305 310 315 320

Thr Ala Val Lys Glu Leu Arg Lys Asn Ile Glu Lys Gly Lys Ser Phe
 325 330 335

Ile Leu Asp Ser
 340

<210> 15

<211> 1023

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nt de MDH3 de *S. cerevisiae* que carecen de nt que codifican la señal diana SKL

<400> 15

atgggtaagg ttgccatctt aggtgcttct ggtgggtgctg gtcaaccatt atctctatta 60
 ttgaaattgt ctccatacgt ttctgaattg gctttgtacg atatcagagc tgctgaaggt 120
 attggtaagg atttgtccca catcaacacc aactcctctt gtgttgggta cgacaaggat 180
 tccatcgaaa aactttgtc caatgctcaa gttgtcttga ttccagctgg tgttccaaga 240
 aagccagggt tgaccagaga tgatttggtc aagatgaacg ctggtatcgt taagtctttg 300
 gttactgctg tcggtaaatt tgcccaaac gctcgtatct tagtcatctc caaccctggt 360
 aactctttgg ttccaattgc cgttgaaact ttgaagaaga tgggtaagtt caagccagggt 420
 aacgttatgg gtgtcaccaa cttggatttg gtcagagctg aaactttctt ggttgactac 480
 ttgatgttga agaaccctaaa gatcgggtcaa gaacaagaca agaccacat gcacagaaa 540
 gtcaccgtca tcggtggtca ctctggtgaa accatcattc caatcatcac tgacaaatcc 600
 ttggttttcc aattggacaa gcaatacgaa catttcatcc acagagtcca attcgggtgg 660
 gacgaaattg tcaaggccaa gcaagggtgcc ggttctgcta ccttgtccat ggctttcgct 720
 ggtgccaaat ttgctgaaga agtcttacgt tctttccaca acgaaaagcc agaaactgaa 780
 tctttgtctg ctttcgtcta cttgccagggt ttgaagaacg gtaagaaggc tcaacaatta 840

ES 2 383 473 T3

gtcggtgaca actccattga atacttctct ttgccaattg ttttgagaaa cggttccggt 900
 gtttccattg acacttctgt ttggaaaaa ttgtctcaa gagaagaaca attggtaaac 960
 actgctgtca aggaattgag aaagaacatt gaaaagggtta agtctttcat cttggacagt 1020
 taa 1023

<210> 16
 <211> 472
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Fumarasa de R. oryzae que carece de los primeros 23 aa + M
 <400> 16

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

ES 2 383 473 T3

Val Val Glu Ile His Gly Arg Leu Ile Pro Ala Leu Thr Thr Leu Arg
165 170 175

Asp Ala Leu Gln Ala Lys Ser Ala Glu Phe Glu His Ile Ile Lys Ile
180 185 190

Gly Arg Thr His Leu Gln Asp Ala Thr Pro Leu Thr Leu Gly Gln Glu
195 200 205

Phe Ser Gly Tyr Thr Gln Gln Leu Thr Tyr Gly Ile Ala Arg Val Gln
210 215 220

Gly Thr Leu Glu Arg Leu Tyr Asn Leu Ala Gln Gly Gly Thr Ala Val
225 230 235 240

Gly Thr Gly Leu Asn Thr Arg Lys Gly Phe Asp Ala Lys Val Ala Glu
245 250 255

Ala Ile Ala Ser Ile Thr Gly Leu Pro Phe Lys Thr Ala Pro Asn Lys
260 265 270

Phe Glu Ala Leu Ala Ala His Asp Ala Leu Val Glu Ala His Gly Ala
275 280 285

Leu Asn Thr Val Ala Cys Ser Leu Met Lys Ile Ala Asn Asp Ile Arg
290 295 300

Tyr Leu Gly Ser Gly Pro Arg Cys Gly Leu Gly Glu Leu Ser Leu Pro
305 310 315 320

Glu Asn Glu Pro Gly Ser Ser Ile Met Pro Gly Lys Val Asn Pro Thr
325 330 335

Gln Cys Glu Ala Met Thr Met Val Cys Ala Gln Val Met Gly Asn Asn
340 345 350

Thr Ala Ile Ser Val Ala Gly Ser Asn Gly Gln Phe Glu Leu Asn Val
355 360 365

Phe Lys Pro Val Met Ile Lys Asn Leu Ile Gln Ser Ile Arg Leu Ile
370 375 380

ES 2 383 473 T3

Ser Asp Ala Ser Ile Ser Phe Thr Lys Asn Cys Val Val Gly Ile Glu
385 390 395 400

Ala Asn Glu Lys Lys Ile Ser Ser Ile Met Asn Glu Ser Leu Met Leu
405 410 415

Val Thr Ala Leu Asn Pro His Ile Gly Tyr Asp Lys Ala Ala Lys Cys
420 425 430

Ala Lys Lys Ala His Lys Glu Gly Thr Thr Leu Lys Glu Ala Ala Leu
435 440 445

Ser Leu Gly Tyr Leu Thr Ser Glu Glu Phe Asp Gln Trp Val Arg Pro
450 455 460

Glu Asp Met Ile Ser Ala Lys Asp
465 470

<210> 17

<211> 1419

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> nt de FumR cpo para S. cerevisiae que carecen de nt que codifican los primeros 23 aa + M

<400> 17

atgtcctctg cttctgctgc tttgcaaaaa ttcagagctg aaagagatac cttcgggtgac 60
 ttgcaagttc cagctgaccg ttactggggg gctcaaactc aaagatcttt gcaaaacttt 120
 gacattggtg gtccaactga aagaatgcca gaaccattaa tcagagcttt cgggtgttttg 180
 aagaaggctg ctgccaccgt caacatgacc tacggtttg acccaaagg tggatgaagcc 240
 atccaaaagg ctgctgacga agttatcgat ggttctttga ttgaccattt cccattgggt 300
 gtctggcaaa cgggttctgg tactcaaacc aagatgaacg tcaatgaagt catctccaac 360
 agagccattg aattgttggg tggatgaatta ggttccaagg ctccagtcca cccaaacgat 420
 catgtcaaca tgtctcaatc ttccaacgac actttcccaa ctgccatgca cgttgctgac 480
 gttgttgaaa ttcacggtag attgattcca gctttgacca ctttgagaga tgctttgcaa 540
 gccaaatctg ctgaattcga acacatcatc aagattggta gaaccactt gcaagatgct 600
 acccattga ctttaggtca agaattctcc ggttacactc aacaattgac ctacggtatt 660
 gctcgtgttc aaggactttt ggaaagatta tacaacttgg ctcaagggtg tactgctgtc 720

ES 2 383 473 T3

```

gg tactgg tt tgaacaccag aaagggtttc gatgccaagg ttgctgaagc cattgcttcc 780
atcactgg tt taccattcaa gaccgctcca aacaaattcg aagctttggc tgctcacgac 840
gctttgg ttg aagctcacgg tgctttgaac accg ttgctt gttctttgat gaagattgcc 900
aacgata tcc gttacttggg ttctgg tcca agatgtgg tt taggtgaatt gtctctacca 960
gaaaacg aac caggttcttc catcatgcca ggtaagg tca acccaactca atgtgaagct 1020
atgaccat gg tttgtgctca agtcatggg t aacaactg ccatctctgt tgctggttcc 1080
aacgg tcaat tcgaattgaa tgtctt taaa ccag tcatga tcaagaactt gatccaatcc 1140
atcagatt aa tctctgacgc ttccatctct ttcaccaaga actgtgttgt cggatttgaa 1200
gctaacg aaa agaagatctc ctccatcatg aacgaatctt tgatgttgg t cactgctttg 1260
aacctcaca ttggttacga caaggctgcc aagtgtgcca agaaggctca caaggaagg t 1320
accacttt ga aagaagctgc tctatctttg gg ttacttga cctctgaaga attcgaccaa 1380
tgggttag ac ctgaggacat gatttctgcc aaggattaa 1419

```

```

<210> 18
<211> 600
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

```

```

<220>
<223> Promotor TDH3

```

```

<400> 18
ttagtcaaaa aattagcctt ttaattctgc tgtaaccctg acatgccc aa aatagggggc 60
gggttacaca gaatatataa catcgtaggt gtctgggtga acagtttatt cctggcatcc 120
actaaatata atggagcccg ctttttaagc tggcatccag aaaaaaaaaag aatcccagca 180
ccaaaatatt gttttcttca ccaaccatca gttcataggt ccattctctt agcgcacta 240
cagagaacag gggcacaac aggcaaaaaa cgggcacaac ctcaatggag tgatgcaacc 300
tgcttgag t aatgatgac acaaggcaat tgaccacgc atgtatctat ctcatcttct 360
tacaccttct attaccttct gctctctctg atttgaaaa agctgaaaa aaaggttgaa 420
accagttccc tgaaattatt ccctacttg actaataagt atataaagac ggtaggtatt 480
gattgtaatt ctgtaaactc atttcttaaa cttcttaaat tctactttta tagttagtct 540
tttttttagt tttaaaacac caagaactta gtttcgaata aacacacata acaaaacaaa 600

```

```

<210> 19

```

ES 2 383 473 T3

<211> 300
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Terminador TDH3

<400> 19
 gtgaatttac tttaaatcct gcattttaat aaattttcct tttatagcct tatgacttag 60
 tttcaattta tatactatct taatgacatt ttcgattcat tgattgaaag ctttgtgttt 120
 tttcttgatg cgctattgca ttggtcctgt ctttttcgcc acatgtaata tctgtagtag 180
 atacctgata cattgtggat gctgagtgaa attttagtta ataatggagg cgctcttaat 240
 aattttgggg atattggcct ttttttttaa agtttacaaa tgaatttttt ccgccaggat 300

<210> 20
 <211> 1966
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética TDH3p-MDH3-TDH3t

<400> 20
 ggatccggcg cgccacgcgt ggccggcctt agtcaaaaaa ttagcctttt aattctgctg 60
 taacccttac atgcccaaaa tagggggcgg gttacacaga atatataaca tcgtaggtgt 120
 ctgggtgaac agtttattcc tggcatccac taaatataat ggagcccgct ttttaagctg 180
 gcatccagaa aaaaaaagaa tcccagcacc aaaatattgt tttcttcacc aaccatcagt 240
 tcataggtcc attctcttag cgcaactaca gagaacaggg gcacaaacag gcaaaaaacg 300
 ggcacaacct caatggagtg atgcaacctg cctggagtaa atgatgacac aaggcaattg 360
 acccagcat gtatctatct cattttctta caccttctat taccttctgc tctctctgat 420
 ttggaaaaag ctgaaaaaaa aggttgaaac cagttccctg aaattattcc cctacttgac 480
 taataagtat ataaagacgg taggtattga ttgtaattct gtaaactctat ttcttaaact 540
 tcttaaattc tacttttata gttagtcttt tttttagttt taaaacacca agaacttagt 600
 ttcgaataaa cacacataaa caaacaaaat ggttaagggt gccatcttag gtgcttctgg 660
 tgggtgctgg caaccattat ctctattatt gaaattgtct ccatacgttt ctgaattggc 720
 tttgtacgat atcagagctg ctgaaggat ttgtaaggat ttgtcccaca tcaaacacaa 780
 ctctcttctg gttggttacg acaaggattc catcgaaaac actttgtcca atgctcaagt 840
 tgtcttgatt ccagctgggt ttccaagaaa gccaggtttg accagagatg atttgttcaa 900

ES 2 383 473 T3

gatgaacgct ggtatcgta agtctttggt tactgctgtc ggtaaatttg ccccaaacgc 960
 tcgtatctta gtcactcca accctgtaa ctctttgggt ccaattgccc ttgaaacttt 1020
 gaagaagatg ggtaagttca agccaggtaa cgttatgggt gtcaccaact tggatttggt 1080
 cagagctgaa actttcttgg ttgactactt gatggtgaag aacccaaaga tcgggtcaaga 1140
 acaagacaag accaccatgc acagaaaggc caccgtcatc ggtggtcact ctggtgaaac 1200
 catcattcca atcatcactg acaaatcctt ggttttccaa ttggacaagc aatacgaaca 1260
 tttcatccac agagtccaat tcggtggtga cgaaattgtc aaggccaagc aagggtgccgg 1320
 ttctgctacc ttgtccatgg ctttcgctgg tgccaaattt gctgaagaag tcttacgctc 1380
 tttccacaac gaaaagccag aaactgaatc tttgtctgct ttcgtctact tgccaggttt 1440
 gaagaacggg aagaaggctc aacaattagt cggtgacaac tccattgaat acttctcttt 1500
 gccaatgtt ttgagaaacg gttccgttgt ttccattgac acttctgttt tggaaaaatt 1560
 gtctccaaga gaagaacaat tgggtcaacac tgctgtcaag gaattgagaa agaacattga 1620
 aaagggtgaa tctttcatct tggacagtta aggtgaattt actttaaatc ttgcatttaa 1680
 ataaattttc tttttatagc tttatgactt agtttcaatt tatatactat tttaatgaca 1740
 ttttcgattc attgattgaa agctttgtgt tttttcttga tgcgctattg cattgttctt 1800
 gtctttttcg ccacatgtaa tatctgtagt agatacctga tacattgtgg atgctgagtg 1860
 aaattttagt taataatgga ggcgctctta ataattttgg ggatattggc tttttttttt 1920
 aaagtttaca aatgaatttt ttccgccagg atgggcccgc ggcccg 1966

<210> 21

<211> 2950

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética TDH1p-FUMR-TDH1t

<400> 21

ggatcccttc cttttacag tgcttcggaa aagcacagcg ttgtccaagg gaacaatttt 60
 tcttcaagtt aatgcataag aaatatcttt ttttatgttt agctaagtaa aagcagcttg 120
 gagtaaaaaa aaaaatgagt aaatttctcg atggattagt ttctcacagg taacataaca 180
 aaaaccaaga aaagcccgtc tctgaaaact acagttgact tgtatgctaa agggccagac 240
 taatggggagg agaaaaagaa acgaatgtat atgctcattt acaactctata tcaccatgat 300

ES 2 383 473 T3

gaggataagt tgggctgagc ttctgatcca atttattota tccattagtt gctgatatgt 360
 cccaccagcc aacacttgat agtatctact cgccattcac ttccagcagc gccagtaggg 420
 ttgttgagct tagtaaaaat gtgcgcacga caagcctaca tgactccacg tcacatgaaa 480
 ccacaccgtg gggccttggt gcgctaggaa taggatatgc gacgaagacg cttctgctta 540
 gtaaccacac cacattttca gggggtcgat ctgcttgctt cctttactgt cacgagcggc 600
 ccataatcgc gctttttttt taaaaggcgc gagacacgaa acaggaagct cgggtttcaa 660
 ccttcggagt ggtcgcagat ctggagactg gatctttaca atacagtaag gcaagccacc 720
 atctgcttct taggtgcatg cgacggtatc cacgtgcaga acaacatagt ctgaagaagg 780
 gggggaggag catgttcatt ctctgtagca gtaagagctt ggtgataatg accaaaactg 840
 gagtctcgaa atcatataaa tagacaatat attttcacac aatgagattt gtagtacagt 900
 tctattctct ctcttgcata aataagaaat tcatcaagaa cttggtttga tatttoacca 960
 acacacacaa aaaacagtac ttcactaaat ttacacacaa aacaaaatgt cctctgcttc 1020
 tgctgctttg caaaaattca gagctgaaag agataccttc ggtgacttgc aagttccagc 1080
 tgaccgttac tggggtgctc aaactcaaag atctttgcaa aactttgaca ttggtggtcc 1140
 aactgaaaga atgccagaac cattaatcag agctttcggg gttttgaaga aggctgctgc 1200
 caccgtcaac atgacctacg gtttgacc ccaaggttggg gaagccatcc aaaaggctgc 1260
 tgacgaagtt atcgatgggt ctttgattga ccatttccca ttggttgtct ggcaaaccgg 1320
 ttctgggtact caaaccaaga tgaacgtcaa tgaagtcatc tccaacagag ccattgaatt 1380
 gttgggtggg gaattagggt ccaaggctcc agtccacca aacgatcatg tcaacatgct 1440
 tcaatcttcc aacgacactt tcccaactgc catgcacgtt gctgccgttg ttgaaattca 1500
 cggtagattg attccagctt tgaccacttt gagagatgct ttgcaagcca aatctgctga 1560
 attogaacac atcatcaaga ttggtagaac ccacttgcaa gatgctacc cattgacttt 1620
 aggtcaagaa ttctccggtt aactcaaca attgacctac ggtattgctc gtgttcaagg 1680
 tactttggaa agattataca acttggctca aggtgggtact gctgtcggta ctggtttgaa 1740
 caccagaaag ggtttcgatg ccaaggttgc tgaagccatt gcttccatca ctggtttacc 1800
 attcaagacc gctccaaaca aattcgaagc tttggctgct cacgacgctt tggttgaagc 1860
 tcacggtgct ttgaacaccg ttgcttgctt tttgatgaag attgccaacg atatccgtta 1920
 cttgggttct ggtccaagat gtggtttagg tgaattgtct ctaccagaaa acgaaccagg 1980
 ttcttccatc atgccaggta aggtcaacc aactcaatgt gaagctatga ccatggtttg 2040

ES 2 383 473 T3

tgctcaagtc atgggtaaca acaactgccat ctctggtgct ggttccaacg gtcaattcga 2100
 attgaatgtc tttaaaccag tcatgatcaa gaacttgatc caatccatca gattaatctc 2160
 tgacgcttcc atctctttca ccaagaactg tgttgctcggg attgaagcta acgaaaagaa 2220
 gatctcctcc atcatgaacg aatctttgat gttggctcact gctttgaacc ctcacattgg 2280
 ttacgacaag gctgccaaagt gtgccaaaga ggctcacaag gaaggtaacca ctttgaaaga 2340
 agctgctcta tctttggggtt acttgacctc tgaagaattc gaccaatggg ttagacctga 2400
 ggacatgatt tctgccaaagg attaaggccc gggcataaag caatcttgat gaggataatg 2460
 attttttttt gaatatacat aaatactacc gtttttctgc tagattttgt gaagacgtaa 2520
 ataagtacat attacttttt aagccaagac aagattaagc attaacttta cctttttctc 2580
 ttctaagttt caatactagt taccactggt taaaagttat ggcgagaacg tcggcgggta 2640
 aaatatatta ccctgaacgt ggtgaattga agttctagga tggtttaaag atttttcctt 2700
 tttgggaaat aagtaaaca tatattgctg cctttgcaaa acgcacatac ccacaatatg 2760
 tgactattgg caaagaacgc attatccttt gaagagggtg atactgatac taagagagtc 2820
 tctattccgg ctccactttt agtcagaga ttacttgtct tcttacgtat cagaacaaga 2880
 aagcatttcc aaagtaattg catttgcocct tgagcagtat atatatacta agaaggcgcg 2940
 ccgcgccgcg 2950

<210> 22

<211> 1139

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> FRDg de Trypanosoma brucei que carece de la secuencia diana SKI C-terminal

<400> 22

Met Val Asp Gly Arg Ser Ser Ala Ser Ile Val Ala Val Asp Pro Glu
 1 5 10 15

Arg Ala Ala Arg Glu Arg Asp Ala Ala Ala Arg Ala Leu Leu Gln Asp
 20 25 30

Ser Pro Leu His Thr Thr Met Gln Tyr Ala Thr Ser Gly Leu Glu Leu
 35 40 45

Thr Val Pro Tyr Ala Leu Lys Val Val Ala Ser Ala Asp Thr Phe Asp

ES 2 383 473 T3

Trp Lys Gly Lys Glu Leu Met Lys Pro Ser Gln Ser Asn Ile Ala Gln
 290 295 300

Val Ser Val Lys Cys Tyr Ser Ala Met Tyr Ala Asp Ala Leu Ala Thr
 305 310 315 320

Ala Cys Phe Ile Lys Arg Asp Pro Ala Lys Val Arg Gln Leu Leu Asp
 325 330 335

Gly Trp Arg Tyr Val Arg Asp Thr Val Arg Asp Tyr Arg Val Tyr Val
 340 345 350

Arg Glu Asn Glu Arg Val Ala Lys Met Phe Glu Ile Ala Thr Glu Asp
 355 360 365

Ala Glu Met Arg Lys Arg Arg Ile Ser Asn Thr Leu Pro Ala Arg Val
 370 375 380

Ile Val Val Gly Gly Gly Leu Ala Gly Leu Ser Ala Ala Ile Glu Ala
 385 390 395 400

Ala Gly Cys Gly Ala Gln Val Val Leu Met Glu Lys Glu Ala Lys Leu
 405 410 415

Gly Gly Asn Ser Ala Lys Ala Thr Ser Gly Ile Asn Gly Trp Gly Thr
 420 425 430

Arg Ala Gln Ala Lys Ala Ser Ile Val Asp Gly Gly Lys Tyr Phe Glu
 435 440 445

Arg Asp Thr Tyr Lys Ser Gly Ile Gly Gly Asn Thr Asp Pro Ala Leu
 450 455 460

Val Lys Thr Leu Ser Met Lys Ser Ala Asp Ala Ile Gly Trp Leu Thr
 465 470 475 480

Ser Leu Gly Val Pro Leu Thr Val Leu Ser Gln Leu Gly Gly His Ser
 485 490 495

Arg Lys Arg Thr His Arg Ala Pro Asp Lys Lys Asp Gly Thr Pro Leu
 500 505 510

ES 2 383 473 T3

Pro Ile Gly Phe Thr Ile Met Lys Thr Leu Glu Asp His Val Arg Gly
515 520 525

Asn Leu Ser Gly Arg Ile Thr Ile Met Glu Asn Cys Ser Val Thr Ser
530 535 540

Leu Leu Ser Glu Thr Lys Glu Arg Pro Asp Gly Thr Lys Gln Ile Arg
545 550 555 560

Val Thr Gly Val Glu Phe Thr Gln Ala Gly Ser Gly Lys Thr Thr Ile
565 570 575

Leu Ala Asp Ala Val Ile Leu Ala Thr Gly Gly Phe Ser Asn Asp Lys
580 585 590

Thr Ala Asp Ser Leu Leu Arg Glu His Ala Pro His Leu Val Asn Phe
595 600 605

Pro Thr Thr Asn Gly Pro Trp Ala Thr Gly Asp Gly Val Lys Leu Ala
610 615 620

Gln Arg Leu Gly Ala Gln Leu Val Asp Met Asp Lys Val Gln Leu His
625 630 635 640

Pro Thr Gly Leu Ile Asn Pro Lys Asp Pro Ala Asn Pro Thr Lys Phe
645 650 655

Leu Gly Pro Glu Ala Leu Arg Gly Ser Gly Gly Val Leu Leu Asn Lys
660 665 670

Gln Gly Lys Arg Phe Val Asn Glu Leu Asp Leu Arg Ser Val Val Ser
675 680 685

Lys Ala Ile Met Glu Gln Gly Ala Glu Tyr Pro Gly Ser Gly Gly Ser
690 695 700

Met Phe Ala Tyr Cys Val Leu Asn Ala Ala Ala Gln Lys Leu Phe Gly
705 710 715 720

Val Ser Ser His Glu Phe Tyr Trp Lys Lys Met Gly Leu Phe Val Lys
725 730 735

ES 2 383 473 T3

Ala Asp Thr Met Arg Asp Leu Ala Ala Leu Ile Gly Cys Pro Val Glu
740 745 750

Ser Val Gln Gln Thr Leu Glu Glu Tyr Glu Arg Leu Ser Ile Ser Gln
755 760 765

Arg Ser Cys Pro Ile Thr Arg Lys Ser Val Tyr Pro Cys Val Leu Gly
770 775 780

Thr Lys Gly Pro Tyr Tyr Val Ala Phe Val Thr Pro Ser Ile His Tyr
785 790 795 800

Thr Met Gly Gly Cys Leu Ile Ser Pro Ser Ala Glu Ile Gln Met Lys
805 810 815

Asn Thr Ser Ser Arg Ala Pro Leu Ser His Ser Asn Pro Ile Leu Gly
820 825 830

Leu Phe Gly Ala Gly Glu Val Thr Gly Gly Val His Gly Gly Asn Arg
835 840 845

Leu Gly Gly Asn Ser Leu Leu Glu Cys Val Val Phe Gly Arg Ile Ala
850 855 860

Gly Asp Arg Ala Ser Thr Ile Leu Gln Arg Lys Ser Ser Ala Leu Ser
865 870 875 880

Phe Lys Val Trp Thr Thr Val Val Leu Arg Glu Val Arg Glu Gly Gly
885 890 895

Val Tyr Gly Ala Gly Ser Arg Val Leu Arg Phe Asn Leu Pro Gly Ala
900 905 910

Leu Gln Arg Ser Gly Leu Ser Leu Gly Gln Phe Ile Ala Ile Arg Gly
915 920 925

Asp Trp Asp Gly Gln Gln Leu Ile Gly Tyr Tyr Ser Pro Ile Thr Leu
930 935 940

Pro Asp Asp Leu Gly Met Ile Asp Ile Leu Ala Arg Ser Asp Lys Gly
945 950 955 960

Thr Leu Arg Glu Trp Ile Ser Ala Leu Glu Pro Gly Asp Ala Val Glu

ES 2 383 473 T3

965

970

975

Met Lys Ala Cys Gly Gly Leu Val Ile Glu Arg Arg Leu Ser Asp Lys
 980 985 990

His Phe Val Phe Met Gly His Ile Ile Asn Lys Leu Cys Leu Ile Ala
 995 1000 1005

Gly Gly Thr Gly Val Ala Pro Met Leu Gln Ile Ile Lys Ala Ala
 1010 1015 1020

Phe Met Lys Pro Phe Ile Asp Thr Leu Glu Ser Val His Leu Ile
 1025 1030 1035

Tyr Ala Ala Glu Asp Val Thr Glu Leu Thr Tyr Arg Glu Val Leu
 1040 1045 1050

Glu Glu Arg Arg Arg Glu Ser Arg Gly Lys Phe Lys Lys Thr Phe
 1055 1060 1065

Val Leu Asn Arg Pro Pro Pro Leu Trp Thr Asp Gly Val Gly Phe
 1070 1075 1080

Ile Asp Arg Gly Ile Leu Thr Asn His Val Gln Pro Pro Ser Asp
 1085 1090 1095

Asn Leu Leu Val Ala Ile Cys Gly Pro Pro Val Met Gln Arg Ile
 1100 1105 1110

Val Lys Ala Thr Leu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Met Asn Leu Val
 1115 1120 1125

Arg Thr Val Asp Glu Thr Glu Pro Ser Gly Ser
 1130 1135

<210> 23

<211> 3421

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cpo nt de FRDg de T. brucei que carece de nt que codifican SKI C-terminal

<400> .23

atggttgatg gtagatcttc tgcttccatt gttgccgttg acccagaaag agctgccaga 60

ES 2 383 473 T3

gaaagagatg ctgctgccag agctttgttg caagactctc cattgcacac caccatgcaa 120
 tacgctacct ctggtttggg attgactggt ccatacgtt tgaaggttgt tgcttctgct 180
 gacactttcg acagagccaa ggaagttgct gatgaagtct tgagatgtgc ctggcaattg 240
 gctgacaccg ttttgaactc tttcaacca aactctgaag tctctttagt cggtagatta 300
 ccagtcggtc aaaagcatca aatgtctgct ccattgaaac gtgtcatggc ttgttgtcaa 360
 agagtctaca actcctctgc tggttgtttc gacctatcca ctgctccagt tgccaaggct 420
 ttgagagaaa ttgctttggg taaggaaaga aacaatgctt gtttgggaagc tttgactcaa 480
 gcttgtacct tgccaaactc tttcgtcatt gatttcaag ctggtactat ctccagaaag 540
 cacgaacacg cttctttgga tttgggtggt gttccaagg gttacatcgt cgattacgtc 600
 attgacaaca tcaatgctgc tggtttcaa aacgttttct ttgactgggg tggtgactgt 660
 cgtgcctccg gtatgaacgc cagaaacact ccatgggttg tccgtatcac tagacctoct 720
 tccttgga ca tgttgccaaa cctccaaag gaagcttctt acatctccgt catctctttg 780
 gacaatgaag ctttggctac ctctggtgat tacgaaaact tgatctacac tgctgacgat 840
 aaaccattga cctgtaccta cgattgaaa ggtaaggaat tgatgaagcc atctcaatcc 900
 aatategctc aagtttccgt caagtgttac tctgccatgt acgctgacgc tttggctacc 960
 gcttgtttca tcaagcgtga cccagccaag gtcagacaat tgttggatgg ttggagatac 1020
 gttagagaca ccgtcagaga ttaccgtgtc tacgtcagag aaaacgaaag agttgccaag 1080
 atgttcgaaa ttgccactga agatgctgaa atgagaaaga gaagaatttc caacacttta 1140
 ccagctcgtg tcattgttgt tgggtggtgg ttggctggtt tgtccgctgc cattgaagct 1200
 gctggttgtg gtgctcaagt tgttttgatg gaaaaggaag ccaagttggg tggttaactct 1260
 gccaaaggta cctctggtat caacggttgg ggtactagag ctcaagctaa ggcttccatt 1320
 gtcgatggtg gtaagtactt cgaaagagat acctacaagt ctggtatcgg tggtaacacc 1380
 gatccagctt tggttaagac tttgtccatg aaatctgctg acgctatcgg ttggttgact 1440
 tctctaggtg ttocattgac tgttttgtcc caattaggtg gtcactccag aaagagaact 1500
 cacagagctc cagacaagaa ggatggtact ccattgcaa ttggtttcac catcatgaaa 1560
 actttagaag atcatgttag aggtaacttg tccggtagaa tcaccatcat ggaaaactgt 1620
 tccgttacct ctttgttgtc tgaaaccaag gaaagaccag acggtaccaa gcaaatcaga 1680
 gttaccggtg tcgaattcac tcaagctggt tctggtgaaga ccaccathtt ggctgatgct 1740

ES 2 383 473 T3

gttatcttgg ccaccggtgg tttctccaac gacaagactg ctgattcttt gttgagagaa 1800
 catgccccac acttggttaa ctcccaacc accaacggtc catgggctac tggatgatgg 1860
 gtcaagttgg ctcaaagatt aggtgctcaa ttggtcgata tggacaagg tcaattgcac 1920
 ccaactggtt tgatcaacc aaaggacca gccaacccaa ccaaattctt gggtcagaa 1980
 gctctaagag gttctggtgg tgttttgtt aacaaacaag gtaagagatt tgtcaacgaa 2040
 ttggatttga gatctgttgt ttccaaggcc atcatggaac aagggtgctga ataccaggt 2100
 tctgggtggt ccatgtttgc ttactgtgtc ttgaacgctg ctgctcaaaa attgtttggt 2160
 gtttctctc acgaattcta ctggaagaag atgggtttgt tcgtcaaggc tgacaccatg 2220
 agagacttgg ctgctttgat tggttgtcca gttgaatccg ttcaacaaac tttagaagaa 2280
 tacgaaagat tatccatctc tcaaagatct tgtccaatta ccagaaaatc tgtttacca 2340
 tgtgttttgg gtaccaaagg tccatactat gtcgcctttg tcaactccatc tatccactac 2400
 accatgggtg gttgtttgat ttctccatct gctgaaatcc aaatgaagaa cacttcttcc 2460
 agagctccat tgtcccactc caaccatc ttgggtttat tcggtgctgg tgaagtcacc 2520
 ggtggtgtcc acggtggtaa cagattaggt ggtaactctt tgttggaatg tgttgttttc 2580
 ggtagaattg ccggtgacag agcttctacc attttgcaa gaaagtcctc tgctttgtct 2640
 ttcaaggctc ggaccactgt tgttttgaga gaagtcagag aagggtggtg ctacggtgct 2700
 ggttccogtg tcttgagatt caacttacca ggtgctctac aaagatctgg tctatcctt 2760
 ggtcaattca ttgccatcag aggtgactgg gacggtcaac aattgattgg ttactactct 2820
 ccaatcactt tgccagacga tttgggtatg attgacattt tggccagatc tgacaagggt 2880
 actttacgtg aatggatctc tgctttggaa ccaggtgacg ctgtcgaaat gaaggcttgt 2940
 ggtggtttgg tcatcgaaag aagattatct gacaagcact tcgttttcat gggtcacatt 3000
 atcaacaagc tatgtttgat tgctggtggg accggtggtg ctccaatgtt gcaaatcacc 3060
 aaggccgctt tcatgaagcc attcatcag actttggaat ccgtccactt gatctacgct 3120
 gctgaagatg tcaactgaatt gacttacaga gaagttttgg aagaacgtcg tcgtgaatcc 3180
 agaggtaaat tcaagaaaac tttcgttttg aacagacctc ctccattatg gactgacggt 3240
 gtoggtttca tcgaccgtgg tatcttgacc aaccacgttc aaccaccatc tgacaactta 3300
 ttggttgcca tctgtggtcc accagttatg caagaattg tcaaggccac tttaaagact 3360
 ttaggttaca acatgaactt ggtcagaacc gttgacgaaa ctgaaccatc tggaaagttaa 3420
 g 3421

ES 2 383 473 T3

<210> 24
 <211> 1000
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Promotor TDH3Sc

<400> 24
 ctattttcga ggaccttgtc accttgagcc caagagagcc aagatttaa ttttcctatg 60
 acttgatgca aattcccaaa gctaataaca tgcaagacac gtacgggcaa gaagacatat 120
 ttgacctctt aacagggttca gacgcgactg cctcatcagt aagaccggtt gaaaagaact 180
 tacctgaaaa aaacgaatat atactagcgt tgaatgtag cgtcaacaac aagaagtta 240
 atgacgcgga ggccaaggca aaaagattcc ttgattacgt aagggagtta gaatcatttt 300
 gaataaaaaa cacgcttttt cagtctgagt ttatcattat caatactgcc atttcaaaga 360
 atacgtaa atattaatagt agtgattttc ctaactttat ttagtcaaaa aattagcctt 420
 ttaattctgc tgtaaccggt acatgcccaa aatagggggc gggttacaca gaatatataa 480
 catcgtaggt gtctgggtga acagtttatt cctggcatcc actaaatata atggagcccg 540
 ctttttaagc tggcatccag aaaaaaaaaag aatcccagca ccaaaatatt gttttcttca 600
 ccaaccatca gttcataggt ccattctctt agcgcgaacta cagagaacag gggcacaac 660
 aggcaaaaaa cgggcacaac ctcaatggag tgatgcaacc tgcctggagt aatgatgac 720
 acaaggcaat tgaccacgc atgtatctat ctcattttct tacaccttct attaccttct 780
 gctctctctg atttgaaaa agctgaaaa aaagggtgaa accagttccc tgaaattatt 840
 cccctacttg actaataagt atataaagac ggtaggtatt gattgtaatt ctgtaaattct 900
 atttcttaa cttcttaaat tctactttta tagttagtct ttttttagt tttaaacac 960
 caagaactta gtttcgaata aacacacata aacaaacaaa 1000

<210> 25
 <211> 500
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Terminador TDH3Sc

<400> 25
 gtgaatttac tttaaattctt gcatttaa atattttctt tttatagctt tatgacttag 60

ES 2 383 473 T3

tttcaattta tataactatntt taatgacatt ttogattcat tgattgaaag ctttgtgntt 120
 tttcttgatg cgctattgca ttgttcttgt ctttttcgcc acatgtaata tctgtagtag 180
 atacctgata cattgtggat gctgagtga aatttagtta ataatggagg cgctcttaat 240
 aattttgggg atattggctt ttttttttaa agtttacaaa tgaatttttt ccgccaggat 300
 aacgattctg aagtactct tagcgttct atcggtagag ccatcaaadc atgcctataa 360
 atcatgccta tatttgctg cagtcagat catctacatg aaaaaactc ccgcaatttc 420
 ttatagaata cgttgaaaat taaatgtacg cgccaagata agataacata tatctagatg 480
 cagtaatata cacagattcc 500

<210> 26
 <211> 1180
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 26

Met Ser Ser Ser Lys Lys Leu Ala Gly Leu Arg Asp Asn Phe Ser Leu
 1 5 10 15
 Leu Gly Glu Lys Asn Lys Ile Leu Val Ala Asn Arg Gly Glu Ile Pro
 20 25 30
 Ile Arg Ile Phe Arg Ser Ala His Glu Leu Ser Met Arg Thr Ile Ala
 35 40 45
 Ile Tyr Ser His Glu Asp Arg Leu Ser Met His Arg Leu Lys Ala Asp
 50 55 60
 Glu Ala Tyr Val Ile Gly Glu Glu Gly Gln Tyr Thr Pro Val Gly Ala
 65 70 75 80
 Tyr Leu Ala Met Asp Glu Ile Ile Glu Ile Ala Lys Lys His Lys Val
 85 90 95
 Asp Phe Ile His Pro Gly Tyr Gly Phe Leu Ser Glu Asn Ser Glu Phe
 100 105 110
 Ala Asp Lys Val Val Lys Ala Gly Ile Thr Trp Ile Gly Pro Pro Ala
 115 120 125
 Glu Val Ile Asp Ser Val Gly Asp Lys Val Ser Ala Arg His Leu Ala

ES 2 383 473 T3

130	135	140																	
Ala	Arg	Ala	Asn	Val	Pro	Thr	Val	Pro	Gly	Thr	Pro	Gly	Pro	Ile	Glu	145	150	155	160
Thr	Val	Gln	Glu	Ala	Leu	Asp	Phe	Val	Asn	Glu	Tyr	Gly	Tyr	Pro	Val	165	170	175	
Ile	Ile	Lys	Ala	Ala	Phe	Gly	Gly	Gly	Gly	Arg	Gly	Met	Arg	Val	Val	180	185	190	
Arg	Glu	Gly	Asp	Asp	Val	Ala	Asp	Ala	Phe	Gln	Arg	Ala	Thr	Ser	Glu	195	200	205	
Ala	Arg	Thr	Ala	Phe	Gly	Asn	Gly	Thr	Cys	Phe	Val	Glu	Arg	Phe	Leu	210	215	220	
Asp	Lys	Pro	Lys	His	Ile	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Ala	Asp	Asn	His	Gly	225	230	235	240
Asn	Val	Val	His	Leu	Phe	Glu	Arg	Asp	Cys	Ser	Val	Gln	Arg	Arg	His	245	250	255	
Gln	Lys	Val	Val	Glu	Val	Ala	Pro	Ala	Lys	Thr	Leu	Pro	Arg	Glu	Val	260	265	270	
Arg	Asp	Ala	Ile	Leu	Thr	Asp	Ala	Val	Lys	Leu	Ala	Lys	Val	Cys	Gly	275	280	285	
Tyr	Arg	Asn	Ala	Gly	Thr	Ala	Glu	Phe	Leu	Val	Asp	Asn	Gln	Asn	Arg	290	295	300	
His	Tyr	Phe	Ile	Glu	Ile	Asn	Pro	Arg	Ile	Gln	Val	Glu	His	Thr	Ile	305	310	315	320
Thr	Glu	Glu	Ile	Thr	Gly	Ile	Asp	Ile	Val	Ser	Ala	Gln	Ile	Gln	Ile	325	330	335	
Ala	Ala	Gly	Ala	Thr	Leu	Thr	Gln	Leu	Gly	Leu	Leu	Gln	Asp	Lys	Ile	340	345	350	
Thr	Thr	Arg	Gly	Phe	Ser	Ile	Gln	Cys	Arg	Ile	Thr	Thr	Glu	Asp	Pro	355	360	365	

ES 2 383 473 T3

Ser Lys Asn Phe Gln Pro Asp Thr Gly Arg Leu Glu Val Tyr Arg Ser
 370 375 380

Ala Gly Gly Asn Gly Val Arg Leu Asp Gly Gly Asn Ala Tyr Ala Gly
 385 390 395 400

Ala Thr Ile Ser Pro His Tyr Asp Ser Met Leu Val Lys Cys Ser Cys
 405 410 415

Ser Gly Ser Thr Tyr Glu Ile Val Arg Arg Lys Met Ile Arg Ala Leu
 420 425 430

Ile Glu Phe Arg Ile Arg Gly Val Lys Thr Asn Ile Pro Phe Leu Leu
 435 440 445

Thr Leu Leu Thr Asn Pro Val Phe Ile Glu Gly Thr Tyr Trp Thr Thr
 450 455 460

Phe Ile Asp Asp Thr Pro Gln Leu Phe Gln Met Val Ser Ser Gln Asn
 465 470 475 480

Arg Ala Gln Lys Leu Leu His Tyr Leu Ala Asp Leu Ala Val Asn Gly
 485 490 495

Ser Ser Ile Lys Gly Gln Ile Gly Leu Pro Lys Leu Lys Ser Asn Pro
 500 505 510

Ser Val Pro His Leu His Asp Ala Gln Gly Asn Val Ile Asn Val Thr
 515 520 525

Lys Ser Ala Pro Pro Ser Gly Trp Arg Gln Val Leu Leu Glu Lys Gly
 530 535 540

Pro Ser Glu Phe Ala Lys Gln Val Arg Gln Phe Asn Gly Thr Leu Leu
 545 550 555 560

Met Asp Thr Thr Trp Arg Asp Ala His Gln Ser Leu Leu Ala Thr Arg
 565 570 575

Val Arg Thr His Asp Leu Ala Thr Ile Ala Pro Thr Thr Ala His Ala
 580 585 590

ES 2 383 473 T3

Leu Ala Gly Ala Phe Ala Leu Glu Cys Trp Gly Gly Ala Thr Phe Asp
 595 600 605

Val Ala Met Arg Phe Leu His Glu Asp Pro Trp Glu Arg Leu Arg Lys
 610 615 620

Leu Arg Ser Leu Val Pro Asn Ile Pro Phe Gln Met Leu Leu Arg Gly
 625 630 635 640

Ala Asn Gly Val Ala Tyr Ser Ser Leu Pro Asp Asn Ala Ile Asp His
 645 650 655

Phe Val Lys Gln Ala Lys Asp Asn Gly Val Asp Ile Phe Arg Val Phe
 660 665 670

Asp Ala Leu Asn Asp Leu Glu Gln Leu Lys Val Gly Val Asn Ala Val
 675 685

Lys Lys Ala Gly Gly Val Val Glu Ala Thr Val Cys Tyr Ser Gly Asp
 690 695 700

Met Leu Gln Pro Gly Lys Lys Tyr Asn Leu Asp Tyr Tyr Leu Glu Val
 705 710 715 720

Val Glu Lys Ile Val Gln Met Gly Thr His Ile Leu Gly Ile Lys Asp
 725 730 735

Met Ala Gly Thr Met Lys Pro Ala Ala Ala Lys Leu Leu Ile Gly Ser
 740 745 750

Leu Arg Thr Arg Tyr Pro Asp Leu Pro Ile His Val His Ser His Asp
 755 760 765

Ser Ala Gly Thr Ala Val Ala Ser Met Thr Ala Cys Ala Leu Ala Gly
 770 775 780

Ala Asp Val Val Asp Val Ala Ile Asn Ser Met Ser Gly Leu Thr Ser
 785 790 795 800

Gln Pro Ser Ile Asn Ala Leu Leu Ala Ser Leu Glu Gly Asn Ile Asp
 805 810 815

ES 2 383 473 T3

Thr Gly Ile Asn Val Glu His Val Arg Glu Leu Asp Ala Tyr Trp Ala
820 825 830

Glu Met Arg Leu Leu Tyr Ser Cys Phe Glu Ala Asp Leu Lys Gly Pro
835 840 845

Asp Pro Glu Val Tyr Gln His Glu Ile Pro Gly Gly Gln Leu Thr Asn
850 855 860

Leu Leu Phe Gln Ala Gln Gln Leu Gly Leu Gly Glu Gln Trp Ala Glu
865 870 875 880

Thr Lys Arg Ala Tyr Arg Glu Ala Asn Tyr Leu Leu Gly Asp Ile Val
885 890 895

Lys Val Thr Pro Thr Ser Lys Val Val Gly Asp Leu Ala Gln Phe Met
900 905 910

Val Ser Asn Lys Leu Thr Ser Asp Asp Ile Arg Arg Leu Ala Asn Ser
915 920 925

Leu Asp Phe Pro Asp Ser Val Met Asp Phe Phe Glu Gly Leu Ile Gly
930 935 940

Gln Pro Tyr Gly Gly Phe Pro Glu Pro Leu Arg Ser Asp Val Leu Arg
945 950 955 960

Asn Lys Arg Arg Lys Leu Thr Cys Arg Pro Gly Leu Glu Leu Glu Pro
965 970 975

Phe Asp Leu Glu Lys Ile Arg Glu Asp Leu Gln Asn Arg Phe Gly Asp
980 985 990

Ile Asp Glu Cys Asp Val Ala Ser Tyr Asn Met Tyr Pro Arg Val Tyr
995 1000 1005

Glu Asp Phe Gln Lys Ile Arg Glu Thr Tyr Gly Asp Leu Ser Val
1010 1015 1020

Leu Pro Thr Lys Asn Phe Leu Ala Pro Ala Glu Pro Asp Glu Glu
1025 1030 1035

Ile Glu Val Thr Ile Glu Gln Gly Lys Thr Leu Ile Ile Lys Leu

ES 2 383 473 T3

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

<210> 27
 <211> 3543
 <212> DNA
 <213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 27
 atgagcagta gcaagaaatt ggccggtcctt agggacaatt tcagtttgct cggcgaaaag 60
 aataagatct tggtcgcaa tagagtgaa attccgatta gaatttttag atctgctcat 120
 gagctgtcta tgagaacat cgccatatac tccatgagg accgtcttcc aatgcacagg 180
 ttgaaggcgg acgaagcgta tggtatcggg gaggagggcc agtatacacc tgtgggtgct 240
 tacttgcaa tggacgat catcgaaatt gcaaagaagc ataagtgga tttcatccat 300
 ccaggttatg ggttcttgct tgaaaattcg gaatttgccg acaaagtagt gaaggccggt 360

ES 2 383 473 T3

atcacttggg tggccctcc agctgaagtt attgactctg tgggtgacaa agtctctgcc 420
 agacacttgg cagcaagagc taacgttcct accgttcccc gtactccagg acctatcgaa 480
 actgtgcaag aggcaactga cttcgttaat gaatacggct acccggatgat cattaaggcc 540
 gcctttggtg gtgggtgtag aggtatgaga gtcgtttagag aagggtgacga cgtggcagat 600
 gcctttcaac gtgctacctc cgaagcccgt actgccttcg gtaatggtac ctgctttgtg 660
 gaaagattct tggacaagcc aaagcatatt gaagttcaat tgttggtga taaccacgga 720
 aacgtggttc atcttttcga aagagactgt tctgtgcaaa gaagacacca aaaagttgtc 780
 gaagtcgctc cagcaaagac tttgccccgt gaagttcgtg acgctatfff gacagatgct 840
 gttaaattag ctaaggtatg tggttacaga aacgcaggta ccgccgaatt cttggttgac 900
 aacccaaaaca gacactatff cattgaaatt aatccaagaa ttcaagtgga gcataccatc 960
 actgaagaaa tcaccggtat tgacattggt tctgccc aaa tccagattgc cgcaggtgcc 1020
 actttgactc aactaggtct attacaggat aaaatcacca cccgtgggtt ttccatccaa 1080
 tgtcgtatta ccaactgaaga tccctctaag aatttccaac cggataccgg tcgcctggag 1140
 gtctatcgtt ctgccggtgg taatggtgtg agattggacg gtggtaacgc ttatgcaggt 1200
 gctactatct cgcctcacta cgactcaatg ctggtcaaat gttcatgctc tggttctact 1260
 tatgaaatcg tccgtaggaa gatgattcgt gccctgatcg aattcagaat cagaggtggt 1320
 aagaccaaca ttcccttctt attgactctt ttgaccaatc cagtttttat tgagggtaca 1380
 tactggacga cttttattga cgacaccca caactgttcc aaatggtatc gtcacaaaac 1440
 agagcgcaaa aactgttaca ctatttggca gacttggcag ttaacggttc ttctattaag 1500
 ggtcaaattg gcttgccaaa actaaaatca aatccaagtg tccccattt gcacgatgct 1560
 cagggcaatg tcatcaacgt taaaagtct gcaccacat ccggatggag acaagtgcta 1620
 ctggaaaagg gaccatctga atttgccaag caagtcagac agttcaatgg tactctactg 1680
 atggacacca cctggagaga cgctcatcaa tctctacttg caacaagagt cagaaccac 1740
 gatttggcta caatcgctcc aacaaccgca catgcccttg caggtgcttt cgctttagaa 1800
 tgttggggtg gtgctacatt cgacgttgca atgagattct tgcagtagga tccatgggaa 1860
 cgtctgagaa aattaagatc tctggtgcct aatattccat tccaaatggt attacgtggt 1920
 gccaacggtg tggcttactc ttcattacct gacaatgcta ttgaccattt tgtcaagcaa 1980
 gccaaaggata atgggtgtga tatatttaga gtttttgatg ccttgaatga tttagaacaa 2040
 ttaaaagttg gtgtgaatgc tgtcaagaag gccggtggtg ttgtcgaagc tactgtttgt 2100

ES 2 383 473 T3

tactctggtg acatgcttca gccaggtaag aaatacaact tagactacta cctagaagtt 2160
 gttgaaaaaa tagttcaa at ggttacacat atcttgggta ttaaggatat ggcaggact 2220
 atgaaaccgg ccgctgccaa attattaatt ggctccctaa gaaccagata tccggattta 2280
 ccaattcatg ttcacagtca tgactccgca ggtactgctg ttgctctat gactgcatgt 2340
 gccctagcag gtgctgatgt tgctgatgta gctatcaatt caatgtcggg cttaacttcc 2400
 caaccatcaa ttaatgcact gttggcttca ttagaaggta acattgatac tgggattaac 2460
 gttgagcatg ttogtgaatt agatgcatac tgggcccgaaa tgagactggt gtattcttgt 2520
 ttcgaggccg acttgaagg accagatcca gaagtttacc aacatgaaat cccagggtgt 2580
 caattgacta acttgttatt ccaagctcaa caactgggtc ttggtgaaca atgggctgaa 2640
 actaaaagag cttacagaga agccaattac ctactgggag atattgttaa agttaccca 2700
 acttctaagg ttgtcgggta tttagctcaa ttcattgggtt ctaacaaact gacttccgac 2760
 gatattagac gtttagctaa ttctttggac tttcctgact ctgttatgga cttttttgaa 2820
 ggtttaattg gtcaaccata cgggtgggtc ccagaacctat taagatctga tgtattgaga 2880
 aacaagagaa gaaagttgac gtgccgtcca ggtttagaat tagaaccatt tgatctcgaa 2940
 aaaattagag aagacttgca gaacagattc ggtgatattg atgaatgca tgttgcttct 3000
 tacaatatgt atccaagggt ctatgaagat ttccaaaaga tcagagaaac atacggtgat 3060
 ttatcagttc taccaaccaa aaatttccta gcaccagcag aacctgatga agaaatcgaa 3120
 gtcaccatcg aacaaggtaa gactttgatt atcaaattgc aagctggttg tgacttaaat 3180
 aagaaaactg ggcaaagaga agtgtatctt gaattgaacg gtgaattaag aaagatcaga 3240
 gttgcagaca agtcacaaaa catacaatct gttgctaac caaaggctga tgtccacgat 3300
 actcacaaa tcggtgcacc aatggctggt gttatcatag aagttaaagt acataaaggg 3360
 tctttggtga aaaaggcga atcgattgct gttttgagt ccatgaaaat ggaaatggtt 3420
 gtctcttcac cagcagatgg tcaagttaaa gacgttttca ttaaggatgg tgaaagtgtt 3480
 gacgcatcag atttggtggt tgtcctagaa gaagaaacc taccctcatc ccaaaaaaag 3540
 taa 3543

<210> 28
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

ES 2 383 473 T3

<220>

<223> Cebador P1

<400> 28

ggactagtat gagcagtagc aagaaattgg

30

<210> 29

<211> 31

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador P2

<400> 29

ccgctcgagt tacttttttt gggatggggg t

31

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una célula microbiana eucariótica recombinante, seleccionada del grupo que consiste en una levadura y en un hongo filamentoso, que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima que cataliza la conversión de fosfoenolpiruvato en oxaloacetato, en donde se genera ATP, en donde la enzima comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 55% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y/o SEQ ID NO: 5, en donde la secuencia de nucleótidos se expresa en el citosol y la enzima es activa en el citosol.
- 10 2.- Una célula de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la enzima es una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.
- 3.- Una célula de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde la enzima es una enzima heteróloga, preferiblemente derivada de una bacteria.
- 15 4.- Una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la célula es una levadura, preferiblemente una *Saccharomyces cerevisiae*, o un hongo filamentoso tal como *Aspergillus niger*.
- 5.- Una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la célula sobre-expresa, además, una secuencia de nucleótidos que codifica una piruvato carboxilasa.
- 20 6.- Una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la célula comprende, además, una secuencia de nucleótidos que codifica una malato deshidrogenasa, en donde la malato deshidrogenasa es activa en el citosol tras la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica malato deshidrogenasa.
- 25 7.- Una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la célula comprende, además, una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima que cataliza la conversión de ácido málico en ácido fumárico en el citosol, tras la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica una enzima que cataliza la conversión de ácido málico en ácido fumárico.
- 30 8.- Una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde al menos un gen que codifica succinato deshidrogenasa no es funcional.
- 9.- Una célula de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, que es una *Aspergillus niger* que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa de SEQ ID NO: 7 y/o SEQ ID NO: 8.
- 35 10.- Una célula de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8, que es una *Saccharomyces cerevisiae* que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una fosfoenolpiruvato carboxiquinasa de SEQ ID NO: 9 y/o SEQ ID NO: 10.
- 40 11.- Un procedimiento para la preparación de ácido succínico, que comprende fermentar la célula microbiana eucariótica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en un medio de fermentación adecuado, y preparar el ácido succínico.
- 12.- Un caldo de fermentación que comprende ácido succínico, en donde el caldo de fermentación se puede obtener mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11.

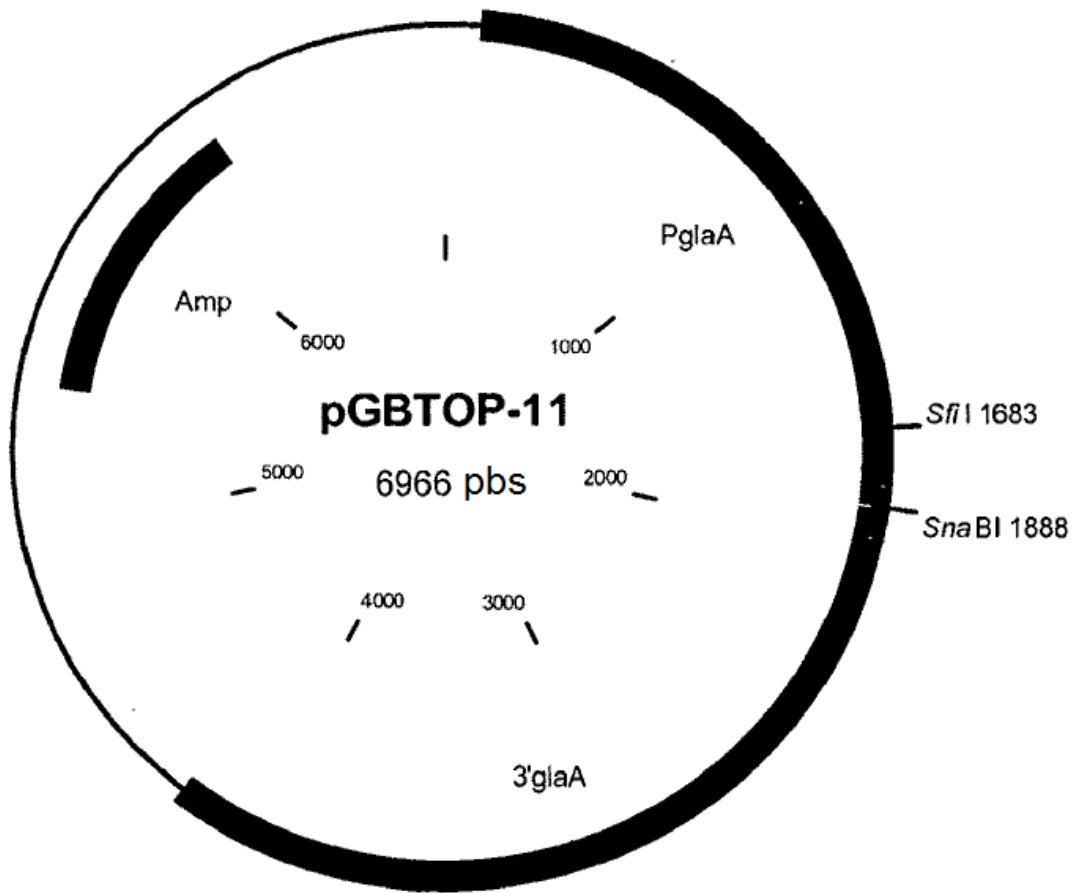


Figura 1

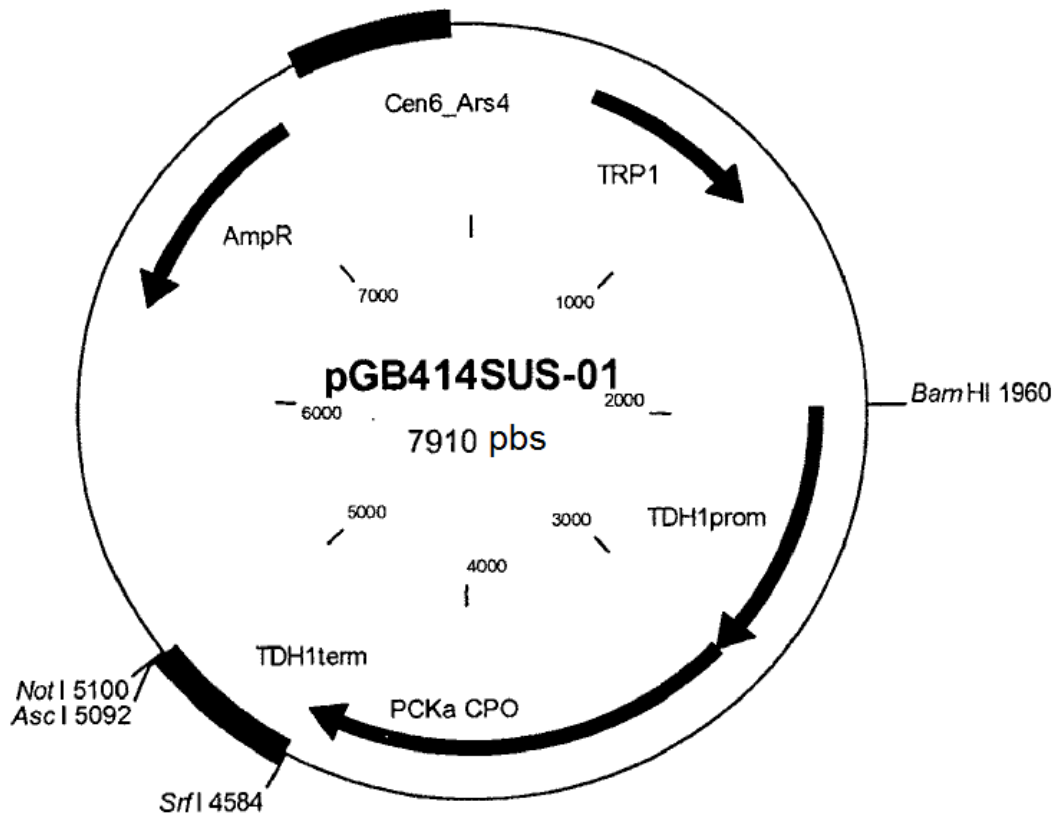


Figura 2

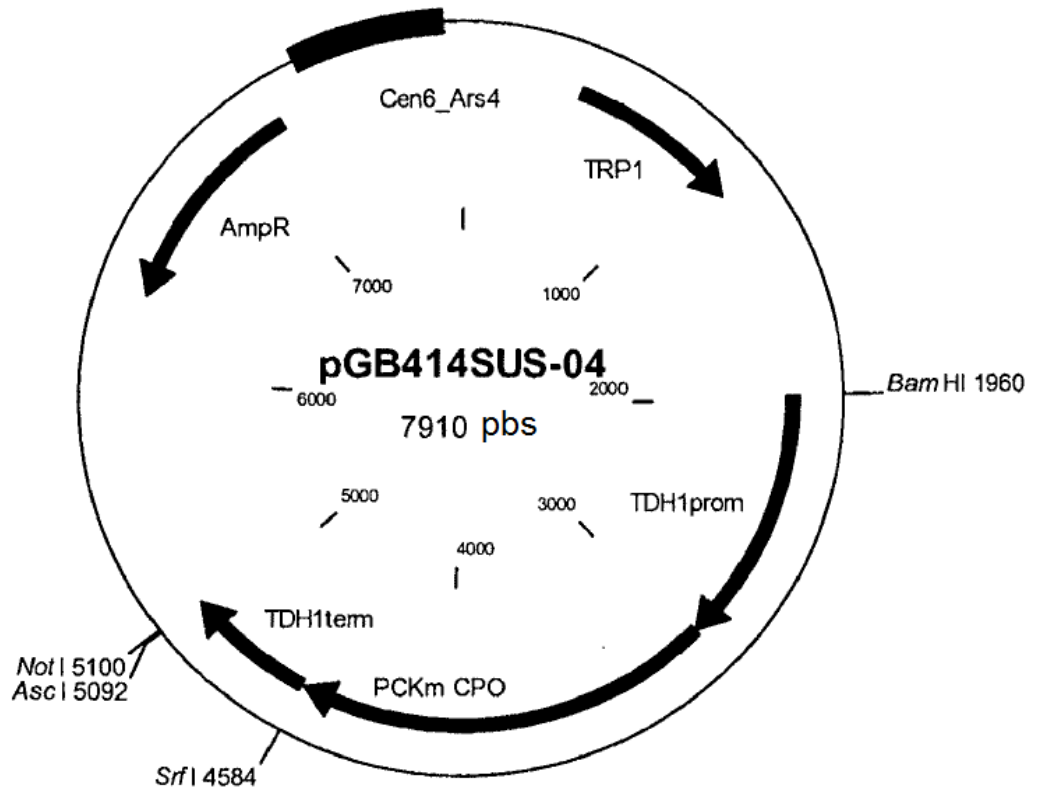


Figura 3

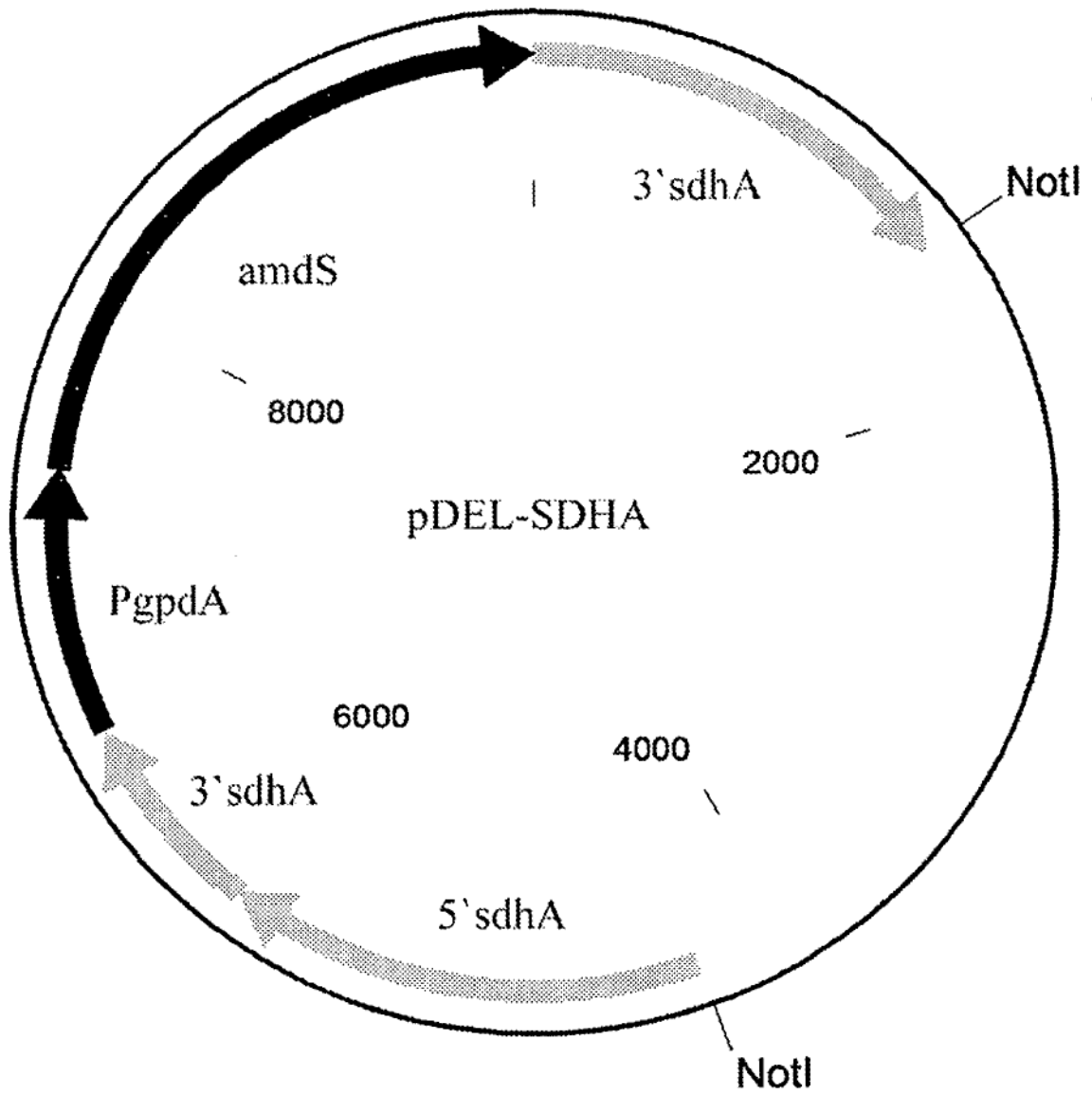


Figura 4

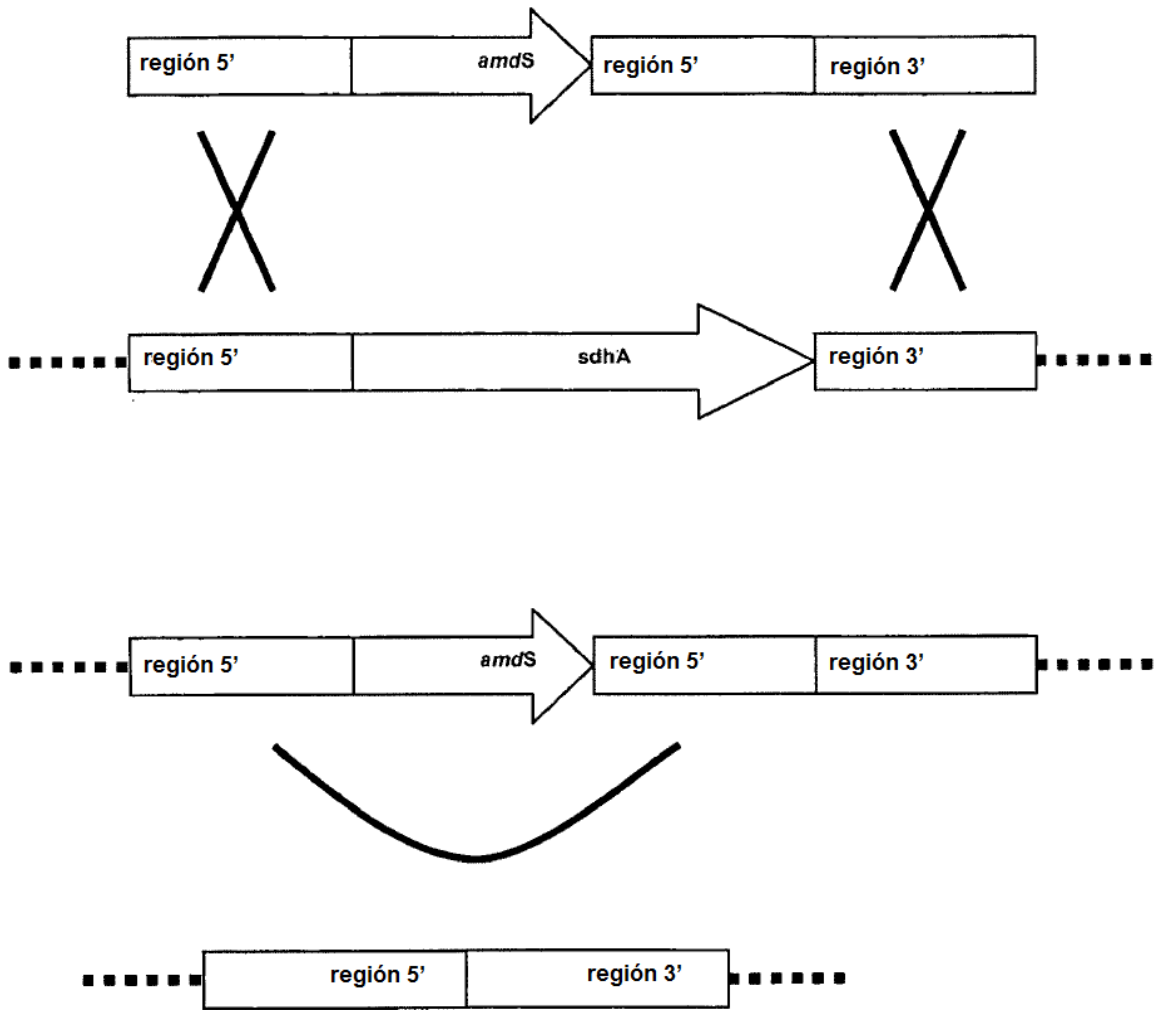


Figura 5

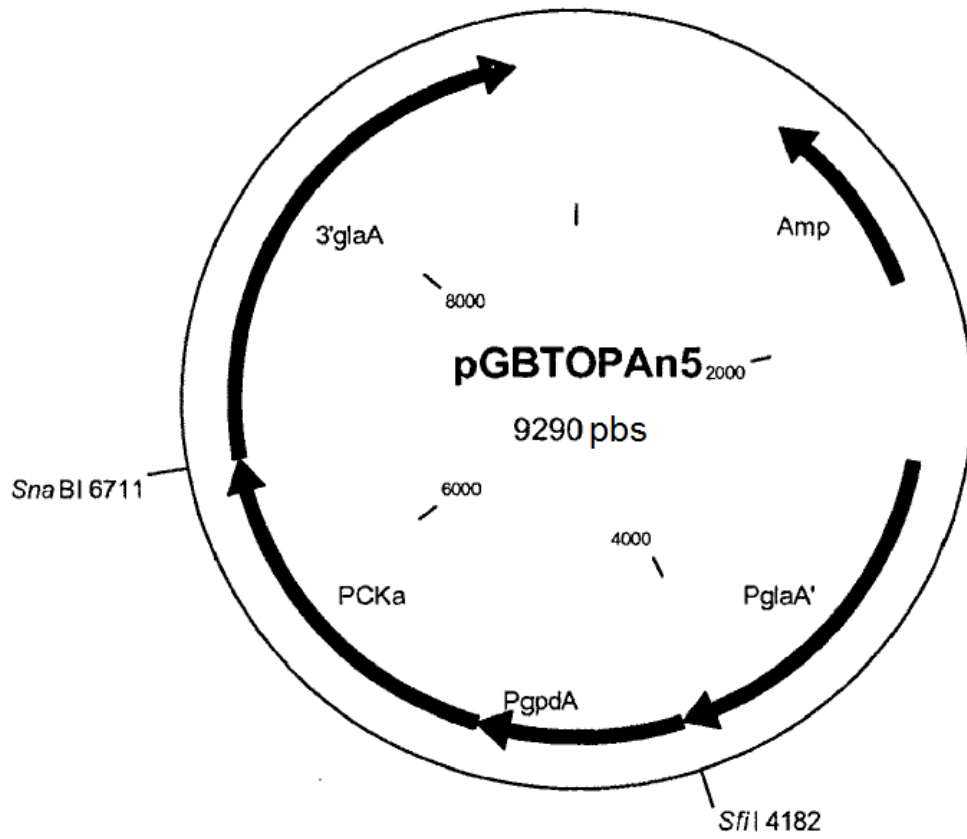


Figura 6

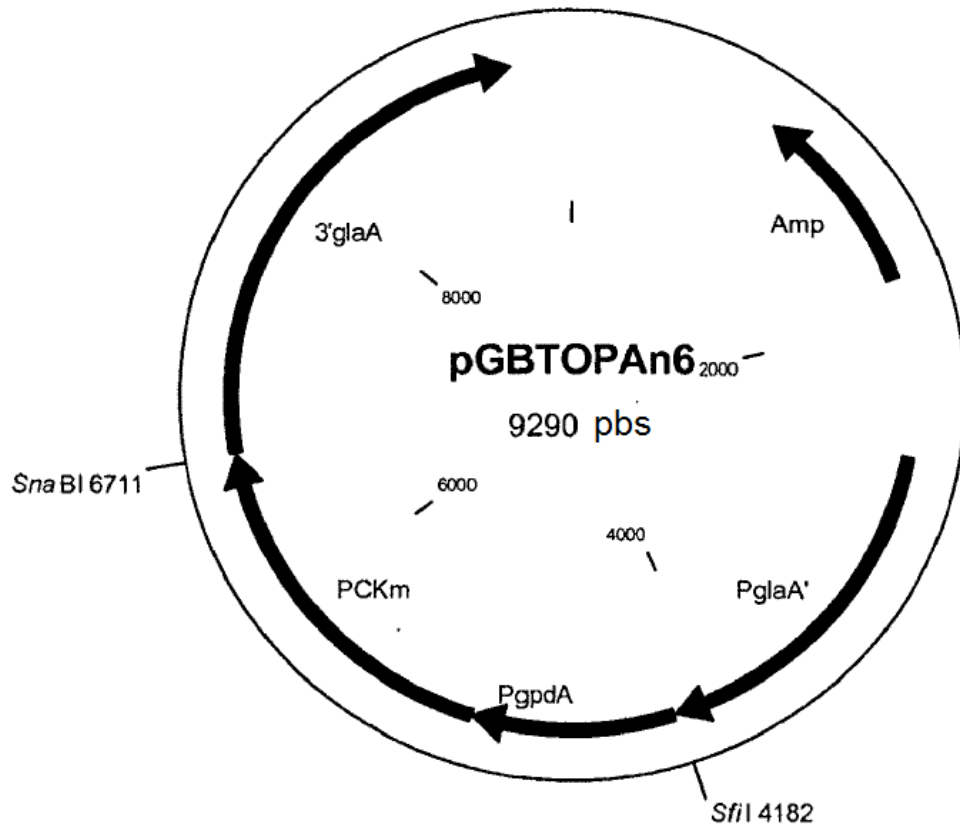


Figura 7

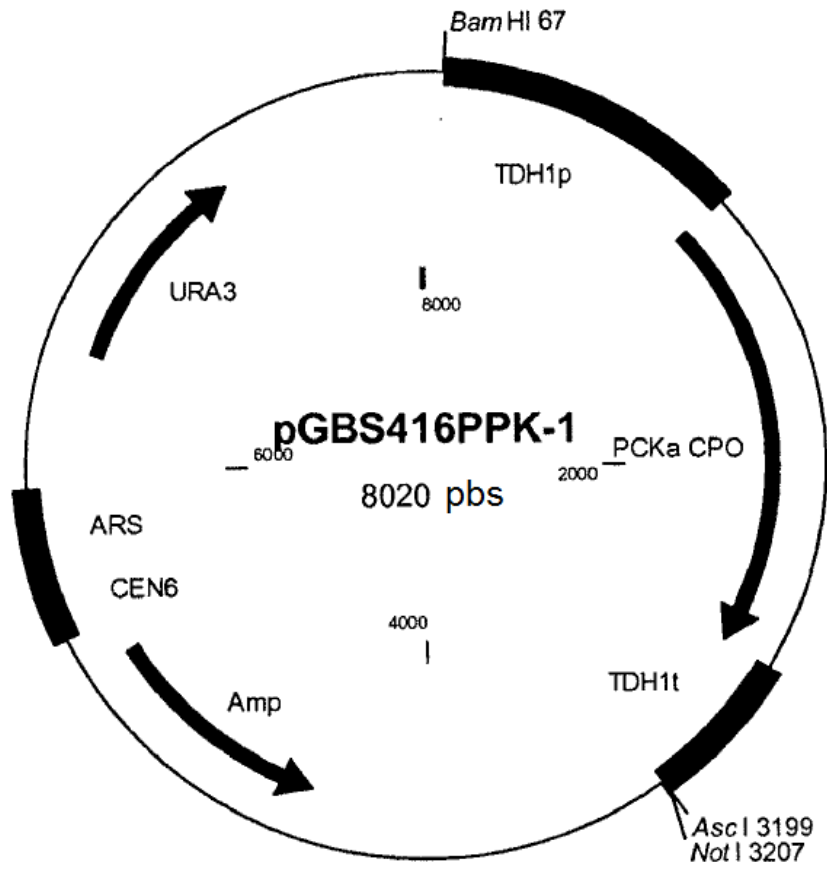


Figura 8

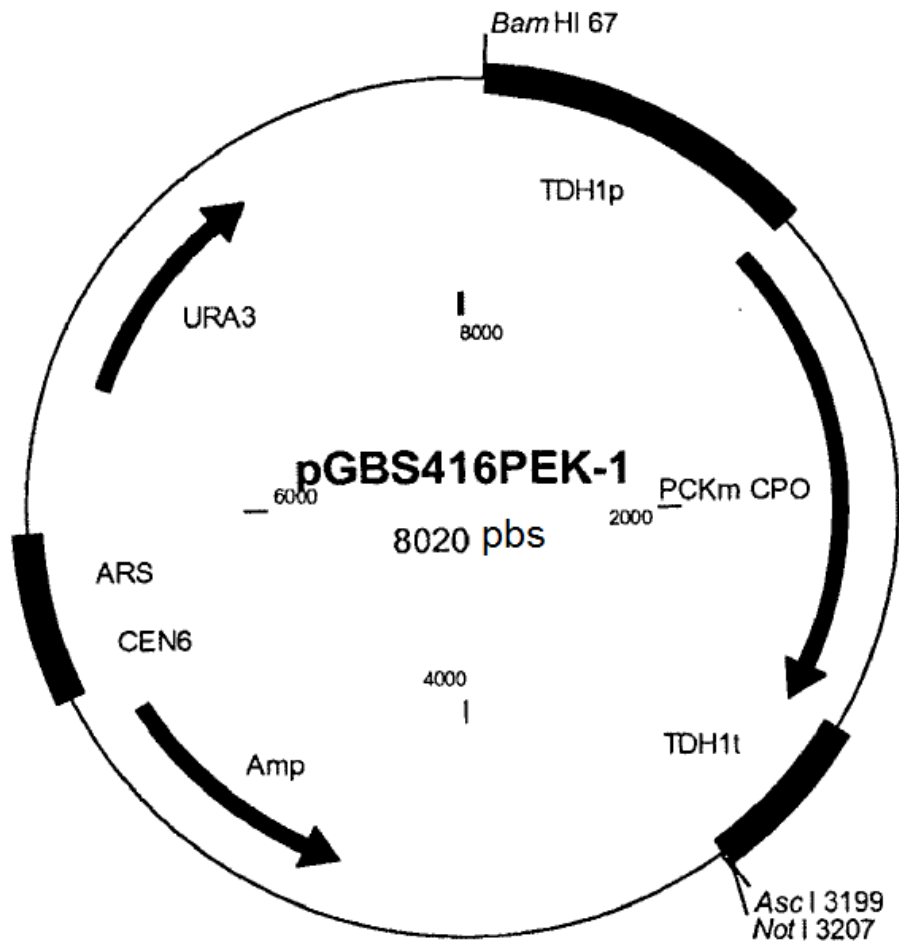


Figura 9

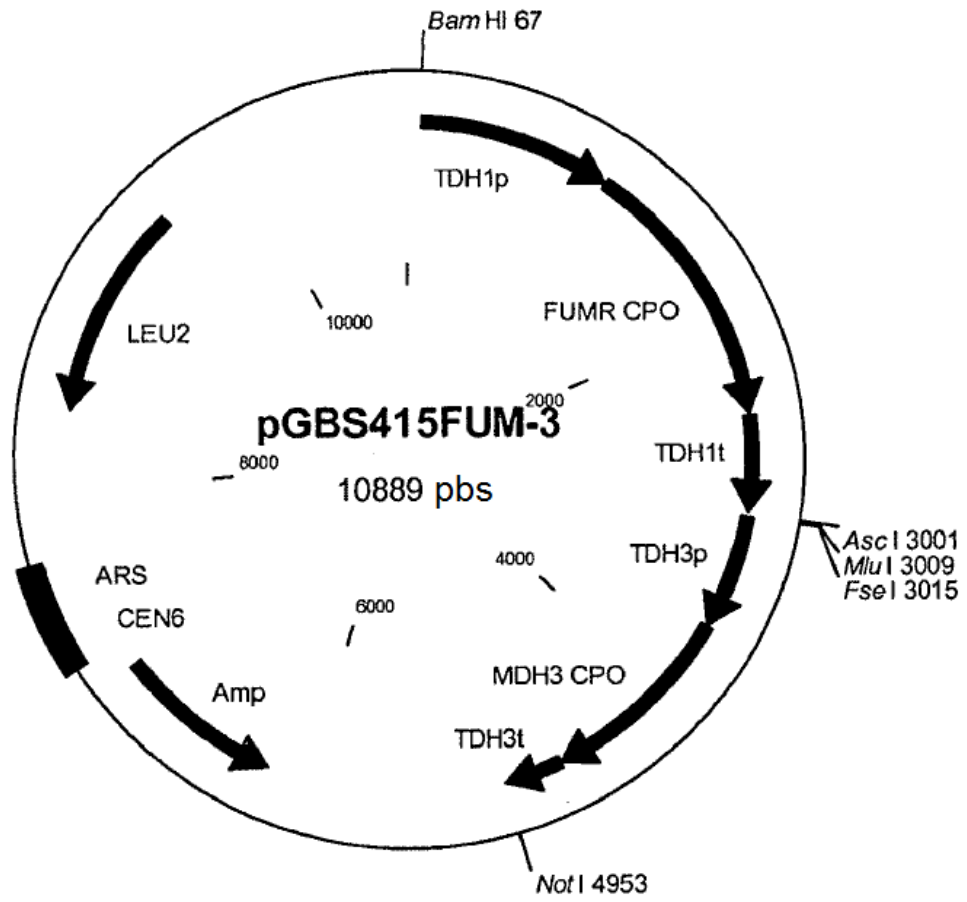


Figura 10

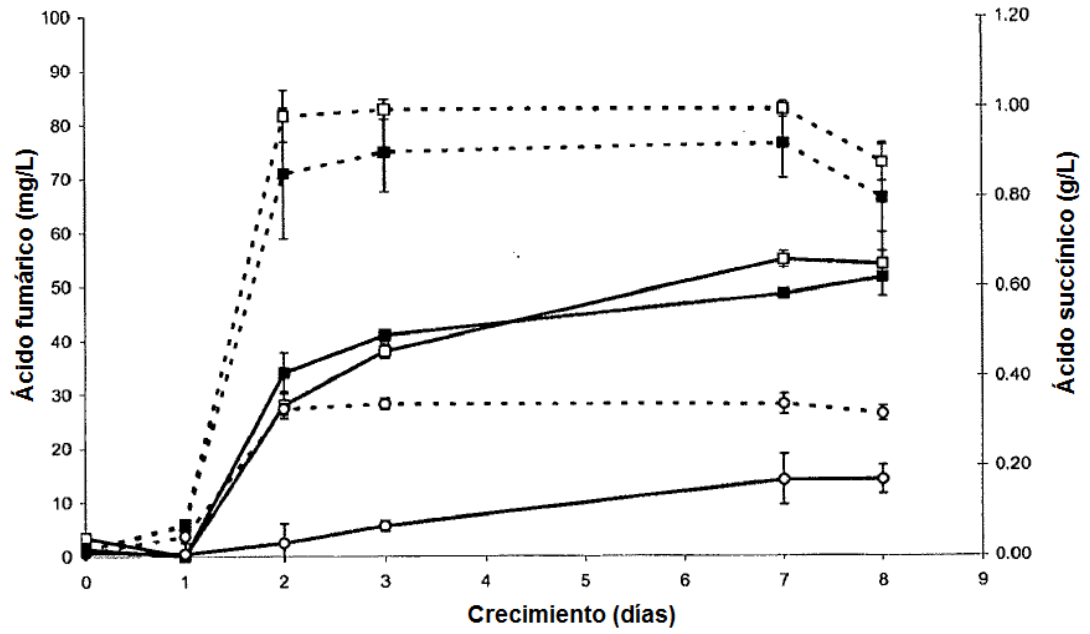


Figura 11

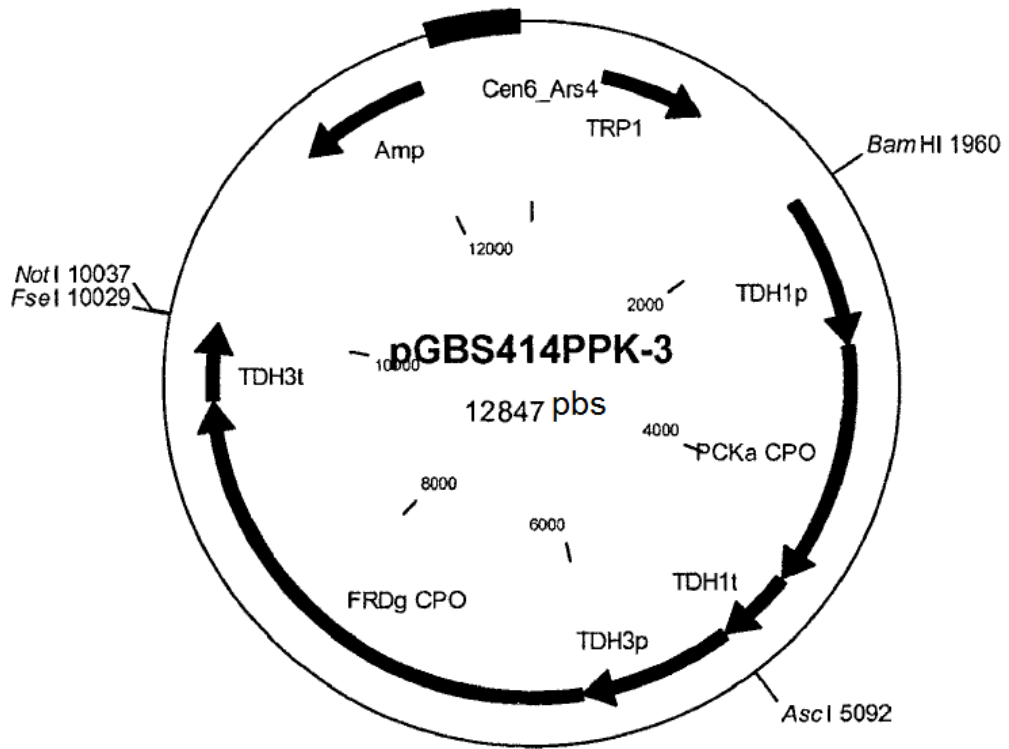


Figura 12

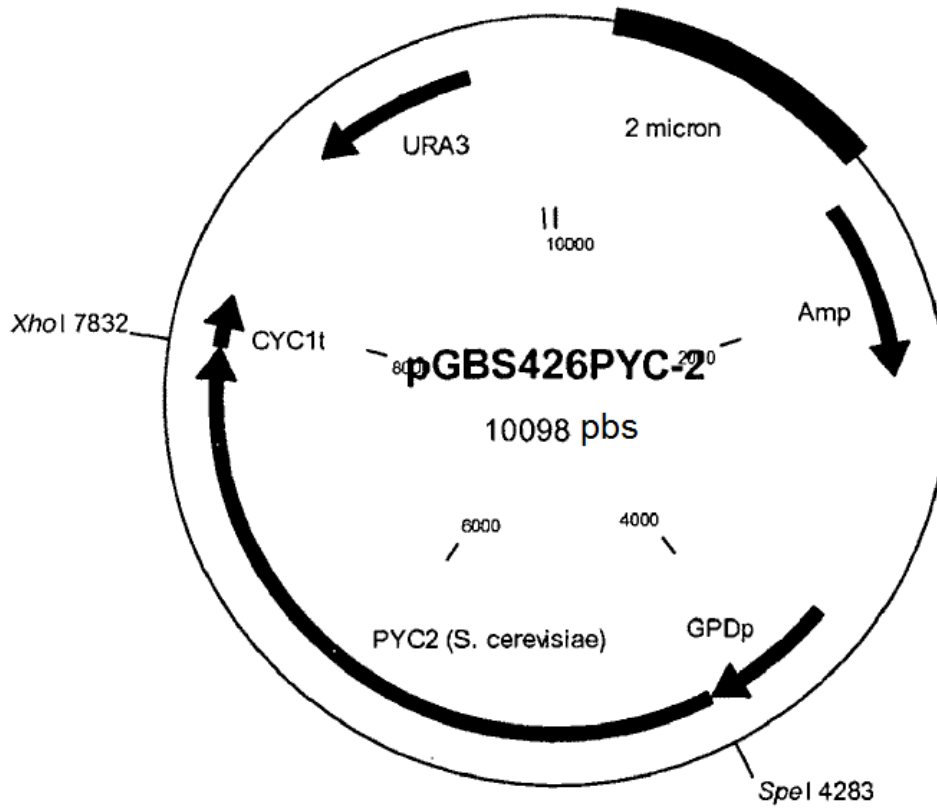


Figura 13

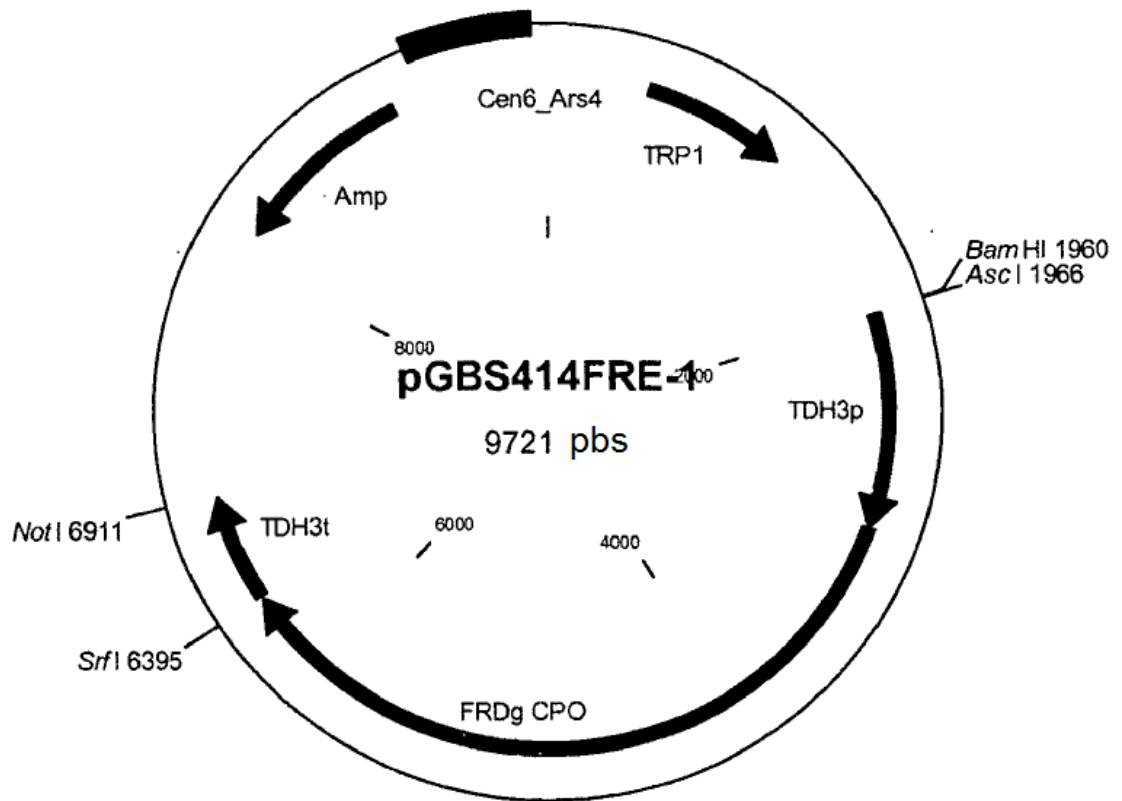


Figura 14

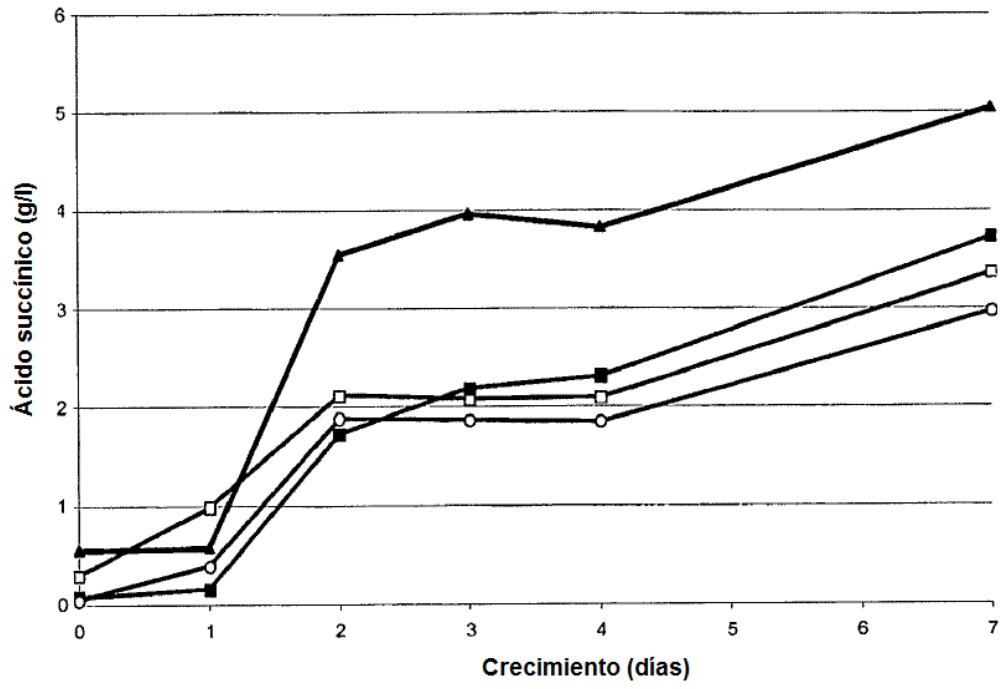


Figura 15