

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 989**

51 Int. Cl.:
C12N 15/60 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
C12P 7/46 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08851806 .3**
96 Fecha de presentación: **14.11.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2220234**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.08.2010**

54 Título: **Producción de ácido dicarboxílico en levadura recombinante**

30 Prioridad:
20.11.2007 EP 07121117
27.05.2008 EP 08156960

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.11.2012

73 Titular/es:
DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
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, María Isabel

ES 2 389 989 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 levadura recombinante

- 5 La presente invención se refiere a una levadura recombinante que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una enzima que cataliza la conversión de ácido málico en ácido fumárico, y a un procedimiento para la producción de un ácido dicarboxílico.
- 10 Los ácidos dicarboxílicos, tales como ácido fumárico y ácido succínico, son precursores potenciales 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 usar un material de alimentación renovable como fuente de carbono.
- 20 Se sabe que 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 El documento WO 2007/061590 describe una levadura negativa para piruvato descarboxilasa para la producción de ácido málico y/o ácido succínico, que se transforma con una enzima piruvato carboxilasa o una fosfoenolpiruvato carboxilasa, una enzima malato deshidrogenasa y una proteína transportadora de ácido málico (MAE).
- 30 Pines *et al.*, 1999 Appl. Microbiol. Biotechnol. 46, p. 393.399, describen que la sobreexpresión de la fumarasa citosólica de *S. cerevisiae* en levadura no da como resultado acumulación de ácido fumárico, pero parece que potencia la producción de ácido L-málico.
- 35 A pesar de las mejoras que se han realizado en la producción fermentativa de ácido succínico, sigue existiendo una necesidad de microorganismos mejorados para la producción fermentativa de ácido succínico.
- El objetivo de la presente invención es una levadura alternativa para la producción de un ácido dicarboxílico, tal como ácido fumárico y ácido succínico.
- 40 El objetivo se consigue de acuerdo con la invención con una levadura recombinante que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una enzima heteróloga que cataliza la conversión ácido málico a ácido fumárico. Sorprendentemente, se encontró que se produjo una mayor cantidad de ácido dicarboxílico, tal como ácido fumárico y/o ácido succínico, mediante la levadura recombinante según la presente invención, en comparación con una levadura de tipo salvaje.
- 45 Como se usa aquí, una levadura recombinante según la presente invención se define como una célula que contiene, o se transforma o se modifica genéticamente con una secuencia nucleotídica y/o proteína que no aparece de forma natural en la levadura, o contiene una copia o copias adicionales de una secuencia de ácido nucleico (o proteína) endógena. Una levadura de tipo salvaje se define aquí como la levadura progenitora de la levadura recombinante.
- 50 Preferiblemente, la enzima que cataliza la conversión de ácido málico en ácido fumárico es activa en el citosol tras la expresión de la secuencia nucleotídica que codifica la enzima.
- 55 Una enzima que cataliza la conversión de ácido málico en ácido fumárico, preferiblemente tiene actividad de fumarasa, preferiblemente la enzima es una fumarasa de E.C. 4.2.1.2.
- Una enzima que cataliza la conversión de ácido málico en ácido fumárico puede derivar de cualquier origen adecuado, por ejemplo bacterias, levaduras, hongos, protozoos o plantas. Preferiblemente, la enzima según la presente invención deriva de *Rhizopus oryzae*.
- 60 Se demostró que la expresión de un gen fumR heterólogo de *Rhizopus oryzae* en *Aspergillus niger* no dio como

resultado la producción de ácido succínico en condiciones limitadas de oxígeno (tesis doctoral, 2006 W.A. de Jongh, Biocentrum Technical University of Denmark). Sorprendentemente, una levadura que expresa fumarasa heteróloga según la presente invención produjo una mayor cantidad de ácido succínico en condiciones limitadas de oxígeno en comparación con la levadura de tipo salvaje.

5 El término "homóloga", cuando se usa 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 o cepa.

10 El término "heterólogo", cuando se usa 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 aquellos en los que se encuentra en la naturaleza. Los ácidos nucleicos o proteínas heterólogos no son endógenos a 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.

15 Preferiblemente, la levadura según la presente invención es una levadura que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una enzima que cataliza la conversión de ácido málico en ácido fumárico, en la que la enzima tiene al menos 70%, 75%, preferiblemente al menos 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:1, o SEC ID NO:3, preferiblemente con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:3, preferiblemente la enzima comprende secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:3.

20 La identidad de secuencia se define aquí como una relación entre dos o más secuencias de aminoácidos (polipeptidos o proteínas) o dos o más secuencias de ácidos nucleicos (polinucleótidos), según se determina comparando las secuencias. Habitualmente, las 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 mediante el emparejamiento entre hebras de dichas secuencias.

25 Los métodos preferidos para determinar la identidad se diseñan para dar el mayor emparejamiento entre las secuencias sometidas a ensayo. Los métodos para determinar la identidad son codificados en programas de ordenador públicamente disponibles. Los métodos de programas de ordenador preferidos para determinar la identidad 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). Los parámetros preferidos para la comparación de secuencias de aminoácidos usando BLASTP son abertura de salto 11,0, extensión de salto 1, matriz Blosum 62. Los parámetros preferidos para la comparación de secuencias de ácidos nucleicos usando BLASTP son abertura de salto 11,0, extensión de salto 1, matriz completa de ADN (matriz de identidad de ADN).

30 Una secuencia nucleotídica que codifica una enzima que cataliza la conversión de ácido málico en ácido fumárico en el citosol según la invención también se puede definir por su capacidad para hibridarse con secuencias nucleotídicas que codifican las enzimas de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, en condiciones de hibridación moderadas, o preferiblemente en condiciones de hibridación rigurosas. Condiciones de hibridación rigurosas se definen aquí como condiciones que permiten que una secuencia de ácido nucleico de al menos alrededor de 25, preferiblemente alrededor de 50 nucleótidos, 75 ó 100 y, lo más preferible, de alrededor de 200 o más nucleótidos, se hibride a una temperatura de alrededor de 65°C en una disolución que comprende una sal alrededor de 1 M, preferiblemente 6 x SSC (cloruro de sodio, citrato de sodio) o cualquier otra disolución que tenga una fuerza iónica comparable, y el lavado a 65°C en una disolución que comprende una sal alrededor de 0,1 M, o menor, preferiblemente 0,2 x SSC, o cualquier otra disolución que tenga una fuerza iónica comparable. Preferiblemente, la hibridación se lleva a cabo durante la noche, es decir, al menos durante 10 horas, y preferiblemente el lavado se lleva a cabo 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 secuencia de alrededor de 90% o más.

35 Las condiciones moderadas se definen aquí como condiciones que permiten que una secuencia de ácido nucleico de al menos 50 nucleótidos, preferiblemente de alrededor de 200 o más nucleótidos, se hibride a una temperatura de alrededor de 45°C en una disolución que comprende una sal alrededor de 1 M, preferiblemente 6 x SSC o cualquier otra disolución que tenga una fuerza iónica comparable, y el lavado a temperatura ambiente en una disolución que comprende una sal alrededor de 1 M, preferiblemente 6 x SSC o cualquier otra disolución que tenga una fuerza iónica comparable. Preferiblemente, la hibridación se lleva a cabo durante la noche, es decir, al menos durante 10 horas, y preferiblemente el lavado se lleva a cabo 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 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 El término "gen", tal como se utiliza aquí, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que contiene un molde para una ácido nucleico polimerasa, en eucariotas, ARN polimerasa II. Los genes se transcriben en los ARNm, que luego se traducen en proteínas.

10 La expresión "ácido nucleico", tal como se utiliza aquí, incluye la referencia a un polímero desoxirribonucleotídico o ribonucleotídico, es decir, un polinucleótido, en una forma monocatenaria o bicatenaria, y a menos que se limite de otro modo, comprende análogos conocidos que tienen la naturaleza esencial de nucleótidos naturales, por cuanto se hibridan a ácidos nucleicos monocatenarios 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.

15 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de forma indistinta aquí para aludir a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son un análogo químico artificial de un aminoácido correspondiente que se produce en la naturaleza, así como a polímeros de aminoácidos que se producen en la naturaleza. La naturaleza esencial de tales análogos de aminoácidos que se producen en la naturaleza es que, cuando se incorporan en una proteína, esa proteína es específicamente reactiva a anticuerpos inducidos contra 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 glucosilación, fijación de lípidos, sulfatación, gamma-carboxilación de restos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP-ribosilación.

20 El término "enzima", tal como se utiliza aquí, se define como una proteína que cataliza una reacción (bio)química en una célula, tal como una célula de levadura.

30 Para aumentar la probabilidad de que la enzima introducida sea expresada en forma activa en una levadura de la invención, se puede adaptar la secuencia nucleotídica codificante correspondiente para optimizar su uso de codones con el de la célula de levadura 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 nucleotídicas al de la levadura es la tecnología de la optimización del par de codones como 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 nucleotídicas que codifican el polipéptido han sido modificadas con respecto a su uso de codones, en particular los pares de codones que se usan, para obtener una expresión mejorada de la secuencia nucleotídicas 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 codificante.

35 Habitualmente, la secuencia nucleotídica que codifica una enzima, por ejemplo la enzima que cataliza la conversión de ácido málico en ácido fumárico, está operablemente enlazada a un promotor que provoca una expresión suficiente de la secuencia nucleotídica correspondiente en la levadura de acuerdo con la presente invención, para conferir a la levadura la capacidad de producir ácido fumárico y/o ácido succínico.

40 Tal como se usa aquí, la expresión "operablemente enlazada" se refiere a un enlace de elementos polinucleotídicos (o secuencias codificantes o secuencias de ácidos nucleicos) en una relación funcional. Una secuencia de ácido nucleico está "operablemente enlazada" cuando está situada en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está operablemente enlazado a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia codificante.

45 Tal como se utiliza aquí, el término "promotor" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que actúa para controlar la transcripción de uno o más genes, situados en dirección 5' con respecto a la dirección de la transcripción del sitio de inicio de la transcripción del gen, y está estructuralmente identificado por la presencia de un sitio de unión para ARN polimerasa dependiente de ADN, 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 en la mayoría de las condiciones medioambientales y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que es activo en la regulación medioambiental o de desarrollo.

60 Un promotor que podría usarse para conseguir la expresión de una secuencia nucleotídica que codifica una enzima,

tal como una enzima que cataliza la conversión de ácido málico en ácido fumárico, puede no ser nativo a la secuencia nucleotídica que codifica la enzima a expresar, es decir, un promotor que es heterólogo a la secuencia nucleotídica (secuencia codificante) a la que está operablemente enlazado. Preferiblemente, el promotor es homólogo, es decir, endógeno a la célula hospedante.

5 Los promotores adecuados en este contexto incluyen promotores naturales tanto constitutivos como inducibles, así como promotores manipulados mediante ingeniería, que son conocidos por la persona experta en la técnica. Los promotores adecuados en células eucariotas pueden ser 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, TEF1 y TDH.

10 Habitualmente, una secuencia nucleotídica que codifica una enzima comprende un terminador. En la presente invención se puede usar cualquier terminador que sea funcional en la célula eucariota. Los terminadores preferidos se obtienen a partir de genes naturales de la célula hospedante. Las secuencias de terminadores adecuadas son bien conocidas en la técnica. Preferiblemente, tales terminadores 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).

15 En una realización preferida, la secuencia nucleotídica que codifica una enzima que cataliza la conversión de ácido málico en ácido fumárico, tal como fumarasa, se sobreexpresa para lograr una producción incrementada de ácido fumárico y/o ácido succínico por parte de una levadura recombinante según la presente invención.

20 Existen diversos medios en la técnica para la sobreexpresión de secuencias nucleotídicas que codifican enzimas en la célula de levadura de la invención. En particular, una secuencia nucleotídica que codifica una enzima se puede sobreexpresar 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 episómico, o introduciendo un vector de expresión (episómico) que comprende múltiples copias del gen. Preferiblemente, la sobreexpresión de la enzima de acuerdo con la invención se consigue con un promotor constitutivo (fuerte).

25 El constructo de ácido nucleico puede ser un plásmido, por ejemplo un plásmido de bajo número de copias o un plásmido de alto número de copias. La levadura de acuerdo con la presente invención puede comprender una sola copia, pero preferiblemente comprende múltiples copias de la secuencia nucleotídica que codifica una fumarasa, por ejemplo mediante múltiples copias de un constructo nucleotídico.

30 El constructo de ácido nucleico se puede mantener episómicamente y, de este modo, comprende una secuencia para la replicación autónoma, tal como una secuencia de replicación autosómica. Un constructo de ácido nucleico episómico adecuado puede basarse, por ejemplo, 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 constructo de ácido nucleico puede integrarse en una o más copias en el genoma de la célula de levadura. La integración en el genoma de la célula puede producirse aleatoriamente mediante recombinación no homóloga, pero preferiblemente el constructo de ácido nucleico se puede integrar en el genoma de la célula mediante recombinación homóloga, tal como se conoce bien en la técnica (véanse los documentos WO90/14423, EP-A-0481008, EP-A-0635574 y US 6.265.186).

35 En una realización preferida, una enzima que cataliza la conversión de ácido málico en ácido fumárico es activa en el citosol con la expresión de la secuencia nucleotídica codificante. La actividad citosólica de la enzima se prefiere para una productividad elevada de ácido fumárico y/o ácido succínico por parte de la célula eucariótica.

40 Una secuencia nucleotídica que codifica una enzima que cataliza la conversión de ácido málico en ácido succínico puede comprender una señal seleccionadora de dianas peroxisómica o mitocondrial, por ejemplo como se determina por el método descrito por Schlüter et al, Nucleic Acid Research 2007, Vol 25, D815-D822. En el caso de que la enzima comprenda una señal seleccionadora de dianas, puede ser preferido que la levadura según la invención comprenda una forma truncada de la enzima, en la que se elimine la señal seleccionadora de dianas.

45 La levadura de acuerdo con la presente invención pertenece preferiblemente a uno de los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, o *Zygosaccharomyces*. Más preferiblemente, la célula eucariótica es *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces bayanus*, *Pichia stipidis*, *Kluyveromyces marxianus*, *K. lactis*, *K. thermotolerans*, o *Zygosaccharomyces bailii*.

50 Preferiblemente, la levadura es una *Saccharomyces cerevisiae*, preferiblemente una *Saccharomyces cerevisiae* que

comprende SEQ ID NO: 4.

Además de una secuencia nucleotídica que codifica una enzima que cataliza la conversión de ácido málico en ácido fumárico de acuerdo con la presente invención, la levadura recombinante de acuerdo con la presente invención puede comprender otras modificaciones genéticas, por ejemplo mutaciones, supresiones o interrupciones, en secuencias nucleotídicas homólogas, y/o transformación con secuencias nucleotídicas que codifican enzimas homólogas y/o heterólogas que catalizan una reacción en la célula, dando como resultado un flujo incrementado hacia ácido fumárico y/o ácido succínico. Por ejemplo, puede ser favorable introducir, modificar genéticamente y/o sobreexpresar secuencias nucleotídicas heterólogas y/u homólogas que codifican i) una enzima que cataliza la conversión de fosfoenolpiruvato o piruvato en oxaloacetato; ii) una malato deshidrogenasa que cataliza la conversión de oxaloacetato en ácido málico; iii) una fumarasa reductasa, que cataliza la conversión de ácido fumárico en ácido succínico. Preferiblemente, las enzimas en i), ii) y iii) se expresan en el citosol. La expresión citosólica se puede lograr mediante supresión o modificación de una señal seleccionadora de dianas mitocondrial o peroxisómica, como se ha descrito aquí antes. Otras técnicas de ADN molecular como se describen aquí anteriormente, tales como la sobreexpresión y la optimización de codones, también son aplicables a estas secuencias nucleotídicas.

La levadura se puede transformar o modificar genéticamente con cualquier secuencia nucleotídica adecuada que cataliza la reacción de una molécula de C3 a C4 carbonos, tal como fosfoenolpiruvato (PEP, C3) a oxaloacetato (OAA, C4) y piruvato (C3) a OAA o ácido málico. Las enzimas adecuadas son PEP carboxinasa (EC 4.1.1.49, EC 4.1.1.38) y PEP carboxilada (EC 4.1.1.31), que catalizan la conversión de PEP a OAA; piruvato carboxilasa (EC 6.4.1.1), que cataliza la reacción de piruvato a OAA; o enzima málica (EC 1.1.1.38), que cataliza la reacción de piruvato a ácido málico.

Preferiblemente, la actividad de fumarasa endógena en la levadura según la presente invención se reduce, por ejemplo, mediante supresión, interrupción o mutación del gen que codifica la fumarasa endógena de la levadura.

En otra realización preferida, la célula según la presente invención comprende además una malato deshidrogenasa (MDH) homóloga o heteróloga. Preferiblemente, la actividad de malato deshidrogenasa está incrementada por la sobreexpresión mediante métodos conocidos en la técnica como se describe aquí. Preferiblemente, la MDH es expresada en el citosol, por ejemplo como se describe en el documento WO 2007/061590.

Preferiblemente, la levadura según la presente invención es una levadura en la que al menos un gen que codifica alcohol deshidrogenasa no es funcional. Una alcohol deshidrogenasa que no es funcional se usa aquí para describir una levadura, en la que un gen que codifica alcohol deshidrogenasa está inactivado por mutación, interrupción, o supresión, por ejemplo mediante el método descrito por Gueldener et al., 2002, Nucleic Acids Research, Vol. 30, nº 6, e23. Preferiblemente, la levadura es una *Saccharomyces cerevisiae*, en la que uno o más genes *adh1* y/o *adh2*, que codifican alcohol deshidrogenasa, están inactivados.

Preferiblemente, la levadura según la presente invención comprende además al menos un gen que codifica glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, que no es funcional. Una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa que no es funcional se usa aquí para describir una célula de levadura, en la que un gen que codifica glicerol-3-fosfato deshidrogenasa es inactivado por mutación, interrupción, o supresión, dando como resultado una formación reducida de glicerol en comparación con la levadura de tipo salvaje.

En una realización preferida, la levadura 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, tal como ácido fumárico y/o ácido succínico. La levadura 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, una célula de levadura preferida 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 hemicelulosa en monómeros de xilosa y arabinosa, pectinasas capaces de convertir pectinas en ácido glucurónico y ácido galacturónico, o amilasas para convertir el almidón en monómeros de glucosa. La capacidad de una levadura para expresar tales enzimas puede estar presente de forma natural, o se puede haber obtenido mediante modificación genética de la levadura. Preferiblemente, la levadura es capaz de convertir una fuente de carbono seleccionada del grupo que consiste en glucosa, fructosa, galactosa, xilosa, arabinosa, sacarosa, lactosa, rafinosa y glicerol.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un ácido dicarboxílico, seleccionado de ácido fumárico y ácido succínico, que comprende fermentar la levadura de acuerdo con la presente invención en presencia de un medio de fermentación adecuado. Los medios de fermentación adecuados son

conocidos por el experto en la técnica. Preferiblemente, el ácido carboxílico producido en el procedimiento según la presente invención es ácido succínico.

5 Se encontró ventajoso utilizar una levadura según la invención en el procedimiento para la producción de un ácido dicarboxílico, seleccionado de ácido fumárico y ácido succínico, ya que se produjo una mayor cantidad de ácido succínico y/o ácido fumárico en comparación con una levadura de tipo salvaje. Preferiblemente, una levadura según la presente invención produce al menos 1,1, preferiblemente al menos 1,2, 1,3, 1,4, 1,5 o al menos 2 veces más ácido succínico y/o ácido fumárico en comparación con una levadura de tipo salvaje.

10 El procedimiento de acuerdo con la presente invención puede llevarse a cabo en condiciones aerobias y anaerobias. Preferiblemente, el procedimiento se lleva a cabo en condiciones anaerobias o en condiciones micro-aerófilas o limitadas en oxígeno. Un procedimiento de fermentación anaerobio se define aquí como un procedimiento 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 el que las moléculas orgánicas sirven tanto como donantes de electrones como aceptores de electrones.

15 Un procedimiento de fermentación limitado en oxígeno es un procedimiento 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 usado. Preferiblemente, en un procedimiento en condiciones limitadas en oxígeno, la tasa de consumo de oxígeno es al menos o alrededor de 5,5, lo más preferiblemente al menos o alrededor de 6, e incluso más preferiblemente al menos o alrededor de 7 mmol/l/h.

20 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. Además, puesto que el pH cae durante la producción de ácido fumárico y/o ácido succínico, se necesita una menor cantidad de valorante para mantener el pH en un nivel deseado.

25 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 qué temperaturas óptimas son las adecuadas para fermentar una célula de levadura específica.

30 Preferiblemente, el ácido dicarboxílico, tal como ácido fumárico y ácido succínico, se recupera del caldo de fermentación por un método adecuado conocido en la técnica, por ejemplo mediante cristalización o precipitación con amonio.

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

45 *Modificaciones genéticas*

Técnicas genéticas convencionales tales como la sobreexpresión de enzimas en 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., eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987). Los métodos para la transformación, la 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.

55 Descripción de las figuras

Figura 1: Mapa del plásmido de pGBS415SUS-01, que codifica fumarasa procedente de *Rhizopus oryzae* para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. CPO designa el par de codones optimizado.

60 Figura 2: Mapa del plásmido de pGBS416FUM-1, que codifica fumarasa procedente de *Rhizopus oryzae* para la expresión en *Sacharomyces cerevisiae*. CPO indica par de codones optimizado.

Los ejemplos siguientes son sólo para fines ilustrativos.

EJEMPLOS

5 Ejemplo 1

Clonación de fumarasa procedente de *Rhizopus oryzae* en *Sacharomyces cerevisiae* usando como vehículo de clonación *E. coli* DH10B

10 1.1. Constructos de expresión

La fumarasa [E.C. 4.2.1.2], número de acceso de GenBank 469103, procedente de *Rhizopus oryzae* se analizó para determinar la presencia de secuencias señal usando 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 seleccionadora de dianas mitocondrial putativa en los primeros 23 aminoácidos de la proteína. Para evitar una selección potencial de mitocondrias como dianas en *S. cerevisiae*, se eliminaron los primeros 23 aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 2 corresponde a la secuencia nucleotídica), y se reintrodujo un aminoácido metionina, lo que dio como resultado SEQ ID NO: 3. La SEQ ID NO: 3 se sometió al método del par de codones como se describe en el documento PCT/EP2007/05594 para *S. cerevisiae*. La secuencia resultante SEQ ID NO: 4 se puso detrás de la secuencia del promotor TDH1 constitutivo SEQ ID NO: 5 y delante de la secuencia del terminador TDH1 SEQ ID NO: 6, y se añadieron sitios de restricción convenientes. El codón de terminación en SEQ ID NO: 4 se modificó en TAAG. La secuencia resultante se sintetizó en Sloning (Puchheim, Alemania). El constructo de expresión pGBS415SUS-01 se creó después de una restricción con *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 el constructo del gen sintético de fumarasa (origen *Rhizopus oryzae*) (Figura 1). La mezcla de ligamiento se usa para la transformación de DH10B de *E. coli* (Invitrogen), dando como resultado el constructo de expresión pGBS415SUS-01 de levaduras (Figura 1).

El constructo pGBS415SUS-01 se transforma 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 matraces oscilantes en condiciones aerobias, anaerobias y limitadas en oxígeno. 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 levadura 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 para determinar la formación de ácido oxálico, ácido málico, ácido fumárico y ácido succínico como se describe más abajo.

45 1.2 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 usando mecanismos de fase inversa. La detección tiene lugar mediante el índice de refracción diferencial y detectores ultravioleta.

Ejemplo 2

Clonación de fumarasa procedente de *Rhizopus oryzae* en *Sacharomyces cerevisiae*

55 2.1. Constructos de expresión

Fumarasa procedente de *Rhizopus oryzae* (SEQ ID NO: 4) se ligó en el vector de expresión pRS416 de *S. cerevisiae* (Sirkoski R.S. y Hieter P, Genetics, 1989, 122(1):19-27) de manera similar a como se describe en el Ejemplo 1.1. La mezcla de ligamiento se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli* (Invitrogen), dando como resultado el constructo de expresión en levaduras pGBS416FUM-1 (Figura 2).

2.2. Experimentos de transformación y de crecimiento en placas de microtitulación (MTPs)

El constructo pGBS416FUM-1 se transformó 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% (Verduyn et al., 1992, *Yeast*. Jul; 8(7):501-17) en MTPs de 96 pocillos profundos, y se pre-cultivaron a 30°C, 550 rpm, y una humedad de 80% en una incubadora oscilante Infors Microplate: 12 transformantes pGBS416FUM-1 (FUMR), y 24 de vector vacío pRS416 de control. Después de 3 días, 25 microlitros del precultivo presente en los pocillos de las MTPs se transfirieron a nuevas MTPs de 96 pocillos profundos que contenían medio de Verduyn que contiene glucosa y CaCO₃ (concentraciones finales: glucosa 10%, CaCO₃ 1% p/v en un volumen total de 250 microlitros). Después de 3 días y 7 días de crecimiento a 30°C, 550 rpm, y una humedad de 80% en una incubadora oscilante Infors Microplate, las MTPs se centrifugaron durante 2 minutos a 2000 rpm, se recogieron 200 microlitos de sobrenadante usando el dispositivo Multimek 96 (Beckman), y el sobrenadante se analizó mediante HPLC como se describe en el Ejemplo 1.2 para determinar la presencia de ácido succínico. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Efecto de la inserción de fumarasa procedente de *Rhizopus oryzae* (FumR) en la cepa CEN.PK113-5D de *S. cerevisiae* sobre los niveles de producción de ácido succínico después de 3 y 7 días de cultivo.

CEN.PK 113-5D transformada con el vector:	Ácido succínico (mg/l) después de 3 días	Ácido succínico (mg/l) después de 7 días
pRS416	138±18 (n=48)	203±48 (n=48)
pGBS416FUM-1	156±10 (n=24)	317±59 (n=24)

Los resultados en la Tabla 1 demuestran que la introducción y la sobreexpresión de fumarasa procedente de *Rhizopus oryzae* dio como resultado un incremento significativo de 1,13 veces de los niveles de producción de ácido succínico ($p=4,71E-7$, prueba de la t de Student) después de 3 días de incubación. Después de 7 días de incubación, la introducción y la sobreexpresión de fumarasa procedente de *Rhizopus oryzae* dio como resultado un incremento significativo de 1,56 veces de los niveles de producción de ácido succínico ($p=4,49E-10$, prueba de la t de Student).

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> DSM IP Assets BV
 - Verwaal, René
 - Wu, Liang
- 5 Sagt, Cornelis Maria Jacobus
 - Damveld, Robbertus Antonius
- <120> Producción de ácido dicarboxílico en levadura recombinante
- <130> 26346
- <140> 26346WO
- 10 <141> 2008-11-14
- <160> 6
- <170> PatentIn version 3.2
- <210> 1
- <211> 494
- 15 <212> PRT
- <213> Rhizopus oryzae
- <400> 1

```

Met Leu Arg Ala Ser Ala Thr Arg Phe Leu Ser Gln Ala Lys Asn Met
 1                               5                               10                               15

Asn Asn Ser Pro Arg Leu Phe Ser Ser Ala Ser Ala Ala Leu Gln Lys
 20                               25                               30

Phe Arg Ala Glu Arg Asp Thr Phe Gly Asp Leu Gln Val Pro Ala Asp
 35                               40                               45

Arg Tyr Trp Gly Ala Gln Thr Gln Arg Ser Leu Gln Asn Phe Asp Ile
 50                               55                               60

Gly Gly Pro Thr Glu Arg Met Pro Glu Pro Leu Ile Arg Ala Phe Gly
 65                               70                               75                               80

Val Leu Lys Lys Ala Ala Ala Thr Val Asn Met Thr Tyr Gly Leu Asp
 85                               90                               95

Pro Lys Val Gly Glu Ala Ile Gln Lys Ala Ala Asp Glu Val Ile Asp
 100                              105                              110

Gly Ser Leu Ile Asp His Phe Pro Leu Val Val Trp Gln Thr Gly Ser
 115                              120                              125
    
```

ES 2 389 989 T3

Gly Thr Gln Thr Lys Met Asn Val Asn Glu Val Ile Ser Asn Arg Ala
 130 135 140

Ile Glu Leu Leu Gly Gly Glu Leu Gly Ser Lys Ala Pro Val His Pro
 145 150 155 160

Asn Asp His Val Asn Met Ser Gln Ser Ser Asn Asp Thr Phe Pro Thr
 165 170 175

Ala Met His Val Ala Ala Val Val Glu Ile His Gly Arg Leu Ile Pro
 180 185 190

Ala Leu Thr Thr Leu Arg Asp Ala Leu Gln Ala Lys Ser Ala Glu Phe
 195 200 205

Glu His Ile Ile Lys Ile Gly Arg Thr His Leu Gln Asp Ala Thr Pro
 210 215 220

Leu Thr Leu Gly Gln Glu Phe Ser Gly Tyr Thr Gln Gln Leu Thr Tyr
 225 230 235 240

Gly Ile Ala Arg Val Gln Gly Thr Leu Glu Arg Leu Tyr Asn Leu Ala
 245 250 255

Gln Gly Gly Thr Ala Val Gly Thr Gly Leu Asn Thr Arg Lys Gly Phe
 260 265 270

Asp Ala Lys Val Ala Glu Ala Ile Ala Ser Ile Thr Gly Leu Pro Phe
 275 280 285

Lys Thr Ala Pro Asn Lys Phe Glu Ala Leu Ala Ala His Asp Ala Leu
 290 295 300

Val Glu Ala His Gly Ala Leu Asn Thr Val Ala Cys Ser Leu Met Lys
 305 310 315 320

Ile Ala Asn Asp Ile Arg Tyr Leu Gly Ser Gly Pro Arg Cys Gly Leu
 325 330 335

Gly Glu Leu Ser Leu Pro Glu Asn Glu Pro Gly Ser Ser Ile Met Pro
 340 345 350

ES 2 389 989 T3

Gly Lys Val Asn Pro Thr Gln Cys Glu Ala Met Thr Met Val Cys Ala
 355 360 365

Gln Val Met Gly Asn Asn Thr Ala Ile Ser Val Ala Gly Ser Asn Gly
 370 375 380

Gln Phe Glu Leu Asn Val Phe Lys Pro Val Met Ile Lys Asn Leu Ile
 385 390 395 400

Gln Ser Ile Arg Leu Ile Ser Asp Ala Ser Ile Ser Phe Thr Lys Asn
 405 410 415

Cys Val Val Gly Ile Glu Ala Asn Glu Lys Lys Ile Ser Ser Ile Met
 420 425 430

Asn Glu Ser Leu Met Leu Val Thr Ala Leu Asn Pro His Ile Gly Tyr
 435 440 445

Asp Lys Ala Ala Lys Cys Ala Lys Lys Ala His Lys Glu Gly Thr Thr
 450 455 460

Leu Lys Glu Ala Ala Leu Ser Leu Gly Tyr Leu Thr Ser Glu Glu Phe
 465 470 475 480

Asp Gln Trp Val Arg Pro Glu Asp Met Ile Ser Ala Lys Asp
 485 490

<210> 2

<211> 1419

<212> ADN

5 <213> Rhizopus oryzae

<400> 2

```

atgagtagtg cctctgctgc tttgcaaaaa ttccgtgctg agcgcgatac ttttggtgat      60
ctccaagttc ctgctgatag atattggggg gctcaaacc aaaggtctct tcaaaatddd      120
gacattggtg gccctactga acgtatgccc gaacctttga tccgtgcctt tgytgcctc      180
aaaaaggctg ctgctactgt caacatgact tatggcttgg atcctaaagt tggatgaagct      240
attcaaaagg ctgctgacga ggatcattgat ggaagcttga ttgatcattt ccctcttggt      300
gtctggcaaa ctggttccgg tactcaaacc aagatgaacg ttaacgaagt tatctccaac      360
cgtgctattg aacttttggg tggtaggctt ggtagtaagg ctctgttca tccaacgat      420
catgtcaaca tgagtcaatc atccaatgac acgttccta ctgccatgca cgttgctgct      480
    
```

ES 2 389 989 T3

gttggtgaaa ttcacggctcg acttattcct gctttgacca ctttgcgtga tgccttcaa 540
 gccaaatccg ctgagtttga acacatcacc aagatcggtc gtactcaett gcaagatgca 600
 actcctttga ctctcgggtca agaattctct ggttatactc aacaattgac ttacggattt 660
 gctcgtgtac aaggtacctt ggagcgcctc tataaccttg ctcaagggtg tactgctgtt 720
 ggtactggtc ttaacaccag aaaaggtttc gatgcccaagg tagctgaagc tattgcttct 780
 attacgggtc ttcctttcaa gaccgcccct aataagtttg aagccttgc tgctcacgat 840
 gctctcgttg aagctcacgg agctctcaat accgttgctt gttctcttat gaagatgcc 900
 aacgatatcc gttatcttgg ttctggacct cgctgtggtc ttggtgaact ttccttgcct 960
 gaaaacgaac ccggatcttc tatcatgccc ggtaagggtta atcctactca atgtgaagct 1020
 atgaccatgg tctgtgctca agtcatgggt aacaacactg ctatttctgt tgctggttcc 1080
 aatgggtcaat tgcgacttaa tgtcttcaaa ccogtcatga tcaagaactt gatccaatcc 1140
 attcgtctta tttctgatgc ctctatttca ttcaccaaaa actgtgttgt tggattgaa 1200
 gccaatgaaa agaagattag cagcattatg aatgagtcac tgatgttggc cactgctctt 1260
 aaccctcata ttggttacga taaagctgct aaatgtgcc aagaaggcca caaggaaggc 1320
 accaccttga aggaagctgc cctttctctt ggttacttga cttctgaaga attcaccag 1380
 tgggttagac ccgaagatat gatctctgcc aaggattaa 1419

<210> 3

<211> 472

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fumarasa de R. oryzae menos la señal putativa seleccionadora de dianas

<400> 3

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

ES 2 389 989 T3

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	
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			

ES 2 389 989 T3

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

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> 4

<211> 1419

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> nt FumR menos el codón putativo seleccionador de dianas optimizado para S. cerevisae

<400> 4

ES 2 389 989 T3

```

atgtcctctg cttctgctgc tttgcaaaaa ttcagagctg aaagagatac cttcggtgac      60
ttgcaagttc cagctgaccg ttactggggg gctcaaactc aaagatcttt gcaaaacttt      120
gacattggtg gtccaactga aagaatgcca gaaccattaa tcagagcttt cggtgttttg      180
aagaaggctg ctgccaccgt caacatgacc tacggtttg acccaaaggt tggatgaagcc      240
atccaaaagg ctgctgacga agttatcgat ggttctttga ttgaccattt cccattgggt      300
gtctggcaaa cgggttctgg tactcaaacc aagatgaacg tcaatgaagt catctccaac      360
agagccattg aattggtggg tggatgaatta ggttccaagg ctccagtcca cccaacgat      420
catgtcaaca tgtctcaatc ttccaacgac actttcccaa ctgccatgca cgttgctgcc      480
gttggtgaaa ttcacggtag attgattcca gctttgacca ctttgagaga tgctttgcaa      540
gccaatctg ctgaattcga acacatcatc aagattggta gaaccactt gcaagatgct      600
acccattga ctttaggtca agaattctcc ggttacactc aacaattgac ctacggtatt      660
gctcgtgttc aaggactttt ggaaagatta tacaacttgg ctcaaggagg tactgctgtc      720
ggtactgggt tgaacaccag aaagggtttc gatgccaagg ttgctgaagc cattgcttcc      780
atcactgggt taccattcaa gaccgctcca aacaaattcg aagctttggc tgctcacgac      840
gctttgggtg aagctcacgg tgctttgaac accggtgctt gttctttgat gaagattgcc      900
aacgatatcc gttacttggg ttctgggtcca agatgtgggt taggtgaatt gtctctacca      960
gaaaacgaac caggttcttc catcatgcca ggtaagggtc acccaactca atgtgaagct     1020
atgaccatgg tttgtgctca agtcatgggt aacaacactg ccatctctgt tgctgggtcc     1080
aacgggtcaat tcgaattgaa tgtctttaaa ccagtcatga tcaagaactt gatccaatcc     1140
atcagattaa tctctgacgc ttccatctct ttcaccaaga actgtgttgt cggattgaa     1200
gctaacgaaa agaagatctc ctccatcatg aacgaatctt tgatgttggt cactgctttg     1260
aacctcaca ttggttacga caaggctgcc aagtgtgcca agaaggctca caaggaaggt     1320
accactttga aagaagctgc tctatctttg ggttacttga cctctgaaga attcgaccaa     1380
tgggttagac ctgaggacat gatttctgcc aaggattaa                                1419

```

<210> 5

<211> 1000

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Promotor TDH1

<400> 5

ES 2 389 989 T3

cttccctttt acagtgcttc ggaaaagcac agcgttgtcc aagggaaaca tttttcttca 60
 agttaatgca taagaaatat ctttttttat gtttagctaa gtaaaagcag cttggagtaa 120
 aaaaaaaaaat gagtaaattt ctcgatggat tagttttctca caggtaacat acaaaaaacc 180
 aagaaaagcc cgcttctgaa aactacagtt gacttgtatg ctaaagggcc agactaatgg 240
 gaggagaaaa agaaacgaat gtatatgctc atttacctc tatatcacca tatggaggat 300
 aagttgggct gagcttctga tccaatttat tctatccatt agttgctgat atgtcccacc 360
 agccaacact tgatagtatc tactcgccat tcacttccag cagcgccagt agggttggtg 420
 agcttagtaa aatgtgctc accacaagcc tacatgactc cacgtccat gaaaccacac 480
 cgtggggcct tgttgcgcta ggaataggat atgcgacgaa gacgcttctg cttagtaacc 540
 acaccacatt ttcagggggt cgatctgctt gcttcoctta ctgtcacgag cggcccataa 600
 tcgcgctttt tttttaaag gcgagagaca gcaaacagga agctcggggt tcaaccttcg 660
 gagtggctgc agatctggag actggatctt tacaatacag taaggcaagc caccatctgc 720
 ttcttaggtg catgcgacgg tatccacgtg cagaacaaca tagtctgaag aaggggggga 780
 ggagcatggt cattctctgt agcagtaaga gcttgggtgat aatgaccaa actggagtct 840
 cgaaatcata taaatagaca atatattttc acacaatgag atttgtagta cagttctatt 900
 ctctctcttg cataaataag aaattcatca agaacttggg ttgatatttc accaacacac 960
 acaaaaaaca gtacttcact aaatttacac acaaaaacaaa 1000

<210> 6

<211> 500

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Terminador TDH1

<400> 6

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

ES 2 389 989 T3

tgcaaaacgc acataccac aatatgtgac tattggcaaa gaacgcatta tcctttgaag	360
aggtggatac tgatactaag agagtctcta ttccggctcc acttttagtc cagagattac	420
ttgtcttctt acgtatcaga acaagaaagc atttccaaag taattgcatt tgccttgag	480
cagtatatat atactaagaa	500

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una levadura recombinante que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una enzima heteróloga que cataliza la conversión de ácido málico a ácido fumárico, en la que la enzima tiene una identidad de al menos el 70% con SEQ ID NO: 3, en la que la enzima es activa en el citosol con la expresión de la secuencia nucleotídica.
2. Una levadura de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la enzima deriva de *Rhizopus oryzae*.
- 10 3. Una levadura de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que la enzima es una fumarasa.
4. Una levadura de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que pertenece a uno de los géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, o *Zygosaccharomyces*.
- 15 5. Una levadura de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es una *Saccharomyces cerevisiae* que comprende SEQ ID NO: 4.
6. Un procedimiento para la producción de ácido succínico, que comprende fermentar una levadura de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en un medio de fermentación adecuado, en el que se produce el ácido succínico.

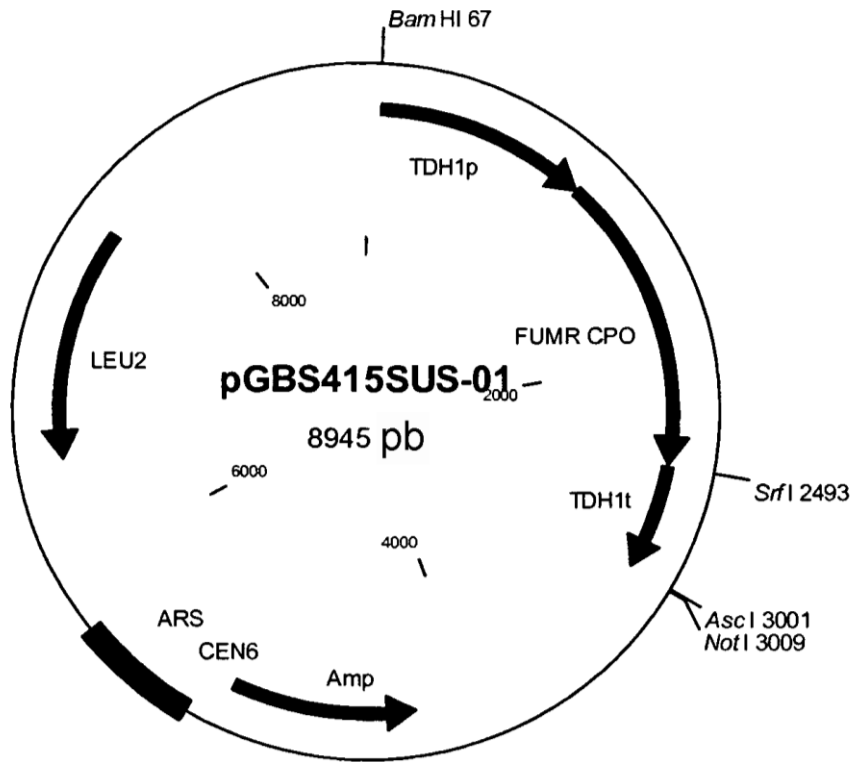


Figura 1

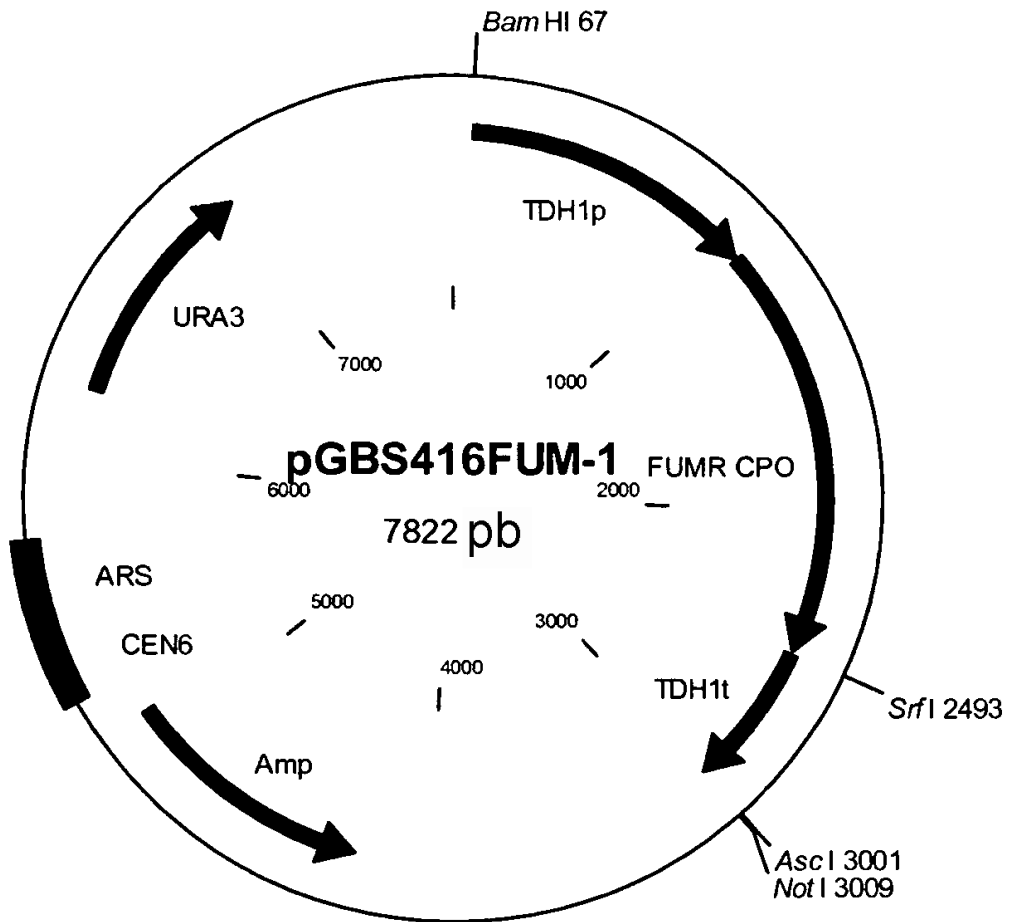


Figura 2