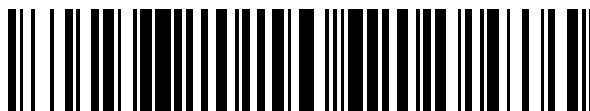


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 522 622**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/53** (2006.01)

**C12N 9/02** (2006.01)

**C12P 7/46** (2006.01)

**C12N 1/15** (2006.01)

**C12N 1/19** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2008 E 08851178 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 2220232**

54 Título: **Producción de ácido succínico en una célula eucariota**

30 Prioridad:

**20.11.2007 EP 07121117**

**20.11.2007 EP 07121120**

**20.11.2007 EP 07121113**

**27.05.2008 EP 08156961**

**27.05.2008 EP 08156960**

**27.05.2008 EP 08156959**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.11.2014**

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 2 522 622 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 succínico en una célula eucariota

5 La presente invención se refiere a una célula eucariota recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una fumarato reductasa, y a un procedimiento para la producción de ácido succínico en el que se usa la célula eucariota recombinante.

10 El ácido succínico es un precursor potencial para numerosas sustancias químicas. 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 son 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 una materia prima renovable como fuente de carbono.

20 Se conoce 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 EP1.672.077, por ejemplo, describe una *Brevibacterium flavum* genéticamente modificada con fumarato reductasa procedente de *Escherichia coli*, que incrementó el rendimiento de ácido succínico.

30 El documento WO 2007/061590 describe una levadura negativa a piruvato descarboxilasa 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 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 un microorganismo alternativo para la producción de ácido succínico.

40 El objetivo se logra según la invención con una célula eucariota recombinante seleccionada del grupo que consiste en una levadura y un hongo filamentoso que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica fumarato reductasa dependiente de NAD(H) que cataliza la conversión de ácido fumárico en ácido succínico.

45 Sorprendentemente, se encontró que una célula eucariota recombinante según la presente invención produce una cantidad incrementada de ácido succínico en comparación con la cantidad de ácido succínico producido por una célula eucariota de tipo salvaje. Preferiblemente, una célula eucariota según la presente invención produce al menos 1,2, preferiblemente al menos 1,5, preferiblemente al menos 2 veces más de ácido succínico que una célula eucariota de tipo salvaje que no comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la fumarato reductasa dependiente de NAD(H).

50 Como se usa aquí, una célula eucariota recombinante según la presente invención se define como una célula que contiene, o es transformada o modificada genéticamente con una secuencia de nucleótidos o polipéptido que no se produce de forma natural en la célula eucariota, o contiene una copia o copias adicionales de una secuencia de ácido nucleico endógena. Una célula eucariota de tipo salvaje se define aquí como la célula progenitora de la célula recombinante.

55 La secuencia de nucleótidos que codifica una fumarato reductasa dependiente de NAD(H) que cataliza la conversión de ácido fumárico en ácido succínico puede ser una secuencia de nucleótidos heteróloga u homóloga, o codifica una fumarato reductasa dependiente de NAD(H) heteróloga u homóloga, que puede haber sido modificada genéticamente además por mutación, interrupción o supresión. Las técnicas de ADN recombinante son bien conocidas en la técnica, tal como en Sambrook y Russel (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory Press".

60 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 una célula hospedante u organismos de la misma especie, preferiblemente de la misma variedad o cepa.

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 secuencia de ADN o ARN que difieren de la que se encuentra en la naturaleza. Ácidos nucleicos o proteínas heterólogos no son endógenos a la célula en la que se introducen, sino que se han obtenido a partir de otra célula o se han producido por vía sintética o recombinante.

Una fumarato reductasa dependiente de NAD(H) según la presente invención usa NAD(H) como cofactor, mientras que la mayoría de las células eucariotas comprenden una fumarato reductasa dependiente de FADH<sub>2</sub>, en la que FADH<sub>2</sub> es el cofactor. Se encontró ventajoso que la célula eucariota comprenda una secuencia de nucleótidos que codifique una fumarato reductasa dependiente de NAD(H), puesto que la fumarato reductasa dependiente de NAD(H) proporciona a la célula más opciones para oxidar NAD(H) a NAD<sup>+</sup> e influir en el balance redox en la célula.

Preferiblemente, la célula expresa una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima y cataliza la formación de ácido succínico, en la que la secuencia de nucleótidos codifica preferiblemente una fumarato reductasa dependiente de NAD(H), que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 40%, preferiblemente al menos 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1, y/o SEC ID NO: 3, y/o SEC ID NO: 4, y/o SEC ID NO: 6. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos codifica una fumarato reductasa dependiente de NAD(H) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1, y/o SEC ID NO: 3, y/o SEC ID NO: 4, y/o SEC ID NO: 6.

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 identidades o similitudes de 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 las secuencias entre secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos, según sea el caso, según se determina mediante el apareamiento entre hebras de tales secuencias.

Se diseñan métodos preferidos para determinar la identidad, para dar el mayor apareamiento entre las secuencias ensayadas. Métodos para determinar la identidad y similitud son codificados en programas de ordenador públicamente disponibles. Métodos de programas 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.gov Bethesda, MD 20894). Parámetros preferidos para la comparación de secuencias de aminoácidos usando BLASTP son abertura de salto 11,0, extensión del salto 1, matriz Blosum 62.

Las secuencias de nucleótidos que codifican las enzimas expresadas en la célula de la invención también se pueden definir por su capacidad de hibridarse con las secuencias de nucleótidos que codifican una fumarato reductasa dependiente de NAD(H) de SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, y/o SEC ID NO: 6, 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 preferiblemente de alrededor de 200 o más nucleótidos, se hibride a una temperatura de alrededor de 65°C en una disolución que comprende una sal de alrededor de 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 alrededor de 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 que tienen una identidad de secuencia de alrededor de 90% o más.

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 equiparable, 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 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 que tienen 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 identidad entre 50% y 90%.

5 Para aumentar la probabilidad de que una enzima o enzimas introducidas se expresen en forma activa en una célula eucariota de la invención, se puede adaptar la secuencia de nucleótidos codificante correspondiente para optimizar su uso de codones con el de la célula hospedante eucariota 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 al de la célula eucariota 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 de nucleótidos 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 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 codificante.

15 El término "gen", como se usa 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.

20 La expresión "ácido nucleico", como se usa aquí, incluye la referencia a un polímero de desoxirribonucleótido o ribonucleótido, 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 a que se hibridan a ácidos nucleicos monocatenarios de una manera similar a nucleótidos de origen natural (por ejemplo 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, la expresión incluye la referencia a la secuencia específica, así como a la secuencia complementaria de la misma.

30 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan aquí de forma indistinta para referirse 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 de origen natural, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural. La naturaleza esencial de tales análogos de aminoácidos de origen natural es que, cuando se incorporan en una proteína, esa proteína es específicamente reactiva frente a anticuerpos inducidos frente a la misma proteína, pero que consisten enteramente en aminoácidos de origen natural. Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteínas" incluyen también modificaciones que incluyen, pero no se limitan a, glicosilación, fijación de lípidos, sulfatación, gamma-carboxilación de restos de ácido glutámico, hidroxilación, y ADP-ribosilación.

40 El término "enzima", como se usa aquí, se define como una proteína que cataliza una reacción (bio)química en una célula.

Habitualmente, la secuencia de nucleótidos que codifica una enzima está enlazada operablemente a un promotor que provoca una expresión suficiente de la secuencia de nucleótidos correspondiente en la célula eucariota de acuerdo con la presente invención, con el fin de conferir a la célula la capacidad de producir ácido succínico.

45 Como se usa aquí, la expresión "operablemente enlazada" se refiere a un enlace de elementos polinucleotídicos (o secuencias codificantes o secuencia de ácido nucleico) 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.

50 Como se usa 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 iniciación de la transcripción del gen, y está estructuralmente identificado por la presencia de un sitio de unión para la 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 bajo la mayoría de las condiciones medioambientales y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que es activo bajo la regulación medioambiental o de desarrollo.

60 Un promotor que se podría usar para lograr la expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima, tal como fumarato reductasa dependiente de NAD(H) o cualquier otra enzima introducida en la célula eucariota de la invención, 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 codificante) a la que está operablemente enlazado. Preferiblemente, el promotor es homólogo, es decir, endógeno a la célula hospedante.

5 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. Promotores adecuados en células hospedantes 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 y TEF1, y TDH.

10 Habitualmente, una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima comprende un terminador. En la presente invención se puede usar cualquier terminador que sea funcional en la célula. 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 decaimiento del ARNm mediado por codones sin sentido en la célula hospedante de la invención (véase, por  
15 ejemplo: Shirley et al., 2002, Genetics 161: 1465-1482).

En una realización preferida, una secuencia de nucleótidos que codifica una fumarato reductasa dependiente de NAD(H) se puede sobreexpresar para lograr una producción suficiente de ácido succínico por la célula.

20 Hay diversos medios disponibles en la técnica para la sobreexpresión de secuencias de nucleótidos que codifican enzimas en una célula eucariota de la invención. En particular, una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima se puede sobreexpresar aumentando el número de copias del gen que codifica la enzima en la célula, por ejemplo 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  
25 expresión (episomal) que comprende múltiples copias del gene. Preferiblemente, la sobreexpresión de la enzima según la invención se logra con un promotor constitutivo (fuerte).

La invención también se refiere a un constructo de nucleótidos que comprende una o más secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9 y SEC ID NO:  
30 10.

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 célula eucariota según la presente invención puede comprender una sola copia, pero preferiblemente comprende múltiples copias de la secuencia de nucleótidos que codifica fumarato reductasa dependiente de NAD(H), por ejemplo mediante múltiples copias de un constructo de nucleótidos.  
35

El constructo de ácido nucleico se puede mantener episomalmente y, de este modo, comprende una secuencia para la replicación autónoma, tal como una secuencia de replicación autosomal. Si la célula eucariota es de origen fúngico, un constructo de ácido nucleico episomal adecuado se puede basar, por ejemplo, en los plásmidos 2 $\mu$  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 se puede integrar en una o más copias en el genoma de la célula eucariota. La integración en el genoma de la célula se puede producir aleatoriamente mediante recombinación no homóloga pero, preferiblemente, el constructo de ácido nucleico se puede integrar en el genoma de la célula mediante recombinación homóloga, como es bien conocido en la técnica.  
40

La secuencia de nucleótidos que codifica una fumarato reductasa dependiente de NAD(H) puede ser una secuencia de nucleótidos heteróloga u homóloga. Preferiblemente, la fumarato reductasa dependiente de NADH es una enzima heteróloga, que puede obtenerse de cualquier origen adecuado, por ejemplo bacterias, hongos, protozoos o plantas. Preferiblemente, la célula según la invención comprende una fumarato reductasa dependiente de NAD(H) heteróloga, derivada preferiblemente de una *Trypanosoma* sp, por ejemplo una *Trypanosoma brucei*.  
45  
50

Sorprendentemente, la actividad citosólica de la enzima dio como resultado una mayor producción de ácido succínico por parte de la célula eucariota.

55 En el caso de que la secuencia de nucleótidos que codifica una fumarato reductasa dependiente de NAD(H) comprenda una señal de localización peroxisomal o mitocondrial, puede ser esencial modificar o suprimir un número de aminoácidos (y secuencias de nucleótidos correspondientes en la secuencia de nucleótidos codificante) a fin de evitar la localización peroxisomal o mitocondrial de la enzima. La presencia de una señal de localización peroxisomal se puede determinar, por ejemplo, mediante el método descrito por Schlüter et al, Nucleic acid Research 2007, 35, D815-D822.  
60

Preferiblemente, la fumarato reductasa dependiente de NAD(H) carece de una señal de localización peroxisomal o mitocondrial para la actividad citosólica de la enzima al expresar la secuencia de nucleótidos codificante.

Preferiblemente, la célula expresa una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima que cataliza la formación de ácido succínico, en la que la secuencia de nucleótidos codifica preferiblemente una fumarato reductasa dependiente de NAD(H), preferiblemente una fumarato reductasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 40%, preferiblemente al menos 45, 50, 55, 60, 65 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 3, y/o SEC ID NO: 6. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos codifica una fumarato reductasa dependiente de NAD(H) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 3, y/o SEC ID NO: 6.

La célula eucariota, seleccionada del grupo que consiste en una levadura y un hongo filamentoso, pertenece preferiblemente a los géneros *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Yarrowia*, *Candida*, *Hansenula*, *Humicola*, *Rhizopus*, *Torulaspota*, *Trichosporon*, *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Pachysolen* o *Yamadazyma*. Mas preferiblemente, la célula eucariota es una *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces bayanus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Pichia stipidis*, *Kluyveromyces marxianus*, *K. lactis*, *K. thermotolerans*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida sonorensis*, *C. glabrata*, *Hansenula polymorpha*, *Torulaspota delbrueckii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Rhizopus oryzae* o *Zygosaccharomyces baillii*.

Además de una secuencia de nucleótidos que codifica una fumarato reductasa dependiente de NAD(H), que cataliza la conversión de ácido fumárico en ácido succínico, la célula eucariota recombinante de acuerdo con la presente invención puede comprender otras modificaciones genéticas, por ejemplo mutaciones, supresiones o interrupciones, en secuencias de nucleótidos homólogas, y/o la transformación con secuencias de nucleótidos que codifican enzimas homólogas o heterólogas que catalizan una reacción en la célula que da como resultado un flujo incrementado hacia el ácido succínico. Por ejemplo, puede ser favorable introducir, modificar genéticamente y/o sobreexpresar secuencias de nucleótidos heterólogas y/u homólogas que codifiquen i) una enzima que cataliza la conversión de fosfoenolpiruvato o piruvato en oxaloacetato; ii) una malato deshidrogenasa, que cataliza la conversión de OAA en ácido málico; iii) una fumarasa, que cataliza la conversión de ácido málico en ácido fumárico.

Una célula eucariota se puede transformar o se puede modificar genéticamente con cualquier secuencia de nucleótidos adecuada que catalice 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 (C3). Las enzimas adecuadas son PEP carboxinasa (EC 4.1.1.49, EC 4.1.1.38) y PEP carboxilasa (EC 4.1.1.31), que catalizan la conversión de PEP en OAA; piruvato carboxilasa (EC 6.4.1.1.), que cataliza la reacción de piruvato en OAA; o enzima málica (EC 1.1.1.38), que cataliza la reacción de piruvato a ácido málico.

Preferiblemente, una célula eucariota según la presente invención sobreexpresa una secuencia de nucleótidos que codifica una piruvato carboxilasa (PYC), preferiblemente una piruvato carboxilasa que es activa en el citosol con la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica una PYC, por ejemplo una PYC que comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEC ID NO: 41. Preferiblemente, se sobreexpresa una piruvato carboxilasa endógena u homóloga. Sorprendentemente, se encontró que la sobreexpresión de una piruvato carboxilasa endógena daba como resultado niveles de producción de ácido succínico incrementados por parte de la célula eucariota según la presente invención.

En otra realización preferida, una célula eucariota según la presente invención comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una PEP carboxinasa heteróloga (EC 4.1.1.49) que cataliza la reacción de fosfoenolpiruvato a oxaloacetato. Sorprendentemente, se encontró que una célula eucariota según la presente invención que comprende además una PEP carboxinasa heteróloga produjo una mayor cantidad de ácido succínico en comparación con una célula eucariota que no comprende la PEP carboxinasa heteróloga. Preferiblemente, una PEP carboxinasa que deriva de bacterias, más preferiblemente la enzima que tiene actividad de PEP carboxinasa, deriva de *Escherichia coli*, *Mannheimia sp.*, *Actinobacillus sp.*, o *Anaerobiospirillum sp.*, más preferiblemente *Mannheimia succiniciproducens*, *Actinobacillus succinogenes*, o *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. Preferiblemente, la PEP carboxinasa es activa en el citosol con la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica PEP carboxinasa, puesto que se encontró que esto dio como resultado una mayor producción de ácido succínico. En una realización, la PEP carboxinasa de *Actinobacillus succinogenes* (PCKa) se ha modificado para sustituir EGY en la posición 120-122 por una secuencia de aminoácidos DAF. Preferiblemente, una célula eucariota según la presente invención comprende una PEP carboxinasa que tiene al menos 80, 85, 90, 95 ó 99% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 14 o SEC ID NO: 17, preferiblemente una PEP carboxinasa que comprende SEC ID NO: 14 o SEC ID NO: 17. Sorprendentemente, se encontró que la (sobre)expresión concomitante de una PYC y una PEP carboxinasa como se describe aquí dio como resultado un incremento de al

menos 1,5 en la producción de ácido succínico.

En otra realización preferida, una célula según la presente invención comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una malato deshidrogenasa (MDH), que es activa en el citosol con la expresión de la secuencia de nucleótidos. Una MDH citosólica puede ser cualquier malato deshidrogenasa homóloga o heteróloga adecuada. La MDH puede ser una MDH3 de *S. cerevisiae* o MDH1 de *S. cerevisiae*. Preferiblemente, la MDH carece de una señal de localización peroxisomal o mitocondrial con el fin de localizar la enzima en el citosol. Como alternativa, 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 con 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 eucariota según la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una malato deshidrogenasa que tiene una identidad de secuencia de al menos 70%, preferiblemente al menos 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99% con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 19 o SEC ID NO: 21. Preferiblemente, la malato deshidrogenasa comprende SEC ID NO: 19 o SEC ID NO: 21. Preferiblemente, la actividad de malato deshidrogenasa se incrementa sobreexpresando la secuencia de nucleótidos codificante por métodos conocidos en la técnica.

Preferiblemente, una célula eucariota según 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, por ejemplo una fumarasa (FUM). Una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima heteróloga que cataliza la conversión de ácido málico en ácido fumárico puede proceder de cualquier origen adecuado, preferiblemente de origen microbiano, por ejemplo de una levadura, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, o de un hongo filamentoso, por ejemplo *Rhizopus oryzae*. Preferiblemente, una célula eucariota según la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una fumarasa que tiene una identidad de secuencia de al menos 70%, preferiblemente al menos 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 23. Preferiblemente, la fumarasa comprende SEC ID NO: 23. Preferiblemente, la enzima que tiene actividad de fumarasa es activa en el citosol con la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima que tiene actividad de fumarasa. Sorprendentemente, se encontró que una célula eucariota que comprende además una enzima que tiene actividad de fumarasa como se describe aquí produjo una mayor cantidad de ácido succínico.

En otra realización, una célula eucariota según la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína transportadora de ácido dicarboxílico, preferiblemente una proteína transportadora de ácido málico (MAE). Una proteína transportadora de ácido dicarboxílico puede ser una proteína homóloga o heteróloga. Preferiblemente, la proteína transportadora de ácido dicarboxílico es una proteína heteróloga. Una proteína transportadora de ácido dicarboxílico puede derivar de cualquier organismo adecuado, preferiblemente de *Schizosaccharomyces pombe*. Preferiblemente, una proteína transportadora de ácido dicarboxílico es una proteína transportadora de ácido málico (MAE) que tiene al menos 80, 85, 90, 95 ó 99% de identidad de secuencia con SEC ID NO: 36. Preferiblemente, la MAE comprende SEC ID NO: 36. Sorprendentemente, se encontró que una célula eucariota según la presente invención que comprende además un transportador de ácido dicarboxílico, tal como un transportador de ácido málico como se describe aquí, produjo una mayor cantidad de ácido succínico en comparación con una célula eucariota que no comprende una proteína transportadora de ácido dicarboxílico.

En una realización preferida, una célula eucariota según la presente invención es una levadura que comprende secuencia de nucleótidos que codifican una fumarato reductasa dependiente de NAD(H), una malato deshidrogenasa, una fumarasa heteróloga, una PEP carboxinasa heteróloga y un transportador de ácido dicarboxílico heterólogo, y sobreexpresa una piruvato carboxilasa (PYC), como se describe, incluyendo las realizaciones preferidas, aquí anteriormente. Sorprendentemente, se encontró que una levadura de la invención que comprende las secuencia de nucleótidos que codifican las enzimas como se describen aquí produjo una mayor cantidad de ácido succínico en comparación con una levadura que comprende cualquiera de las secuencia de nucleótidos solas.

En otra realización preferida, una célula eucariota según la presente invención comprende actividad reducida de enzimas que convierten NAD(H) en NAD<sup>+</sup>, en comparación con la actividad de estas enzimas en una célula de tipo salvaje.

Preferiblemente, la célula según la presente invención es una célula en la que al menos un gen que codifica alcohol deshidrogenasa no es funcional. Un gen de alcohol deshidrogenasa que no es funcional se usa aquí para describir una célula eucariota que comprende una actividad reducida de alcohol deshidrogenasa en comparación con una célula en la que 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 supresión, por ejemplo mediante el método descrito por Gueldener et al. 2002 Nucleic Acids Research, Vol. 30, Nº 6, e23. Preferiblemente, una célula eucariota es una célula de levadura tal como *Saccharomyces cerevisiae*, en la que uno o más genes *adh1* y/o *adh2*, que codifican alcohol deshidrogenasa, están inactivados.

5 Preferiblemente, la célula según la presente invención 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 usa aquí para describir una célula eucariota que comprende una actividad reducida de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, por ejemplo mediante mutación, interrupción o supresión del gen que codifica glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, dando como resultado una formación disminuida de glicerol en comparación con la célula de tipo salvaje. Sorprendentemente, se encontró que la célula eucariota que comprende actividad reducida de alcohol deshidrogenasa y/o actividad reducida de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y que comprende una fumarasa dependiente de NAD(H) dio como resultado una mayor producción de ácido succínico en comparación con una célula en la que no está activado uno o más genes que codifican alcohol deshidrogenasa y/o glicerol-3-fosfato deshidrogenasa.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para la producción de ácido succínico, que comprende fermentar una célula eucariota que comprende al menos un gen que codifica alcohol deshidrogenasa que no es funcional y/o al menos un gen que codifica glicerol-3-fosfato deshidrogenasa que no es funcional.

En otra realización preferida, la célula eucariota recombinante según la presente invención comprende al menos un gen que codifica succinato deshidrogenasa que no es funcional. Una succinato deshidrogenasa que no es funcional se usa aquí para describir una célula eucariota que comprende una actividad reducida de succinato deshidrogenasa mediante mutación, interrupción o supresión 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 eucariota que comprende un gen que codifica succinato deshidrogenasa, que no es funcional, puede ser, por ejemplo, *Aspergillus niger*, preferiblemente un *Aspergillus niger*, en la que uno o más genes que codifican succinato deshidrogenasa, tales como *sdhA* y *sdhB* no son funcionales, por ejemplo por supresión de estos genes.

Preferiblemente, una célula eucariota según la invención es una levadura, preferiblemente *Saccharomyces cerevisiae*, preferiblemente una *Saccharomyces cerevisiae* que comprende una o más de las secuencias de nucleótidos seleccionadas de SEC ID NO: 9 y SEC ID NO: 10. Una célula eucariota según la presente invención también puede ser un hongo filamentoso, preferiblemente *A. niger*, preferiblemente *A. niger* que comprende una o más secuencias de nucleótidos seleccionadas de SEC ID NO: 7 y SEC ID NO: 8.

Preferiblemente, una célula eucariota según la presente invención que comprende una cualquiera de las modificaciones genéticas descritas aquí 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 por debajo de 200 o por debajo de 150 g/l.

Una célula eucariota preferida según la presente invención puede ser capaz de crecer en cualquier fuente de carbono adecuada conocida en la técnica y convertirla en ácido succínico. La célula eucariota 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. Por tanto, un organismo hospedante preferido expresa enzimas tales como celulasas (endocelulasas y exocelulasas) y hemicelulasas (por ejemplo endo- y exo-xilanasas, arabinasas) necesarias para la conversión de celulosa en monómeros de glucosa y de 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. Preferiblemente, la célula es capaz de convertir una fuente de carbono seleccionada del grupo que consiste en glucosa, fructosa, galactosa, xilosa, arabinosa, sacarosa, rafinosa, lactosa y glicerol.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de ácido succínico, que comprende fermentar la célula eucariota según la presente invención, en la que se prepara ácido succínico.

Se encontró ventajoso usar una célula eucariota según la invención en el procedimiento para la producción de ácido succínico, debido a que la mayoría de las células eucariotas no requieren condiciones estériles para la propagación y son insensibles a las infecciones por bacteriófagos.

Preferiblemente, el ácido succínico que se prepara en el procedimiento según la presente invención se convierte



ulteriormente en un producto deseable. Un producto deseable puede ser por ejemplo un polímero, tal como ácido polibutilensuccínico (PBS), un agente descongelante, o un tensioactivo.

5 El procedimiento según la presente invención puede realizarse 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 proceso de fermentación anaerobio se define aquí como un proceso de fermentación realizado en ausencia de oxígeno, o en el que no se consume sustancialmente 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.

10 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 usado. Preferiblemente, en un proceso en condiciones limitadas en oxígeno, la tasa de consumo de oxígeno es al menos 5,5, más preferiblemente al menos 6, e incluso más preferiblemente al menos 7 mmoles/l/h.

15 El procedimiento para la producción de ácido succínico según la presente invención se puede llevar a cabo a cualquier pH adecuado entre 1 y 9. Preferiblemente, el pH en el caldo de fermentación está entre 2 y 7, preferiblemente entre 3 y 5. Se encontró ventajoso poder llevar a cabo el procedimiento según 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 succínico, se necesita menor cantidad de agente de valoración para mantener el pH a un nivel deseado.

25 Una temperatura adecuada a la que se puede llevar a cabo el procedimiento según la presente invención oscila entre 5 y 60°C, preferiblemente entre 10 y 50°C, más preferiblemente entre 15 y 35°C, más preferiblemente entre 18°C y 30°C. El experto en la técnica conoce qué temperaturas óptimas son adecuadas para fermentar una célula eucariota específica.

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

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

40 La presente invención también se refiere a un caldo de fermentación que comprende un ácido succínico, en el que el caldo de fermentación se puede obtener mediante un procedimiento según la presente invención.

45 La invención se refiere a un procedimiento para la producción de ácido succínico por una levadura o un hongo filamentosos como productor de ácido succínico, con lo que se usa fumarato reductasa procedente de *Trypanosoma brucei* para incrementar la producción de ácido succínico, en el que preferiblemente la fumarato reductasa es activa en el citosol.

#### Modificaciones genéticas

50 Técnicas genéticas convencionales, tales como la sobreexpresión 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., eds., "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, por ejemplo, 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.

Los siguientes ejemplos son sólo para fines ilustrativos, y no se han de interpretar como limitantes de la invención.

#### Descripción de las figuras

60 Figura 1: Mapa del vector pGBTOP-11 usado para la expresión de fumarato reductasa en *A. niger*.

Figura 2: Mapa del plásmido de pGB414SUS-07, que codifica fumarato reductasa mitocondrial m1 (FRDm1) procedente de *Trypanosoma brucei* para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. CPO designa par de codones optimizado.

5  
Figura 3: Mapa del plásmido de pGBS414SUS-08, que codifica fumarato reductasa glicosomal (FRDg) procedente de *Trypanosoma brucei* para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. CPO designa par de codones optimizado.

10  
Figura 4: Mapa del plásmido de pDEL-SDHA.

Figura 5: Mapa del plásmido pGBTpAn1, para la sobreexpresión de FRDm1 en *A. niger*.

15  
Figura 6: Esquema de sustitución de *sdhA*.

Figura 7: Mapa del plásmido de pGBS416FRD-1, que codifica fumarato reductasa mitocondrial m1 (FRDm1) procedente de *Trypanosoma brucei* para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. CPO designa par de codones optimizado.

20  
Figura 8: Mapa del plásmido de pGBS416FRE-1, que codifica fumarato reductasa glicosomal (FRDg) procedente de *Trypanosoma brucei* para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. CPO designa par de codones optimizado.

25  
Figura 9: Mapa del plásmido de pGBS414PPK-1, que contiene PEP carboxicinas procedente de *Actinobacillus succinogenes* (PCKa) para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. El constructo génico sintético promotor de TDH1-PCKa-terminador de TDH1 se clonó en el vector de expresión pRS414. CPO designa par de codones optimizado.

30  
Figura 10: Mapa del plásmido de pGBS414PPK-2, que contiene PEP carboxicinas procedente de *Actinobacillus succinogenes* (PCKa) y fumarato reductasa mitocondrial m1 procedente de *Trypanosoma brucei* (FRDm1) para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. Los constructos génicos sintéticos promotor de TDH1-PCKa-terminador de TDH1 y promotor de TDH3-FRDm1-terminador de TDH3 se clonaron en el vector de expresión pRS414. CPO designa par de codones optimizado.

35  
Figura 11: Mapa del plásmido de pGBS414PPK-3, que contiene PEP carboxicinas procedente de *Actinobacillus succinogenes* (PCKa) y fumarato reductasa glicosomal procedente de *Trypanosoma brucei* (FRDg) para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. Los constructos génicos sintéticos promotor de TDH1-PCKa-terminador de TDH1 y promotor de TDH3-FRDg-terminador de TDH3 se clonaron en el vector de expresión pRS414. CPO designa par de codones optimizado.

40  
Figura 12: Mapa del plásmido de pGBS414PEK-1, que codifica PEP carboxicinas procedente de *Mannheimia succiniciproducens* (PCKm) para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. El constructo génico sintético promotor de TDH1-PCKm-terminador de TDH1 se clonó en el vector de expresión pRS414. CPO designa par de codones optimizado.

45  
Figura 13: Mapa del plásmido de pGBS414PEK-2, que codifica PEP carboxicinas procedente de *Mannheimia succiniciproducens* (PCKm) y fumarato reductasa mitocondrial m1 procedente de *Trypanosoma brucei* (FRDm1) para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. Los constructos génicos sintéticos promotor de TDH1-PCKm-terminador de TDH1 y promotor de TDH3-FRDm1-terminador de TDH3 se clonaron en el vector de expresión pRS414. CPO designa par de codones optimizado.

50  
Figura 14: Mapa del plásmido de pGBS414PEK-3, que codifica PEP carboxicinas procedente de *Mannheimia succiniciproducens* (PCKm) y fumarato reductasa glicosomal procedente de *Trypanosoma brucei* (FRDg) para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. Los constructos génicos sintéticos promotor de TDH1-PCKm-terminador de TDH1 y promotor de TDH3-FRDg-terminador de TDH3 se clonaron en el vector de expresión pRS414. CPO designa par de codones optimizado.

55  
Figura 15: Mapa del plásmido de pGBS415FUM-2, que contiene fumarasa procedente de *Rhizopus oryzae* (FUMR) y malato deshidrogenasa citoplásmica procedente de *Saccharomyces cerevisiae* truncada para los primeros 12 aminoácidos (delta12N MDH2) para la expresión en *Sacharomyces cerevisiae*. Los constructos génicos sintéticos promotor de TDH1-FUMR-terminador de TDH1 y promotor de DH3-MDH3-terminador de

60

TDH3 se clonaron en el vector de expresión pRS415. CPO designa par de codones optimizado.

Figura 16: 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*. Los constructos génicos sintéticos promotor de TDH1-FUMR-terminador de TDH1 y promotor de TDH3-MDH3-terminador de TDH3 se clonaron en el vector de expresión pRS415. CPO designa par de codones optimizado.

Figura 17: Niveles de ácido succínico en cepas SUC-101 (O, control de vectores vacíos), SUC-148 (■, sobreexpresión de PCKa, MDH3, FUMR, FRDm1), SUC-149 (□, PCKa, MDH3, FUMR, FRDg), SUC-150 (◆, PCKm, MDH3, FUMR, FRDm1), SUC-151 (◇, PCKm, MDH3, FUMR, FRDg), SUC-152 (●, PCKa, MDH3, FUMR), SUC-154 (X, PCKm, MDH3, FUMR) y SUC-169 (▲, PCKm, delta12NMDH2, FUMR, FRDm1). Todos los genes sobreexpresados se optimizaron en el par de codones para la expresión en *S. cerevisiae*. Todos los datos representan medias de 3 experimentos de crecimiento independientes de SUC-148, 149, 150, 151, 152, 154 y SUC-169 y medias de 6 experimentos de crecimiento independiente de SUC-101.

Figura 18: Mapa del plásmido de pGBS416MAE-1, que contiene malato permeasa procedente de *Schizosaccharomyces pombe* (SpMAE1) para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. El constructo génico sintético promotor de Eno1-MAE1-terminador de Eno1 se clonó en el vector de expresión pRS416. CPO designa par de codones optimizado.

Figura 19: Niveles de ácido succínico en cepas SUC-101 (O, control de vectores vacíos), SUC-169 (▲, PCKm, delta12NMDH2, FUMR, FRDm1) y SUC-194 (■, PCKm, delta12NMDH2, FUMR, FRDm1, SpMAE1). Todos los genes sobreexpresados se optimizaron en el par de codones para la expresión en *S. cerevisiae*. Todos los datos representan medias de 3 experimentos de crecimiento independientes de SUC-169 y SUC-194 y medias de 6 experimentos de crecimiento independiente de SUC-101.

Figura 20: Niveles de ácido succínico en cepas SUC-103 (O, mutante de supresión *adh1/2* y *gpd1*; control de vectores vacíos), SUC-201 (□, mutante de supresión *adh1/2* y *gpd1*; PCKa; MDH3, FUMR, FRDg) y SUC-200 (■, mutante de supresión *adh1/2* y *gpd1*; PCKa, MDH3, FUMR, FRDg, SpMAE1). Todos los genes sobreexpresados se optimizaron en el par de codones para la expresión en *S. cerevisiae*.

Figure 21: Mapa del plásmido de pGBS426PYC-2, que contiene piruvato carboxilasa de *Saccharomyces cerevisiae* para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. La secuencia de nucleótidos codificante de PYC2 se obtuvo mediante PCR usando ADN genómico procedente de la cepa CEN.PK113-5D como molde, y el producto de la PCR se clonó en el vector de expresión p426GPD.

Figura 22: Mapa del plásmido de pGBS414FRE-1, que codifica fumarato reductasa glicosomal (FRDg) procedente de *Trypanosoma brucei* para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. El constructo génico sintético promotor de TDH3-FRDg-terminador de TDH3 se clonó en el vector de expresión pRS414.

Figura 23: 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 (O, MDH3, FUMR, FRDg). Los datos representan la media de 3 experimentos de crecimiento independientes.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1

Clonación de fumarato reductasas procedentes de *Trypanosoma brucei* en *Aspergillus niger*

#### 1.1. Constructos de expresión

Se analizó fumarato reductasa mitocondrial m1 (FRDm1) [E.C. 1.3.1.6], número de acceso GenBank 60460035, procedente de *Trypanosoma brucei* en busca de 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 señal mitocondrial putativa en la mitad N-terminal de la proteína, incluyendo un posible sitio de escisión entre las pos. 25 y 26 (D-S).

Se demostró que la proteína recombinante FRDm1 que carece de los 68 restos N-terminales se relocalizó en el

5 citosol de los tripanosomas procíclicos (Coustou et al., J Biol Chem. 29 abril 2005; 280(17):16559-70). Estos resultados indican que el motivo señal N-terminal predicho de FRDm1 es necesario para la localización hacia la mitocondria. Se eliminaron los primeros 68 aminoácidos de SEC ID NO: 1 (que corresponden a la secuencia de nucleótidos SEC ID NO: 2), y se reintrodujo un nuevo aminoácido de metionina, lo que dio como resultado SEC ID NO: 3. La secuencia SEC ID NO: 3 se sometió al método del par de codones como se describe en el documento WO2008/000632 para *A. niger*. La secuencia resultante SEC ID NO: 7 se colocó detrás de la secuencia del promotor de GPDA constitutivo SEC ID NO: 11, en la que las últimas 10 secuencias de nucleótidos se sustituyeron por la secuencia Kozak óptima CACCGTAAA. Se añadieron sitios de restricción convenientes. El codón de parada TAA en SEC ID NO: 7 se modificó a TAAA. La secuencia resultante se sintetizó en Sloning (Puchheim, Alemania). El fragmento se clonó mediante *Sna*BI, *Sfi*I en el vector de expresión pGBTOP11 de *A. niger* (Figura 1) utilizando sitios de restricción apropiados. El plásmido resultante que comprende FRDm1 se denominó pGBTOPAn1 (Figura 5).

15 De igual manera, se analizó fumarato reductasa glicosomal (FRDg) [E.C. 1.3.1.6], número de acceso GenBank 23928422, procedente de *Trypanosoma brucei* en busca de localización peroxisomal en hongos filamentosos usando el predictor PTS1 <http://imendel.imp.ac.at/mendeljsp/sat/pts1/PTS1predictor.jsp> con la función de predicción específica de hongos. Se eliminaron los aminoácidos C-terminales en la posición 1140-1142 (SKI) de la proteína SEC ID NO: 4 (que corresponden a la secuencia de nucleótidos SEC ID NO: 5), dando como resultado SEC ID NO: 6. SEQ ID NO: 6, se sometió al método del par de codones como se describe en PCT/EP2007/05594 para *A. niger*. El codón de parada TAA en SEC ID NO: 8 se modificó a TAAA. La secuencia resultante SEC ID NO: 8 se colocó detrás de la secuencia del promotor de GPDA constitutivo SEC ID NO: 11, y se añadieron sitios de restricción convenientes. La secuencia resultante se sintetizó en Sloning (Puchheim, Alemania). El fragmento se clonó mediante *Sna*BI, *Sfi*I en el vector de expresión de *A. niger* pGBTOP11 (Figure 1) usando sitios de restricción apropiados.

## 25 1.2. Transformación de *A. niger*

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

Los constructos de expresión se co-transformaron en la cepa WT-1 de *A. niger* según 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:

- 35
- 40 - Las esporas germinan y se cultivan durante 16 horas a 30 grados Celsius en un matraz oscilante colocado en un agitador giratorio a 300 rpm en medio mínimo de *Aspergillus* (100 ml). El medio mínimo de *Aspergillus* contiene, por litro: 6 g de NaNO<sub>3</sub>, 0,52 g de KCl, 1,52 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,12 ml de KOH 4 M, 0,52 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10 g de glucosa, 1 g de casaminoácidos, 22 mg de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 11 mg de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5 mg de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,7 mg de CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1,6 mg de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 5 mg de MnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1,5 mg de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 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).
  - 45 - Para la preparación de protoplastos se usa Novozym 234<sup>™</sup> (Novo Industries) en lugar de helicasa;
  - 50 - Después de la formación de los protoplastos (60-90 minutos), se añade tampón de KC (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 cuba oscilante. Los protoplastos se resuspenden en 20 ml de tampón de KC y subsiguientemente se añaden 25 ml de tampón STC (sorbitol 1,2 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, CaCl<sub>2</sub> 50 mM). La suspensión de protoplastos se centrifuga durante 10 minutos a 3000 rpm a 4 grados Celsius en un rotor con cuba oscilante, se lava en tampón STC y se resuspende en tampón STC a una concentración de 10E8 protoplastos/ml;
  - 55 - A 200 microlitros 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 de PEG (PEG 4000 al 20% (Merck), sorbitol 0,8 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, CaCl<sub>2</sub> 50 mM);
  - 60 - Después de la incubación de la suspensión de protoplastos y ADN durante 10 minutos a la temperatura ambiente, se añade lentamente 1,5 ml de disolución de PEG (PEG 4000 al 60%, (Merck), Tris-HCl 10 mM pH 7,5, CaCl<sub>2</sub> 50 mM), con mezclado repetido de los tubos. Después de incubar durante 20 minutos a

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 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 con acetamida, el medio contiene acetamida 10 mM como la única fuente de nitrógeno, y sacarosa 1 M como agente osmótico y fuente de C. Alternativamente, los protoplastos se extienden sobre PDA (agar de dextrosa de patata, Oxoid) suplementado con 1-50 microgramos/ml de fleomicina y sacarosa 1 M como agente osmótico. Las placas de regeneración se solidifican utilizando agar al 2% (agar nº 1, Oxoid L11). Después de incubar durante 6-10 días a 30 grados Celsius, se transfieren conidiosporas de transformantes a placas que consisten en medio selectivo de *Aspergillus* (medio mínimo que contiene acetamida como única fuente de nitrógeno en el caso de la selección con acetamida, o PDA suplementado con 1-50 microgramos/ml de fleomicina en el caso de la selección con fleomicina) con glucosa al 2% y agarosa al 1,5% (Invitrogen), y se incuban durante 5-10 días a 30 grados Celsius. Los transformantes individuales 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 se seleccionan 10 transformantes para cada constructo, y la presencia del constructo se confirma mediante PCR usando cebadores específicos para los constructos. Subsiguientemente, las esporas se inoculan en 100 ml de medio enriquecido mínimo de *Aspergillus*, que comprende 100 g/l de glucosa. Las cepas se hacen crecer en una incubadora a 250 revoluciones por minuto durante cuatro días a 34 grados Celsius. El sobrenadante del medio de cultivo se analiza para determinar 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 lleva a cabo 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 2A

### 35 Clonación de fumarato reductasas procedentes de *Trypanosoma brucei* en *Saccharomyces cerevisiae*

#### 2A.1. Constructos de expresión

Se analizó fumarato reductasa mitocondrial m1 (FRDm1) [E.C. 1.3.1.6], número de acceso de GenBank 60460035, procedente de *Trypanosoma brucei* en busca de la presencia de secuencias señal, y se optimizó en los codones como se describe en la sección 1.1 para la expresión en *S. cerevisiae*. La secuencia resultante SEC ID NO: 9 se colocó detrás de la secuencia del promotor TDH3 constitutivo SEC ID NO: 12 y delante de la secuencia del terminador TDH3 SEC ID NO: 13, y se añadieron sitios de restricción convenientes. El codón de parada TGA en SEC ID NO: 9 se modificó a TAAG. La secuencia resultante se sintetizó en Sloning (Puchheim, Alemania). El constructo de expresión pGBS414SUS-07 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 el constructo del gen sintético de fumarato reductasa (Figura 2). La mezcla de ligamiento se usa para la transformación de DH10B de *E. coli* (Invitrogen), dando como resultado el constructo de expresión pGBS414SUS-07 de levadura (Figura 2).

De forma similar, se analizó fumarato reductasa glicosomal (FRDg) [E.C. 1.3.1.6], número de acceso de GenBank 23928422, procedente de *Trypanosoma brucei* en busca de la localización peroxisomal, y se aplicó la optimización de los codones como se describe en la sección 1.1 para la expresión en *S. cerevisiae*. La secuencia resultante SEC ID NO: 10 se colocó detrás de la secuencia del promotor TDH3 constitutivo SEC ID NO: 12 y delante de la secuencia del terminador TDH3 SEC ID NO: 13, y se añadieron sitios de restricción convenientes. El codón de parada TGA en SEC ID NO: 10 se modificó a TAAG. La secuencia resultante se sintetizó en Sloning (Puchheim, Alemania). El constructo de expresión pGBS414SUS-08 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 el constructo del gen sintético de fumarato reductasa (Figura 3). La mezcla de ligamiento se usa para la transformación de DH10B de *E. coli* (Invitrogen), dando como resultado el constructo de expresión pGBS414SUS-08 de levadura (Figura 3).

Los constructos pGBS414SUS-07 y pGBS414SUS-08 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 base de levadura nitrogenada (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 par determinar la formación de ácido oxálico, ácido málico, ácido fumárico y ácido succínico como se describe en la sección 1.4.

## Ejemplo 2B

Clonación de fumarato reductasas procedentes de *Trypanosoma brucei* en *Saccharomyces cerevisiae*

### 2B.1. Constructos de expresión

De una manera similar a la descrita en el Ejemplo 2A.1, se ligó fumarato reductasa mitocondrial procedente de *Trypanosoma brucei* (FRDm, SEC ID NO: 9) en un vector de expresión pRS416 de *S. cerevisiae* (Sirkoski R.S. y Hieter P, *Genetics*, 1989, 122(1):19-27). La mezcla de ligamiento se usó para la transformación de células TOP10 de *E. coli* (Invitrogen), dando como resultado el constructo de expresión de levaduras pGBS416FRD-1 (Figura 7).

Igualmente, se ligó fumarato reductasa glicosomal (FRDg, SEC ID NO: 10) procedente de *Trypanosoma brucei* en un vector de expresión pRS416 de *S. cerevisiae*. La mezcla de ligamiento se usó para la transformación de células TOP10 de *E. coli* (Invitrogen), dando como resultado el constructo de expresión de levaduras pGBS416FRE-1 (Figura 8).

### 2B.2 Transformación y experimentos de crecimiento en placas de microtitulación (MTP's)

Los constructos pGBS416FRD-1 y pGBS416FRE-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 base de levadura nitrogenada (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, y se pre-cultivaron a 30 grados Celsius, 550 rpm y una humedad de 80% en una incubadora oscilante Infors Microplate: 12 transformantes pGBS416FRD-1 (FRDm1), 12 pGBS416FRE-1 (FRDg) y 24 de control de vector vacío pRS416. Después de 3 días, se transfirieron 25 microlitros del pre-cultivo presente en los pocillos de las placas MTP a nuevas MTP's de 96 pocillos profundos que contenían medio de Verduyn, que contiene glucosa y CaCO<sub>3</sub> (concentraciones finales: glucosa 10%, CaCO<sub>3</sub> 1% p/v en un volumen total de 250 microlitros). Después de 3 y 7 días de crecimiento a 30°C, 550 rpm y una humedad de 80% en una incubadora oscilante Infors Microplate, las MTP's se centrifugaron durante 2 minutos a 2000 rpm, y se cosecharon 200 microlitros de sobrenadante usando el dispositivo Multimek 96 (Beckman). El sobrenadante se analizó mediante HPLC como se describe en el Ejemplo 1.4 para determinar la presencia de ácido succínico. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Efecto de la introducción de fumarato reductasa mitocondrial (FRDm1) y glicosomal (FRDg) procedentes de *T. brucei* en *S. cerevisiae* sobre los niveles de producción de ácido succínico después de 3 y 7 días de incubación

Plásmido que comprende <i>S. cerevisiae</i> :	Ácido succínico (mg/l) después de 3 días	Ácido succínico (mg/l) después de 7 días
Vector vacío pRS416	138±18 (n=48)	203±48 (n=48)
pGBS416FRD-1 (FRDm1)	340±65 (n=24)	399±72 (n=24)
pGBS416FRE-1 (FRDg)	489±30 (n=24)	516±57 (n=24)

Los resultados en la Tabla 1 muestran que la introducción y sobreexpresión de fumarato reductasa mitocondrial

(FRDm1) procedente de *T. brucei* dio como resultado un incremento de los niveles de producción de ácido succínico (2,47 veces,  $p=6,96E-14$ , prueba de la t de Student, después de 3 días de incubación, y 1,97 veces,  $p=8,63E-14$ , prueba de la t de Student, después de 7 días de incubación).

5 Igualmente, la introducción y sobreexpresión de fumarato reductasa glicosomal (FRDg) procedente de *T. brucei* dio como resultado un incremento de los niveles de producción de ácido succínico (3,55 veces,  $p=5,08E-32$ , prueba de la t de Student, después de 3 días de incubación, y un incremento de 2,55 veces,  $p=8,63E-25$ , prueba de la t de Student, después de 7 días de incubación).

## 10 Ejemplo 2C

Clonación de PEP carboxicinas procedente de *Actinobacillus succinogenes* o *Mannheimia succiniciproducens*, y malato deshidrogenasa procedente de *Saccharomyces cerevisiae* y fumarasa procedente de *Rhizopus oryzae* y fumarato reductasa procedente de *Trypanosoma brucei* en *Saccharomyces cerevisiae*

### 15 2C.1. Secuencias génicas

Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa [E.C. 4.1.1.49], número de acceso de GenBank 152977907, procedente de *Actinobacillus succinogenes* se analizó en busca de 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. El análisis como 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* se modificó para asemejarse a la secuencia proteica de *Mannheimia succiniciproducens* sustituyendo los aminoácidos EGY en la posición 120-122 por DAF, dando como resultado la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 14 (secuencia de nucleótidos SEC ID NO: 15). SEC ID NO: 14 se sometió al método del par de codones como se describe en el documento WO2008/000632 para *S. cerevisiae*. El codón de parada TAA en la secuencia de nucleótidos resultante SEC ID NO: 16 se modificó a TAAG. Esta SEC ID NO: 16 que contiene el codón TAAG se colocó detrás de la secuencia del promotor de TDH1 constitutivo SEC ID NO: 25 y delante de la secuencia del terminador TDH1 SEC ID NO: 26, y se añadieron sitios de restricción convenientes. La secuencia resultante SEC ID NO: 29 se sintetizó en Sloning (Puchheim, Alemania).

Igualmente, se analizó fosfoenolpiruvato carboxicinas [E.C. 4.1.1.49] número de acceso de GenBank 52426348, procedente de *Mannheimia succiniciproducens*, en busca de la presencia de secuencias señal como se describe en Schlüter et al., (2007) NAR, 35, D815-D822. La secuencia como se muestra en SEC ID NO: 17 no requirió modificaciones. SEC ID NO: 17 se sometió al método del par de codones como se describe en el documento WO2008/000632 para *S. cerevisiae*. El codón de parada TAA en la secuencia resultante SEC ID NO: 18 se modificó a TAAG. SEC ID NO: 18 que contiene el codón de parada TAAG se colocó detrás de la secuencia del promotor de TDH1 constitutivo SEC ID NO: 25 y delante de la secuencia del terminador TDH1 SEC ID NO: 26. Se añadieron sitios de restricción convenientes. El constructo sintético resultante (SEC ID NO: 30) se sintetizó en Sloning (Puchheim, Alemania).

### Malato deshidrogenasa

Malato deshidrogenasa citoplásmica (Mdh2p) [E.C. 1.1.1.37], número de acceso de GenBank 171915, está regulada por repressión del catabolito de carbono: la transcripción de *MDH2* está reprimida, y Mdh2p es degradada con la adición de glucosa a células privadas de glucosa. Mdh2p suprimida para los 12 aminoácidos amino-terminales es menos susceptible a la degradación inducida por glucosa (Minard y McAlister-Henn, J Biol Chem. 1992 25 agosto; 267(24):17458-64). Para evitar la degradación de Mdh2 inducida por glucosa, se eliminaron los nucleótidos que codifican los primeros 12 aminoácidos, y se introdujo un nuevo aminoácido de metionina (SEC ID NO: 19) para la sobreexpresión de Mdh2 en *S. cerevisiae*. SEC ID NO: 19 se sometió al método del par de codones como se describe en el documento WO2008/000632 para *S. cerevisiae*. El codón de parada TAA en la secuencia resultante SEC ID NO: 20, se modificó a TAAG. SEC ID NO: 20, que contiene un codón de parada TAAG modificado, que codifica delta12NMDH2, se colocó detrás de la secuencia del promotor de TDH3 constitutivo SEC ID NO: 12 y delante de la secuencia del terminador TDH3 SEC ID NO: 13, y se añadieron sitios de restricción convenientes. El constructo sintético resultante (SEC ID NO: 31) se sintetizó en Sloning (Puchheim, Alemania).

Malato deshidrogenasa peroxisomal (Mdh3p) [E.C. 1.1.1.37], número de acceso de GenBank 1431095, se analizó en busca de la localización peroxisomal en hongos filamentosos usando 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 341-343 (SKL) se eliminaron de la proteína MDH3, dando como

resultado SEC ID NO: 21. SEC ID NO: 21 se sometió al método del par de codones como se describe en el documento WO2008/000632 para *S. cerevisiae*. El codón de parada TGA en la secuencia resultante SEC ID NO: 22 se modificó a TAAG. SEC ID NO: 22, que contiene TAAG como codón de parada, se sintetizó detrás de la secuencia del promotor TDH3 constitutivo SEC ID NO: 27 (600 pb en dirección 5' del codón de iniciación) y delante de la secuencia del terminador TDH3 SEC ID NO: 28 (300 pb en dirección 3' del codón de parada), y se añadieron sitios de restricción convenientes. La secuencia resultante SEC ID NO: 32 se sintetizó en Sloning (Puchheim, Alemania).

Fumarasa:

Fumarasa [E.C. 4.2.1.2], número de acceso de GenBank 469103, procedente de *Rhizopus oryzae* (FumR) se analizó en busca de 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 de localización mitocondrial putativa en los primeros 23 aminoácidos de la proteína. Para evitar una localización potencial a mitocondrias en *S. cerevisiae*, los primeros 23 aminoácidos se eliminaron de FumR, y se reintrodujo un aminoácido metionina, dando como resultado SEC ID NO: 23. SEC ID NO: 23 se sometió al método del par de codones como se describe en el documento WO2008/000632 para *S. cerevisiae*, dando como resultado SEC ID NO: 24. El codón de parada TAA en SEC ID NO: 24 se modificó a TAAG. SEC ID NO: 24 que contiene TAAG como codón de parada se sintetizó detrás de la secuencia del promotor TDH1 constitutivo SEC ID NO: 25 y delante de la secuencia del terminador TDH1 SEC ID NO: 26, y se añadieron sitios de restricción convenientes. El constructo sintético resultante SEC ID NO: 33 se sintetizó en Sloning (Puchheim, Alemania).

Fumarato reductasa:

Las secuencias génicas de fumarato reductasa mitocondrial (FRDm1) y fumarato reductasa glicosomal (FRDg) procedentes de *T. brucei* se diseñaron y sintetizaron como se describe en 2A.1.

## 2C.2. Construcción de constructos de expresión

Los constructos de expresión pGBS414PPK-1 (Figura 9), pGBS414PPK-2 (Figura 10) y pGBS414PPK-3 (Figura 11) se crearon 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 ligando subsiguientemente en este vector un fragmento de restricción *Bam*HI/*Not*I que consistía en el constructo génico sintético de fosfoenolpiruvato carboxinasa (origen *Actinobacillus succinogenes*) (SEC ID NO: 29). La mezcla de ligamiento se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli* (Invitrogen), dando como resultado el constructo pGBS414PPK-1 de expresión en levaduras. Subsiguientemente, pGBK414PPK-1 se restringió con *As*cl y *Not*I. Para crear pGBS414PPK-2, un fragmento de restricción *As*cl/*Not*I que consiste en el constructo génico sintético de fumarato reductasa mitocondrial procedente de *T. brucei* (FRDm1) (SEC ID NO: 34) se ligó en el vector pGBS414PPK-1 restringido. La mezcla de ligamiento se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli* (Invitrogen), dando como resultado el constructo pGBS414PPK-2 de expresión en levaduras (Figura 10). Para crear pGBS414PPK-3, un fragmento de restricción *As*cl/*Not*I que consiste en el constructo génico sintético de fumarato reductasa glicosomal procedente de *T. brucei* (FRDg) (SEC ID NO: 35) se ligó en el vector pGBS414PPK-1 restringido. La mezcla de ligamiento se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli* (Invitrogen), dando como resultado el constructo pGBS414PPK-3 de expresión de levaduras (Figura 11).

Los constructos de expresión pGBS414PEK-1 (Figura 12), pGBS414PEK-2 (Figura 13) y pGBS414PEK-3 (Figura 14) se crearon 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 ligando subsiguientemente en este vector un fragmento de restricción *Bam*HI/*Not*I que consistía en el constructo génico sintético de fosfoenolpiruvato carboxinasa (origen *Mannheimia succiniciproducens*) (SEC ID NO: 30). La mezcla de ligamiento se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli* (Invitrogen), dando como resultado el constructo pGBS414PEK-1 de expresión en levaduras. Subsiguientemente, pGBK414PEK-1 se restringió con *As*cl y *Not*I. Para crear pGBS414PEK-2, un fragmento de restricción *As*cl/*Not*I que consiste en el constructo génico sintético de fumarato reductasa mitocondrial procedente de *T. brucei* (FRDm1) (SEC ID NO: 34) se ligó en el vector pGBS414PEK-1 restringido. La mezcla de ligamiento se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli* (Invitrogen), dando como resultado el constructo pGBS414PEK-2 de expresión en levaduras (Figura 13). To create pGBS414PEK-3, un fragmento de restricción *As*cl/*Not*I que consiste en el constructo génico sintético de fumarato reductasa glicosomal procedente de *T. brucei* (FRDg) (SEC ID NO: 35) se ligó en el vector pGBS414PEK-1 restringido. La mezcla de ligamiento se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli* (Invitrogen), dando como resultado el constructo pGBS414PEK-3 de expresión de levaduras (Figura 14).



Los constructos de expresión pGBS415FUM-2 (Figura 15) y pGBS415FUM-3 (Figura 16) se crearon 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 el constructo génico sintético de fumarasa (origen *Rhizopus oryzae*) (SEC ID NO: 33). La mezcla de ligamiento se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli* (Invitrogen), dando como resultado el constructo pGBS415FUM-1 de expresión en levaduras. Subsiguientemente, pGBK415FUM-1 se restringió con *Asc*I y *Not*I. Para crear pGBS415FUM-2, un fragmento de restricción *Asc*I/*Not*I que consiste en el constructo génico sintético de malato deshidrogenasa citoplásmica procedente de *S. cerevisiae* (delta12N MDH2) (SEC ID NO: 31) se ligó en el vector pGBS415FUM-1 restringido. La mezcla de ligamiento se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli* (Invitrogen), dando como resultado el constructo pGBS415FUM-2 de expresión en levaduras (Figura 15). Para crear pGBS415FUM-3, un fragmento de restricción *Asc*I/*Not*I que consiste en el constructo génico sintético de malato deshidrogenasa peroxisomal procedente de *S. cerevisiae* (MDH3) (SEC ID NO: 32) se ligó en el vector pGBS415FUM-1 restringido. La mezcla de ligamiento se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli* (Invitrogen), dando como resultado el constructo pGBS415FUM-3 de expresión de levaduras (Figura 16).

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

Diferentes combinaciones de plásmidos pGBS414PPK-1, pGBS414 PPK-2, pGBS414PPK-3, pGBS414PEK-1, pGBS414PEK-2, pGBS414PEK-3, pGBS415FUM-2, pGBS415-FUM-3 se transformaron en la cepa CEN.PK113-6B (MATA *ura3-52 leu2-112 trp1-289*) de *S. cerevisiae*, dando como resultado las cepas de levaduras en la Tabla 2. Además de los plásmidos mencionados, se transformó pRS416 (vector vacío) para crear cepas de levaduras prototróficas. Los vectores de expresión se transformaron en levadura mediante electroporación. Las mezclas de transformación se extendieron en placas sobre base de levadura nitrogenada (YNB) sin AA (Difco) + glucosa al 2%.

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

<u>Nombre</u>	<u>Contexto</u>	<u>Plásmidos</u>	<u>Genes</u>
SUC-148	CEN.PK113-6B	pGBS414PPK-2 pGBS415FUM-3 pRS416 (vector vacío)	PCKa, FRDm1 FUMR, MDH3
SUC-149	CEN.PK113-6B	pGBS414PPK-3 pGBS415FUM-3 pRS416 (vector vacío)	PCKa, FRDg FUMR, MDH3
SUC-150	CEN.PK113-6B	pGBS414PEK-2 pGBS415FUM-3 pRS416 (vector vacío)	PCKm, FRDm1 FUMR, MDH3
SUC-151	CEN.PK113-6B	pGBS414PEK-3 pGBS415FUM-3 pRS416 (vector vacío)	PCKm,FRDg FUMR, MDH3
SUC-152	CEN.PK113-6B	pGBS414PPK-1 pGBS415FUM-3 pRS416 (vector vacío)	PCKa FUMR, MDH3
SUC-154	CEN.PK113-6B	pGBS414PEK-1 pGBS415FUM-3 pRS416 (vector vacío)	PCKm FUMR, MDH3

Nombre	Contexto	Plásmidos	Genes
SUC-169	CEN.PK113-6B	pGBS414PEK-2 pGBS415FUM-2 pRS416 (vector vacío)	PCKm, FRDm1 FUMR, $\Delta$ 12NMDH2
SUC-101	CEN.PK113-6B	pRS414 (vector vacío) pRS415 (vector vacío) pRS415 (vector vacío)	

#### 2C.4. Experimentos de crecimiento y producción de ácido succínico

5 Se inocularon transformantes 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 usó 1 ml de sobrenadante para medir los niveles de ácido succínico mediante HPLC, como se describe en la sección 1.4. El sobrenadante que queda se decantó y el pelete (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 CaCO<sub>3</sub> 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 se midieron mediante HPLC como se describe en la sección 1.4 (Figura 17).

15 Cepas transformadas con vectores vacíos (cepa de control) produjeron hasta 0,3 g/l de ácido succínico. La sobreexpresión de PEP carboxicinasa 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 sobreexpresión de PEP carboxicinasa procedente de *A. succinogenes* (PCKa), MDH3 y FUMR dio como resultado un ligero incremento en la producción de ácido succínico hasta 1,0 g/l.

Estos resultados demuestran que, en *S. cerevisiae* como se describe, la producción de ácido succínico aumentó alrededor de 3 veces.

25 La sobreexpresión adicional de fumarato reductasa mitocondrial (FRDm1) procedente de *T. brucei* incrementó adicionalmente los niveles de producción de ácido succínico; la sobreexpresión de PCKa, MDH3, FUMR, FRDm1 dio como resultado la producción de 2,6 g/l de ácido succínico, y la sobreexpresión de PCKm, MDH3, FUMR y FRDm1 dio como resultado la producción de 2,7 g/l de ácido succínico. La sobreexpresión de delta12NMDH2 en combinación con PCKm, FUMR y FRDm1 dio como resultado la producción de 2,7 g/l de ácido succínico, indicando que se produjeron niveles similares de ácido succínico usando MDH2 o MDH3 truncadas. La sobreexpresión adicional de fumarato reductasa glicosomal (FRDg) procedente de *T. brucei* dio como resultado un incremento incluso mayor en los niveles de producción de ácido succínico; la sobreexpresión de PCKa, MDH3, FUMR y FRDg dio como resultado la producción de 3,9 g/l de ácido succínico, mientras que la sobreexpresión de PCKm, MDH3, FUMR y FRDg dio como resultado una producción ligeramente menor de 3,6 g/l de ácido succínico.

35 Los resultados muestran que la adición de fumarato reductasa dependiente de NAD(H) como se describe aquí en una *S. cerevisiae* que comprende una modificación genética de PCKa/m, MDH3 y FUMR incrementó significativamente los niveles de producción de ácido succínico.

40 La sobreexpresión de FRDg tuvo un efecto más positivo sobre los niveles de producción de ácido succínico en *S. cerevisiae* en comparación con la sobreexpresión de FRDm1 en *S. cerevisiae*.

#### Ejemplo 2D

45 Efecto de la sobreexpresión de un transportador de ácido dicarboxílico sobre la producción de ácido succínico en células de *S. cerevisiae* productoras de ácido succínico

##### 2D.1 Secuencia génicas

Malato permeasa, número de acceso de GenBank 119368831, procedente de *Schizosaccharomyces pombe* (SEC ID NO: 36) se sometió al método del par de codones como se describe en el documento WO2008/000632 para *S. cerevisiae*, dando como resultado SEC ID NO: 37. El codón de parada TAA en SEC ID NO: 37 se modificó a TAAG. SEC ID NO: 37, que contiene TAAG como codón de parada, se colocó detrás de la secuencia del promotor ENO1 constitutivo SEC ID NO: 38 y delante de la secuencia del terminador ENO1 SEC ID NO: 39, y se añadieron sitios de restricción convenientes. En el promotor ENO1, T en la posición 596 (-5) se cambió a A a fin de obtener una mejor secuencia de Kozak. La secuencia resultante SEC ID NO: 40 se sintetizó en Sloning (Puchheim, Alemania).

#### 2D.2. Construcción de constructos de expresión

El constructo de expresión pGBS416MAE-1 (Figura 18) se creó después de una restricción de *Bam*HI/*Not*I del vector de expresión de *S. cerevisiae* pRS416 (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 consiste en el constructo génico sintético del transportador de malato de *Schizosaccharomyces pombe* (SEC ID NO: 40). La mezcla de ligamiento se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli* (Invitrogen) dando como resultado el constructo de expresión pGBS416MAE-1 de levaduras.

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

Los plásmidos pGBS414PEK-2, pGBS415FUM-2 y pGBS416MAE-1 (descritos en 2C.2.) se transformaron en la cepa CEN.PK113-6B (*MATA ura3-52 leu2-112 trp1-289*) de *S. cerevisiae* para crear la cepa SUC-194, que sobreexpresa PCKm, delta12NMDH2, FUMR, FRDm1 y SpMAE1. Todos los genes se optimizaron en el par de codones para la expresión en *S. cerevisiae*.

Los vectores de expresión se transformaron en levadura mediante electroporación. Las mezclas de la transformación se extendieron en placas sobre base de levadura nitrogenada (YNB) sin AA (Difco) + glucosa al 2%. La cepa SUC-101 se describe en la Tabla 2.

Tabla 3: Cepas de levadura construidas para el Ejemplo 2D

Nombre	Contexto	Plásmidos	Genes
SUC-132	CEN.PK113-6B	pGBS414PEK-2 pGBS415FUM-2 pRS416 (vector vacío)	PCKm, FRDm1 FUMR, Δ12NMDH2
SUC-194	CEN.PK113-6B	pGBS414PEK-2 pGBS415FUM-2 pRS416MAE-1	PCKm, FRDm1 FUMR, Δ12NMDH2 SpMAE1

#### 2D.4. Experimentos de crecimiento y producción de ácido succínico en cepas CEN. PK de tipo salvaje

Los parámetros de crecimiento y el análisis de las muestras se realizaron como se describe en el ejemplo 2C.4, con las siguientes modificaciones: el precultivo se llevó a cabo usando glucosa al 2% (p/v) como fuente de carbono. En el medio de producción, se usó glucosa al 10% (p/v) como fuente de carbono.

Las cepas transformadas con vectores vacíos (cepa de control) produjeron hasta 0,3 g/l de ácido succínico. La sobreexpresión adicional de SpMAE1 en la cepa SUC-194, que sobreexpresa PCKm, delta12NMDH2, FUMR y FRDm1, dio como resultado mayores niveles de producción de ácido succínico hasta 4,6 g/l, mientras que la cepa SUC-132, que sobreexpresa PCKm, delta12NMDH2, FUMR y FRDm1, dio como resultado la producción de 2,7 g/l de ácido succínico.

Los resultados muestran que la inserción de un transportador de malato en una *S. cerevisiae* que comprende las modificaciones genéticas como se describen aquí incrementó adicionalmente la producción de ácido succínico al menos 1,5 veces.

### Ejemplo 2E

Efecto de un transportador de ácido dicarboxílico en *s. cerevisiae* que comprende una supresión de los genes de alcohol deshidrogenasa 1 y 2 (*adh1*, *adh2*) y el gen de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 1 (*gpd1*) sobre los niveles de producción de ácido succínico.

#### 2E.1. Secuencias génicas

Descritas en 2D.1.

2E.2. Construcción de constructos de expresión

5

Descrita en 2D.2.

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

10 Los plásmidos pGBS414PPK-3, pGBS415FUM-3 y pGBS416MAE-1 (descritos en 2C.2.) se transformaron en la cepa RWB064 (*MATA ura3-52 leu2-112 trp1-289 adh1::lox adh2::lox gpd1::Kanlox*) de *S. cerevisiae* para crear la cepa SUC-201, que sobreexpresa PCKa, MDH3, FUMR, FRDg y SpMAE1. Todos los genes se optimizaron en el par de codones para la expresión en *S. cerevisiae*.

15 Tabla 4: Cepas de levadura construidas para el Ejemplo 2E

Nombre	Contexto	Plásmidos	Genes
SUC-200	CEN.PK113-6B <i>adh1::lox adh2::lox gpd1::Kanlox</i>	pGBS414PPK-3 pGBS415FUM-3 pGBS416MAE-1	PCKa, FRDg FUMR, MDH3 SpMAE1
SUC-201	CEN.PK113-6B <i>adh1::lox adh2::lox gpd1:: Kanlox</i>	pGBS414PPK-3 pGBS415FUM-3 pRS416 (vector vacío)	PCKa, FRDg FUMR MDH3
SUC-103	CEN.PK113-6B <i>adh1::lox adh2::lox gpd1::Kanlox</i>	pRS414 (vector vacío) pRS415 (vector vacío) pRS415 (vector vacío)	

2E.4. Experimentos de crecimiento y producción de ácido succínico en cepas CEN.PK a las que se les ha suprimido los genes de alcohol deshidrogenasa 1 y 2 (*adh1*, *adh2*) y el gen de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 1 (*gpd1*)

20

Los parámetros de crecimiento y el análisis de las muestras se llevaron a cabo como se describe en el ejemplo 2C.4, con las siguientes modificaciones: el precultivo se llevó a cabo usando galactosa al 2% (p/v) como fuente de carbono. Se añadió galactosa al 5% (p/v) al medio de producción a t = 0, 3 y 7 días.

25 La cepa SUC-103, transformada con los vectores vacíos (cepa de control) produjo 0,9 g/l de ácido succínico después del crecimiento durante 10 días en medio de producción (Figura 20). La sobreexpresión de PCKa, MDH3, FUMR y FRDg en la cepa RWB064 dio como resultado mayores niveles de producción de ácido succínico hasta 2,5 g/l (cepa SUC-201, Figura 20). La sobreexpresión adicional de SpMAE1, además de PCKa, MDH3, FUMR y FRDg, en la cepa RWB064, dio como resultado un incremento adicional de los niveles de producción de ácido succínico hasta 11,9 g/l (cepa SUC-200, Figura 20).

30

Los resultados muestran que la sobreexpresión de un transportador de malato en una *S. cerevisiae* que comprende una supresión de los genes de alcohol deshidrogenasa y de glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dio como resultado un incremento significativo en los niveles de producción de ácido succínico. Además, se mostró que la supresión del gen *adh1*, *adh2* y *gpd1* (SUC 103) dio como resultado mayores niveles de producción de ácido succínico en comparación con la cepa de tipo salvaje (SUC 101, Tabla 2).

35

### Ejemplo 2F

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

45 2F.1. Secuencias génicas

Las secuencias génicas de PEP carboxicinasa procedente de *A. succinogenes*, malato deshidrogenasa procedente de *S. cerevisiae*, fumarasa procedente de *R. oryzae* y fumarato reductasa procedente de *T. brucei* se describen en 2F.1. Piruvato carboxilasa citoplásmica procedente de *Saccharomyces cerevisiae* (Pyc2p) [E.C. 6.4.1.1.], número de acceso de GenBank 1041734, SEC ID NO: 41, es codificada por la secuencia de nucleótidos SEC ID NO: 42. Se usó como molde ADN genómico de la cepa CEN.PK113-5D (*MATA ura3-52*) de *S. cerevisiae* para amplificar la

50

secuencia codificante de *PYC2* (SEC ID NO: 42), usando los cebadores P1 (SEC ID NO: 43) y P2 (SEC ID NO: 44), y la Phusion ADN polimerasa (Finnzymes, Finlandia) según las instrucciones del fabricante. Para los fines de clonación posteriores, en los cebadores se incluyeron sitios de restricción convenientes.

5 2F.2. Construcción de constructos de expresión

El constructo de expresión pGBS426PYC-2 (Figura 21) se creó después de una restricción de *SpeI/XhoI* del vector de expresión de *S. cerevisiae* p426GPD (Mumberg et al., Gene. 14 de abril de 1995; 156(1):119-22) y ligando subsiguientemente en este vector un fragmento de restricción *SpeI/XhoI* que consiste en la secuencia de nucleótidos de *PYC2* amplificada (SEC ID NO: 42). La mezcla de ligamiento se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli* (Invitrogen) dando como resultado el constructo de expresión pGBS426PYC-2 de levaduras (Figura 21). La construcción de los vectores de expresión pGBS414PPK-3 y pGBS415FUM-3 se describe en 2C.2. El constructo de expresión pGBS414FRE-1 se creó tras una restricción de *BamHI/NotI* del vector de expresión de *S. cerevisiae* pRS414 (Sirkoski R.S. y Hieter P, Genetics, 1989, 122(1):19-27) y ligando subsiguientemente en este vector un fragmento de restricción *BamHI/NotI* que consiste en el constructo génico sintético de la fumarato reductasa glicosomal (origen *Trypanosoma brucei*) (SEC ID NO: 35). La mezcla de ligamiento se usó para la transformación de TOP10 de *E. coli* (Invitrogen) dando como resultado el constructo de expresión de levaduras pGBS414FRE-1 (Figura 22).

20 2F.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*), como se representa en la Tabla 5.

25

Tabla 5: Cepas de levadura construidas para el Ejemplo 2F

Nombre	Contexto	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

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

30 Los parámetros de crecimiento y el análisis de las muestras se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 2C.4, con las siguientes modificaciones: el precultivo se llevó a cabo usando glucosa al 2% (p/v) como fuente de carbono. En el medio de producción, se usó glucosa al 10% (p/v) como fuente de carbono.

35 Como se representa en la Figura 23, la cepa SUC-230, que sobreexpresa *MDH3*, *FUMR* y *FRDg*, produjo hasta 3,0 g/l de ácido succínico. La sobreexpresión adicional de *PCKa* incrementó la producción de ácido succínico hasta 3,4 g/l (cepa SUC-226), y la sobreexpresión adicional de *PYC2* incrementó la producción de ácido succínico hasta 3,7 g/l (cepa SUC-228). Sorprendentemente, la sobreexpresión 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* solas. Estos resultados muestran un efecto sinérgico de la sobreexpresión combinada de tanto PEP carboxinasa procedente de *A. succinogenes* (*PCKa*) como de piruvato carboxilasa procedente de *S. cerevisiae* (*PYC2*) sobre los niveles de producción de ácido succínico en *S. cerevisiae*.

40

**Ejemplo 3**

45 Inactivación de genes codificantes de succinato deshidrogenasa en *Aspergillus niger*

3.1. Identificación

Se secuenció y analizó ADN genómico de la cepa CBS513.88 de *Aspergillus niger*. 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. Se diseñaron vectores de sustitución génica para *sdhA* y *sdhB* según principios conocidos, y se construyeron según procedimientos de clonación habituales (véanse la figura 6). 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*, conducido por el promotor *gpdA*, entre repeticiones directas. El diseño general de estos vectores de supresión se describió previamente en los documentos EP635574B y WO 98/46772.

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

Se aisló ADN lineal del vector de supresión pDEL-SDHA (figura 4) y se usó para transformar CBS513.88 de *Aspergillus niger* como se describe en: Biotechnology of Filamentous fungi: Technology and Products. (1992) Reed Publishing (USA); Capítulo 6: Transformation p. 113 a 156. Este ADN lineal se puede integrar en el genoma en el locus *sdhA*, sustituyendo así al gen *sdhA* por el gen *amdS*, como se representa en la figura 6. Se seleccionaron transformantes en medios de acetamida, y la colonia se purificó según procedimientos estándar como se describe en el documento EP635574B. Las esporas se extendieron en placas en medio de fluoroacetamida para seleccionar las cepas, que perdieron 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 supresión del gen *sdhA*. La supresión del gen *sdhA* fue detectable por la reducción de tamaño de ~ 2,2 kb de fragmentos de ADN (fragmento de tipo salvaje de 4,6 kb frente a 2,4 kb para una supresión con éxito de SDHA) que cubren el locus completo, y se hibridaron a sondas apropiadas. Aproximadamente 9 cepas mostraban una eliminación del gen *sdhA* genómico de un conjunto de aproximadamente 96 transformantes iniciales.

La cepa dSDHA se seleccionó como una cepa representativa con el gen *sdhA* inactivado. La producción de ácido succínico de dSDHA se determinó en placas de microtitulación como se describe en el Ejemplo 4.

### 30 Ejemplo 4

#### Clonación de FRDm procedente de *Trypanosoma brucei* en dSDHA de *Aspergillus niger*

La cepa dSDHA de *A. niger* del ejemplo 3.2 se transformó con la construcción de expresión pGBTOPAn1 (Figura 5) que comprende fumarato reductasa mitocondrial m1 (FRDm1, SEC ID NO: 7) como se describe en el Ejemplo 1.1. Se eliminó ADN de *E. coli* mediante digestión con NotI. Se tomaron transformantes de *A. niger* utilizando Qpix y se transfirieron a MTP's que contenían medio selectivo de *Aspergillus*. Después de 7 días de incubación a 30 grados Celsius, la biomasa se transfirió a mano o con un recogedor de colonias a placas de microtitulación (MTP's) que contenían PDA. Después de 7 días de incubación a 30 grados Celsius, se esporuló la biomasa. Estas esporas se resuspendieron usando el Multimek 96 (Beckman) en 100 microlitros de medio de *Aspergillus* enriquecido mínimo que contenía glucosa al 10%. Subsiguientemente, 2 MTP con 170 microlitros de medio de *Aspergillus* enriquecido mínimo que contenía glucosa al 10% y CaCO<sub>3</sub> al 1% se inocularon con 30 microlitros de la suspensión de esporas. De igual manera, cepa dSDHA y GBS513.88 de *A. niger* se inocularon en las MTP's. Estas MTP's se incubaron durante 5 días a 34 grados Celsius, 80% de humedad. Después de 5 días, se cosecharon 160 microlitros usando el Multimek 96 (Beckman), y el ácido succínico se determinó mediante HPLC como se describe en el Ejemplo 1.4. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Efecto de la supresión de succinato deshidrogenasa (SDHA) e inserción de fumarato reductasa mitocondrial (FRDm1) procedente de *T. brucei* 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, + gGBTOPAn1 (FRDm1)	583

La Tabla 6 muestra claramente una mayor producción de ácido succínico por *A. niger* que comprende fumarato

reductasa mitocondrial procedente de *T. brucei*.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> DSM IP Assets BV Wu, Liang Damveld, Robbert Antonius Verwaal, René Sagt, Cornelis Maria Jacobus
- <120> Producción de ácido succínico en una célula eucariota
- <130> 26345WO
- 10 <140> 26345WO
- <141> 2008-11-14
- <160> 44
- 15 <170> PatentIn version 3.2
- <210> 1
- <211> 1232
- 20 <212> PRT
- <213> *Trypanosoma brucei*

<400> 1

```

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

Ala Gly Ser Ser Gly Val Ala Arg Asp Ser Pro Ser Leu Val Gly Asp
          20           25           30

Pro Cys Asp Ser Val Ser Pro Thr Arg Val Val Trp Gly Arg Phe Phe
          35           40           45

Lys Ser Leu Ala Pro Pro Ala Pro Ser Val Val Ser Cys Gln Lys Arg
 50           55           60

Phe Thr Ser His Gly Ala Asp Gly Ile Ser Ser Ala Ser Ile Val Val
65           70           75           80

Thr Asp Pro Glu Ala Ala Ala Lys Lys Arg Asp Arg Met Ala Arg Glu
          85           90           95

Leu Leu Ser Ser Asn Ser Gly Leu Cys Gln Glu Asp Glu Pro Thr Ile
          100          105          110

Ile Asn Leu Lys Gly Leu Glu His Thr Ile Pro Tyr Arg Leu Ala Val
 115           120           125
    
```

ES 2 522 622 T3

Val Leu Cys Asn Ser Arg Ser Thr Gly Glu Phe Glu Ala Lys Ala Ala  
 130 135 140

Glu Ile Leu Arg Lys Ala Phe His Met Val Asp Tyr Ser Leu Asn Cys  
 145 150 155 160

Phe Asn Pro Glu Ser Glu Leu Ser Arg Val Asn Ser Leu Pro Val Gly  
 165 170 175

Glu Lys His Gln Met Ser Glu Asp Leu Arg His Val Met Glu Cys Thr  
 180 185 190

Ile Ser Val His His Ser Ser Gly Met Gly Phe Asp Pro Ala Ala Gly  
 195 200 205

Pro Ile Ile Ser Arg Leu Arg Gly Ala Met Arg Asp His Asn Asp Met  
 210 215 220

Ser Asp Ile Ser Val Thr Glu Ala Glu Val Glu Leu Phe Ser Leu Ala  
 225 230 235 240

Gln Ser Phe Asp Val Asp Leu Glu Glu Gly Thr Ile Ala Arg Lys His  
 245 250 255

Ser Glu Ala Arg Leu Asp Leu Gly Gly Val Asn Lys Gly Tyr Thr Val  
 260 265 270

Asp Tyr Val Val Asp His Leu Arg Ala Ala Gly Met Pro Asn Val Leu  
 275 280 285

Phe Glu Trp Gly Gly Asp Ile Arg Ala Ser Gly Arg Asn Ile Lys Gly  
 290 295 300

Asn Leu Trp Ala Val Ala Ile Lys Arg Pro Pro Ser Val Glu Glu Val  
 305 310 315 320

Ile Arg Arg Ala Lys Gly Lys Met Leu Lys Met Gly Glu Glu Glu Gln  
 325 330 335

Glu Glu Lys Asp Asp Asp Ser Pro Ser Leu Leu His Val Val Glu Leu  
 340 345 350



ES 2 522 622 T3

Asp Asp Glu Ala Leu Cys Thr Ser Gly Asp Tyr Glu Asn Val Leu Tyr  
 355 360 365  
 His Pro Lys His Gly Val Ala Gly Ser Ile Phe Asp Trp Gln Arg Arg  
 370 375 380  
 Gly Leu Leu Ser Pro Glu Glu Gly Ala Leu Ala Gln Val Ser Val Lys  
 385 390 395 400  
 Cys Tyr Ser Ala Met Tyr Ala Asp Ala Leu Ala Thr Val Cys Leu Val  
 405 410 415  
 Lys Arg Asp Ala Val Arg Ile Arg Tyr Leu Leu Glu Gly Trp Arg Tyr  
 420 425 430  
 Val Arg Ser Arg Val Thr Asn Tyr Phe Ala Tyr Thr Arg Gln Gly Glu  
 435 440 445  
 Arg Leu Ala His Met His Glu Ile Ala Gln Glu Thr Arg Glu Leu Arg  
 450 455 460  
 Glu Ile Arg Ile Ala Gly Ser Leu Pro Ser Arg Ile Val Ile Val Gly  
 465 470 475 480  
 Gly Gly Leu Ala Gly Leu Ser Ala Ala Ile Glu Ala Ala Ser Cys Gly  
 485 490 495  
 Ala Gln Val Ile Leu Met Glu Lys Glu Gly Arg Ile Gly Gly Asn Ser  
 500 505 510  
 Ala Lys Ala Thr Ser Gly Ile Asn Gly Trp Gly Thr Arg Thr Gln Ala  
 515 520 525  
 Lys Ser Asp Ile Leu Asp Gly Gly Lys Tyr Phe Glu Arg Asp Thr Phe  
 530 535 540  
 Leu Ser Gly Val Gly Gly Thr Thr Asp Pro Ala Leu Val Lys Val Leu  
 545 550 555 560  
 Ser Val Lys Ser Gly Asp Ala Ile Gly Trp Leu Thr Ser Leu Gly Val  
 565 570 575  
 Pro Leu Ser Val Leu Ser Gln Leu Gly Gly His Ser Phe Lys Arg Thr

ES 2 522 622 T3

	580						585							590	
His	Arg	Ala	Pro	Asp	Lys	Thr	Asp	Gly	Thr	Pro	Leu	Pro	Ile	Gly	His
	595						600					605			
Thr	Ile	Met	Arg	Thr	Leu	Glu	Asp	His	Ile	Arg	Asn	Asn	Leu	Ser	Glu
	610					615					620				
Arg	Val	Thr	Ile	Met	Thr	His	Val	Ser	Val	Thr	Glu	Leu	Leu	His	Glu
625					630					635					640
Thr	Asp	Thr	Thr	Pro	Asp	Gly	Ala	Ser	Glu	Val	Arg	Val	Thr	Gly	Val
				645					650					655	
Arg	Tyr	Arg	Asp	Leu	Ser	Asp	Val	Asp	Gly	Gln	Pro	Ser	Lys	Leu	Leu
			660					665					670		
Ala	Asp	Ala	Val	Val	Leu	Ala	Thr	Gly	Gly	Phe	Ser	Asn	Asp	Arg	Glu
	675						680					685			
Glu	Asn	Ser	Leu	Leu	Cys	Lys	Tyr	Ala	Pro	His	Leu	Ala	Ser	Phe	Pro
	690					695					700				
Thr	Thr	Asn	Gly	Pro	Trp	Ala	Thr	Gly	Asp	Gly	Val	Lys	Leu	Ala	Thr
705					710					715					720
Ser	Val	Gly	Ala	Lys	Leu	Val	Asp	Met	Asp	Lys	Val	Gln	Leu	His	Pro
				725					730					735	
Thr	Gly	Leu	Ile	Asp	Pro	Lys	Asp	Pro	Ala	Asn	Thr	Thr	Lys	Ile	Leu
			740					745					750		
Gly	Pro	Glu	Ala	Leu	Arg	Gly	Ser	Gly	Gly	Ile	Leu	Leu	Asn	Lys	Gln
	755						760					765			
Gly	Lys	Arg	Phe	Val	Asn	Glu	Leu	Asp	Leu	Arg	Ser	Val	Val	Ser	Lys
	770					775					780				
Ala	Ile	Asn	Thr	Gln	Gly	Asn	Glu	Tyr	Pro	Gly	Ser	Gly	Gly	Cys	Tyr
785					790					795					800
Phe	Ala	Tyr	Cys	Val	Leu	Asn	Glu	Asp	Ala	Thr	Asn	Leu	Phe	Cys	Gly
				805					810						815

ES 2 522 622 T3

Gly Ala Leu Gly Phe Tyr Gly Lys Lys Leu Gly Leu Phe Gln Arg Ala  
 820 825 830

Glu Thr Val Glu Glu Leu Ala Lys Leu Ile Gly Cys Asp Glu Gly Glu  
 835 840 845

Leu Arg Asp Thr Leu Glu Lys Tyr Glu Thr Cys Ser Lys Ala Lys Val  
 850 855 860

Ala Cys Pro Val Thr Gly Lys Val Val Phe Pro Cys Val Val Gly Thr  
 865 870 875 880

Arg Gly Pro Tyr Asn Val Ala Phe Val Thr Pro Ser Ile His Tyr Thr  
 885 890 895

Met Gly Gly Cys Leu Ile Ser Pro Ala Ala Glu Val Leu Gln Glu Tyr  
 900 905 910

Lys Gly Leu Asn Ile Leu Glu Asn His Arg Pro Ile Arg Cys Leu Phe  
 915 920 925

Gly Ala Gly Glu Val Thr Gly Gly Val His Gly Gly Asn Arg Leu Gly  
 930 935 940

Gly Asn Ser Leu Leu Glu Cys Val Val Phe Gly Lys Ile Ala Gly Asp  
 945 950 955 960

Arg Ala Ala Thr Ile Leu Gln Lys Arg Glu Ile Ala Leu Ser Lys Thr  
 965 970 975

Ser Trp Thr Ser Val Val Val Arg Glu Ser Arg Ser Gly Glu Gln Phe  
 980 985 990

Gly Thr Gly Ser Arg Val Leu Arg Phe Asn Leu Pro Gly Ala Leu Gln  
 995 1000 1005

Arg Thr Gly Leu Asn Leu Gly Glu Phe Val Ala Ile Arg Gly Glu  
 1010 1015 1020

Trp Asp Gly Gln Gln Leu Val Gly Tyr Phe Ser Pro Ile Thr Leu  
 1025 1030 1035

ES 2 522 622 T3

Pro Glu Asp Leu Gly Thr Ile Ser Leu Leu Val Arg Ala Asp Lys  
 1040 1045 1050

Gly Thr Leu Lys Glu Trp Ile Cys Ala Leu Arg Pro Gly Asp Ser  
 1055 1060 1065

Val Glu Ile Lys Ala Cys Gly Gly Leu Arg Ile Asp Gln Asp Pro  
 1070 1075 1080

Val Lys Lys Cys Leu Leu Phe Arg Asn Arg Pro Ile Thr Arg Phe  
 1085 1090 1095

Ala Leu Val Ala Ala Gly Thr Gly Val Ala Pro Met Leu Gln Val  
 1100 1105 1110

Ile Arg Ala Ala Leu Lys Lys Pro Tyr Val Asp Thr Leu Glu Ser  
 1115 1120 1125

Ile Arg Leu Ile Tyr Ala Ala Glu Glu Tyr Asp Thr Leu Thr Tyr  
 1130 1135 1140

Arg Ser Ile Leu Gln Arg Phe Ala Glu Glu Phe Pro Asp Lys Phe  
 1145 1150 1155

Val Cys Asn Phe Val Leu Asn Asn Pro Pro Glu Gly Trp Thr Gly  
 1160 1165 1170

Gly Val Gly Phe Val Asn Lys Lys Ser Leu Gln Lys Val Leu Gln  
 1175 1180 1185

Pro Pro Ser Ser Glu Pro Leu Ile Val Val Cys Gly Pro Pro Val  
 1190 1195 1200

Met Gln Arg Asp Val Lys Asn Glu Leu Leu Ser Met Gly Tyr Asp  
 1205 1210 1215

Lys Glu Leu Val His Thr Val Asp Gly Glu Ser Gly Thr Leu  
 1220 1225 1230

<210> 2

<211> 3698

<212> ADN

5 <213> *Trypanosoma brucei*

<400> 2

ES 2 522 622 T3

atgctctcaa cgaagcaact tctccttoga gccacatctg cattagtggc gggaaagtct 60  
ggagttaggc gagacagccc ttcgcttgtc ggcgacctt gcgactcggg ttcaccaacg 120  
cgggtcgtat gggggcgctt cttcaaatcc cttagcgccac ccgctccctc ggttgtttca 180  
tgtcaaaagc gttttacgtc ccatggcgcc gatggatttt cctcggcttc gattgttgtc 240  
actgaccogg aggcggcagc aaagaagcgt gaccgcatgg cgcgcgagtt gctctcaagt 300  
aatagtggtc tttgtcaaga agatgaaccc actatcatta acttaaaggg gttggagcac 360  
acgattccgt acaggctcgc cgtggttctt tgtaactcgc gctctacagg tgaattcgaa 420  
gcaaaggcag ctgagatttt gcgaaaggca tttcacatgg tggactactc cctcaattgt 480  
ttcaatcctg aaagcgagtt gtcgctgtc aactctctgc cgggtgggtga gaagcatcaa 540  
atgctcggagg atctccggca cgtgatggag tgcaacctca gtgtacatca ctccagcgga 600  
atgggcttcg acccggcggc aggtccaatt atcagccgac ttcggggggc aatgagggac 660  
cacaacgaca tgtccgacat ttccgtaacg gaagccgagg tagagctctt ctcccttagcg 720  
caaagttttg acgtggacct cgaggaggga acaatagctc gcaagcactc tgaagcgagg 780  
cttgatcttg gtgggtgtaa caaaggctac acagttgatt atgtagtgga tcatcttctg 840  
gcggccggta tgccaaacgt gctctttgag tggggcgggg atattcagac gtcgggtagg 900  
aacatcaaaag gaaacctatg ggcagttgct atcaaacgac cgccatctgt ggaggaggtg 960  
attcggcgcg ccaaagggaa aatgttaaaa atggggggagg aggagcagga agagaaggac 1020  
gatgattctc catccctgct tcatgtggtg gagcttgatg atgaagccct ttgcaccagt 1080  
ggtgactacg aaaacgtttt gtatcatcca aagcatggag tggcggggag catttttgac 1140  
tggcagcgaa gggggctact atctcctgag gaaggggcac tcgctcaagt gtctgtgaaa 1200  
tgttatagcg caatgtacgc tgatgctctg gcaacagtggt gccttgtgaa gcgtgatgct 1260  
gtgaggattc gctacttatt agaggcctgg cgttacgctc gaagtcgtgt gacgaattac 1320  
tttgccata cccgtcaggg cgagcgggta gcacatatgc acgagatagc gcaagaaaca 1380  
cgggagctac gtgaaatacg gattgccggg agtttgccct ccagaattgt tattgtgggt 1440  
ggaggtctag cgggoccttc agcggccatc gaagccgcaa gttgtgggtgc acaagtcata 1500  
ctcatggaaa aggaaggaag aatcgggggg aacagcgcaa aggctacatc aggtattaat 1560  
gggtggggga cgcgtacgca ggcaaagtca gatattctcg acggtggaaa gtattttgag 1620  
cgtgacactt ttctctctgg cgttggcggg actaccgatc ctgccctcgt caaagtgctc 1680

ES 2 522 622 T3

tcagttaaga gtggggacgc aattggttgg cttacttctc ttggtgtgcc actcagtgtc 1740  
ctctcgcaac ttggtggcca cagtttcaag cgaaccacc gtgccccga caaaacggac 1800  
gggacacccc taccaattgg tcatacgatc atgagaaccc tcgaggatca catccgtaac 1860  
aacctctctg agcgagtaac gattatgaca catgtgtccg tgaccgagtt attgcacgaa 1920  
accgatacaa cacctgatgg cgcctccgaa gtgctgttta cgggtgtaag atacagggac 1980  
ctctccgatg tggatggcca gccatcaaaa ttgcttgccg atgccgtcgt tcttgcaact 2040  
ggtggtttct ccaatgaccg tgaagaaaat tcaactgctct gcaagtatgc gcotcacctg 2100  
gccagtttct caacgacaaa tggcccctgg gcgaccggtg acggggttaa actcgcaaca 2160  
tcggttgggtg caaagcttgt ggatatggat aaggttcagc tacaccccac agggttatac 2220  
gatccaaagg atccccgcaa cacaacgaag attctcggcc cggaggcact ccgaggttca 2280  
ggtgggatat tactcaacaa gcaaggaaag cgcttcgtga atgaactga cctccgctct 2340  
gttgtatcca aggcaattaa tacgcagggt aatgaatacc ctggatccgg tggatgttac 2400  
tttgcgtact gcgtgctcaa cgaagatgca acaaacctct tctgtggcgg tgcactgggg 2460  
ttctacggaa agaagcttgg tttgttccag cgtgctgaga ctgtggaaga gttggccaaa 2520  
ctgattggct gtgacgaagg tgaattacgg gatacgcttg aaaagtatga aacttgacgc 2580  
aaggccaaag ttgcgtgccc tgtgacgggg aaggtagtat tcccttgtgt ggtgggtaca 2640  
agggggccgt acaatgttgc ttttgtcacg ccttccattc attacacaat ggggtggctgc 2700  
ctcatttcac cggctgctga agttcttcag gagtacaag gtttaaatat tctgaaaaac 2760  
catagaccga ttogatgctt gtttgggtgcc ggtgaagtga cgggtggtgt gcacggtggt 2820  
aaccgccttg gtggaattc gctcttgaa tgtgtggtat tcgggaaaat tgcgggtgac 2880  
cgtgccgcaa caatacttca aaaacgtgag atagccctct ccaagacgag ttggacttcc 2940  
gttgttgtac gtgagtcccg ctccggcgaa cagttcggga cggctctcg tgttctcgt 3000  
tttaacctac ctggggcgct gcagcgaca ggtctcaato tgggcgaatt tgtggccatc 3060  
cgtggcgagt gggacggcca acaacttgtt gggtacttca gtccaattac actaccagag 3120  
gaccttgga ctatctccct tctggtcgt gccgacaagg gcacattgaa ggaatggatc 3180  
tgcgccttgc gaccggcgca ctccgtcgaa atcaaagcgt gtggaggtct tcgtattgat 3240  
caagaccgg taaagaagtg tctgctgttt cgtaaccggc ctattacgcg gtttgcctt 3300  
gtcgcggcag ggactggtgt cgcgccatg ttgcaggtta ttctgctggc actcaagaag 3360  
ccttacgtgg acacgttgg aagcatccgt cttatatacg ccgcagaaga gtacgacaca 3420  
ttgacgtatc gctcaatttt gcagcggttt gcggaagagt tccccgacaa gttcgtctgc 3480  
aacttcgttc ttaacaaccc acccgaaggg tggacaggtg gagtggggtt tgtcaacaaa 3540  
aatccctgc agaagggtct gcaaccgcca tcgagtgagc cgctgattgt tgtgtgtgga 3600  
ccgccgtga tgcagcgcga cgtgaagaat gagttactga gcatgggtta tgacaaagag 3660  
ctegtccata cggttgacgg cgagtcggga acgctgta 3698

<210> 3

<211> 1164

ES 2 522 622 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> FRDm de Trypanosoma que carece de la señal de localización de 68 aa

5 <400> 3

```

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

Ala Ala Ala Lys Lys Arg Asp Arg Met Ala Arg Glu Leu Leu Ser Ser
20          25          30

Asn Ser Gly Leu Cys Gln Glu Asp Glu Pro Thr Ile Ile Asn Leu Lys
35          40          45

Gly Leu Glu His Thr Ile Pro Tyr Arg Leu Ala Val Val Leu Cys Asn
50          55          60

Ser Arg Ser Thr Gly Glu Phe Glu Ala Lys Ala Ala Glu Ile Leu Arg
65          70          75          80

Lys Ala Phe His Met Val Asp Tyr Ser Leu Asn Cys Phe Asn Pro Glu
85          90          95

Ser Glu Leu Ser Arg Val Asn Ser Leu Pro Val Gly Glu Lys His Gln
100         105         110

Met Ser Glu Asp Leu Arg His Val Met Glu Cys Thr Ile Ser Val His
115         120         125

His Ser Ser Gly Met Gly Phe Asp Pro Ala Ala Gly Pro Ile Ile Ser
130         135         140

```

ES 2 522 622 T3

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



ES 2 522 622 T3

Val Thr Asn Tyr Phe Ala Tyr Thr Arg Gln Gly Glu Arg Leu Ala His  
 370 375 380

Met His Glu Ile Ala Gln Glu Thr Arg Glu Leu Arg Glu Ile Arg Ile  
 385 390 395 400

Ala Gly Ser Leu Pro Ser Arg Ile Val Ile Val Gly Gly Gly Leu Ala  
 405 410 415

Gly Leu Ser Ala Ala Ile Glu Ala Ala Ser Cys Gly Ala Gln Val Ile  
 420 425 430

Leu Met Glu Lys Glu Gly Arg Ile Gly Gly Asn Ser Ala Lys Ala Thr  
 435 440 445

Ser Gly Ile Asn Gly Trp Gly Thr Arg Thr Gln Ala Lys Ser Asp Ile  
 450 455 460

Leu Asp Gly Gly Lys Tyr Phe Glu Arg Asp Thr Phe Leu Ser Gly Val  
 465 470 475 480

Gly Gly Thr Thr Asp Pro Ala Leu Val Lys Val Leu Ser Val Lys Ser  
 485 490 495

Gly Asp Ala Ile Gly Trp Leu Thr Ser Leu Gly Val Pro Leu Ser Val  
 500 505 510

Leu Ser Gln Leu Gly Gly His Ser Phe Lys Arg Thr His Arg Ala Pro  
 515 520 525

Asp Lys Thr Asp Gly Thr Pro Leu Pro Ile Gly His Thr Ile Met Arg  
 530 535 540

Thr Leu Glu Asp His Ile Arg Asn Asn Leu Ser Glu Arg Val Thr Ile  
 545 550 555 560

Met Thr His Val Ser Val Thr Glu Leu Leu His Glu Thr Asp Thr Thr  
 565 570 575

Pro Asp Gly Ala Ser Glu Val Arg Val Thr Gly Val Arg Tyr Arg Asp  
 580 585 590

ES 2 522 622 T3

Leu Ser Asp Val Asp Gly Gln Pro Ser Lys Leu Leu Ala Asp Ala Val  
 595 600 605

Val Leu Ala Thr Gly Gly Phe Ser Asn Asp Arg Glu Glu Asn Ser Leu  
 610 615 620

Leu Cys Lys Tyr Ala Pro His Leu Ala Ser Phe Pro Thr Thr Asn Gly  
 625 630 635 640

Pro Trp Ala Thr Gly Asp Gly Val Lys Leu Ala Thr Ser Val Gly Ala  
 645 650 655

Lys Leu Val Asp Met Asp Lys Val Gln Leu His Pro Thr Gly Leu Ile  
 660 665 670

Asp Pro Lys Asp Pro Ala Asn Thr Thr Lys Ile Leu Gly Pro Glu Ala  
 675 680 685

Leu Arg Gly Ser Gly Gly Ile Leu Leu Asn Lys Gln Gly Lys Arg Phe  
 690 695 700

Val Asn Glu Leu Asp Leu Arg Ser Val Val Ser Lys Ala Ile Asn Thr  
 705 710 715 720

Gln Gly Asn Glu Tyr Pro Gly Ser Gly Gly Cys Tyr Phe Ala Tyr Cys  
 725 730 735

Val Leu Asn Glu Asp Ala Thr Asn Leu Phe Cys Gly Gly Ala Leu Gly  
 740 745 750

Phe Tyr Gly Lys Lys Leu Gly Leu Phe Gln Arg Ala Glu Thr Val Glu  
 755 760 765

Glu Leu Ala Lys Leu Ile Gly Cys Asp Glu Gly Glu Leu Arg Asp Thr  
 770 775 780

Leu Glu Lys Tyr Glu Thr Cys Ser Lys Ala Lys Val Ala Cys Pro Val  
 785 790 795 800

Thr Gly Lys Val Val Phe Pro Cys Val Val Gly Thr Arg Gly Pro Tyr  
 805 810 815

Asn Val Ala Phe Val Thr Pro Ser Ile His Tyr Thr Met Gly Gly Cys

ES 2 522 622 T3

820	825	830																				
Leu	Ile	Ser	Pro	Ala	Ala	Glu	Val	Leu	Gln	Glu	Tyr	Lys	Gly	Leu	Asn							
		835					840					845										
Ile	Leu	Glu	Asn	His	Arg	Pro	Ile	Arg	Cys	Leu	Phe	Gly	Ala	Gly	Glu							
	850					855					860											
Val	Thr	Gly	Gly	Val	His	Gly	Gly	Asn	Arg	Leu	Gly	Gly	Asn	Ser	Leu							
865					870					875					880							
Leu	Glu	Cys	Val	Val	Phe	Gly	Lys	Ile	Ala	Gly	Asp	Arg	Ala	Ala	Thr							
				885					890						895							
Ile	Leu	Gln	Lys	Arg	Glu	Ile	Ala	Leu	Ser	Lys	Thr	Ser	Trp	Thr	Ser							
			900					905						910								
Val	Val	Val	Arg	Glu	Ser	Arg	Ser	Gly	Glu	Gln	Phe	Gly	Thr	Gly	Ser							
		915					920						925									
Arg	Val	Leu	Arg	Phe	Asn	Leu	Pro	Gly	Ala	Leu	Gln	Arg	Thr	Gly	Leu							
	930					935					940											
Asn	Leu	Gly	Glu	Phe	Val	Ala	Ile	Arg	Gly	Glu	Trp	Asp	Gly	Gln	Gln							
945					950					955					960							
Leu	Val	Gly	Tyr	Phe	Ser	Pro	Ile	Thr	Leu	Pro	Glu	Asp	Leu	Gly	Thr							
				965					970						975							
Ile	Ser	Leu	Leu	Val	Arg	Ala	Asp	Lys	Gly	Thr	Leu	Lys	Glu	Trp	Ile							
			980					985						990								
Cys	Ala	Leu	Arg	Pro	Gly	Asp	Ser	Val	Glu	Ile	Lys	Ala	Cys	Gly	Gly							
		995					1000							1005								
Leu	Arg	Ile	Asp	Gln	Asp	Pro	Val	Lys	Lys	Cys	Leu	Leu	Phe	Arg								
	1010					1015						1020										
Asn	Arg	Pro	Ile	Thr	Arg	Phe	Ala	Leu	Val	Ala	Ala	Gly	Thr	Gly								
	1025					1030						1035										
Val	Ala	Pro	Met	Leu	Gln	Val	Ile	Arg	Ala	Ala	Leu	Lys	Lys	Pro								
	1040					1045						1050										

ES 2 522 622 T3

Tyr Val Asp Thr Leu Glu Ser Ile Arg Leu Ile Tyr Ala Ala Glu  
1055 1060 1065

Glu Tyr Asp Thr Leu Thr Tyr Arg Ser Ile Leu Gln Arg Phe Ala  
1070 1075 1080

Glu Glu Phe Pro Asp Lys Phe Val Cys Asn Phe Val Leu Asn Asn  
1085 1090 1095

Pro Pro Glu Gly Trp Thr Gly Gly Val Gly Phe Val Asn Lys Lys  
1100 1105 1110

Ser Leu Gln Lys Val Leu Gln Pro Pro Ser Ser Glu Pro Leu Ile  
1115 1120 1125

Val Val Cys Gly Pro Pro Val Met Gln Arg Asp Val Lys Asn Glu  
1130 1135 1140

Leu Leu Ser Met Gly Tyr Asp Lys Glu Leu Val His Thr Val Asp  
1145 1150 1155

Gly Glu Ser Gly Thr Leu  
1160

<210> 4

<211> 1142

<212> PRT

5 <213> *Trypanosoma brucei*

<400> 4

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  
50 55 60

ES 2 522 622 T3

Arg Ala Lys Glu Val Ala Asp Glu Val Leu Arg Cys Ala Trp Gln Leu  
 65 70 75 80  
 Ala Asp Thr Val Leu Asn Ser Phe Asn Pro Asn Ser Glu Val Ser Leu  
 85 90 95  
 Val Gly Arg Leu Pro Val Gly Gln Lys His Gln Met Ser Ala Pro Leu  
 100 105 110  
 Lys Arg Val Met Ala Cys Cys Gln Arg Val Tyr Asn Ser Ser Ala Gly  
 115 120 125  
 Cys Phe Asp Pro Ser Thr Ala Pro Val Ala Lys Ala Leu Arg Glu Ile  
 130 135 140  
 Ala Leu Gly Lys Glu Arg Asn Asn Ala Cys Leu Glu Ala Leu Thr Gln  
 145 150 155 160  
 Ala Cys Thr Leu Pro Asn Ser Phe Val Ile Asp Phe Glu Ala Gly Thr  
 165 170 175  
 Ile Ser Arg Lys His Glu His Ala Ser Leu Asp Leu Gly Gly Val Ser  
 180 185 190  
 Lys Gly Tyr Ile Val Asp Tyr Val Ile Asp Asn Ile Asn Ala Ala Gly  
 195 200 205  
 Phe Gln Asn Val Phe Phe Asp Trp Gly Gly Asp Cys Arg Ala Ser Gly  
 210 215 220  
 Met Asn Ala Arg Asn Thr Pro Trp Val Val Gly Ile Thr Arg Pro Pro  
 225 230 235 240  
 Ser Leu Asp Met Leu Pro Asn Pro Pro Lys Glu Ala Ser Tyr Ile Ser  
 245 250 255  
 Val Ile Ser Leu Asp Asn Glu Ala Leu Ala Thr Ser Gly Asp Tyr Glu  
 260 265 270  
 Asn Leu Ile Tyr Thr Ala Asp Asp Lys Pro Leu Thr Cys Thr Tyr Asp  
 275 280 285  
 Trp Lys Gly Lys Glu Leu Met Lys Pro Ser Gln Ser Asn Ile Ala Gln

ES 2 522 622 T3

290		295		300
Val Ser Val Lys Cys Tyr Ser Ala Met Tyr Ala Asp Ala Leu Ala Thr 305		310		315
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
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
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
Pro Ile Gly Phe Thr Ile Met Lys Thr Leu Glu Asp His Val Arg Gly 515		520		525

ES 2 522 622 T3

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

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

ES 2 522 622 T3

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  
 965 970 975



ES 2 522 622 T3

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 Ser Lys Ile  
 1130 1135 1140

<210> 5

<211> 3429

<212> ADN

5 <213> *Trypanosoma brucei*

<400> 5

atggtagacg ggcgatcttc tgcacaaatt gttgccgttg atcccgaag ggctgcgcgt 60  
 gagcgcgacg cagcagcgcg tgccttctt caagacagtc cgctacacac gaccatgcaa 120  
 tatgcaacgt ctggtcttga gcttaccggt ccctatgcac ttaaggtggt tgccagtgct 180  
 gacaccttcg atcgcgctaa ggaggttgc gatgaggtgc tacgctgccc atggcaactc 240

ES 2 522 622 T3

gccgacaccg tghtgaacag tttcaaccgg aacagtgagg tttcactcgt gggctgcctg 300  
 cctgtggggc agaagcacca aatgtctgct ccaactcaagc gtgtgatggc atgctgccag 360  
 cgtgtgtata actcatcggc tggatgtttt gatccctcca cagcaccogt cgcaaaggcg 420  
 ctgctgtgaga ttgactggg gaaggagcgg aacaatgctt gtctggaggc acttactcaa 480  
 gcgtgtacgc ttccaacag ttttgtgac gatttogaag ctggaactat cagccgtaag 540  
 cacgagcatg cgtctctgga cctaggtggg gttagcaaag gttatatcgt tgattatgtc 600  
 attgataata tcaatgctgc tggatttcaa aacgtttttt ttgactgggg tggagactgc 660  
 cgtgcgagtg gtatgaatgc gcgcaatacc ccgtgggttg ttggtataac tcgccctccg 720  
 tcccttgata tgctccctaa cccgccaaag gaggcgtcgt atacagcgt tatctctctc 780  
 gacaacgagg cccttgccac gagtggcgat tatgaaaact taatatacac cgctgatgat 840  
 aaaccctta cctgcactta tgactggaag ggaaggaac tgatgaaacc ttctcagtcc 900  
 aatatcgcgc aggtatcggg taaatgttat agcgcctatg acgctgacgc gcttgcgact 960  
 gcgtgtttca taaagcggga tccgcggaag gttcgacagc tgctggacgg ttggcggtac 1020  
 gtgctgata cagtgagaga ttacagggtc tacgttcgtg aaaatgagcg agtagcgaag 1080  
 atgtttgaga tgcacacaga ggatgcggaa atgaggaaga ggcggatcag caacacactt 1140  
 ccgctcgtg tcattgtggt gggcgggtgt cttgcgggtt tgcctcggc catcgaagct 1200  
 gcaggatgcg gtgctcaggt tgtgcttatg gagaaggagg cgaagctcgg aggcaacagc 1260  
 gccaaaggca catctggtat caacggatgg ggcacacgtg ctccaggcga ggcaagcatt 1320  
 gtggatggtg gaaataactt cgagcgtgac acatacaagt ctggtatcgg gggtaacacc 1380  
 gatcctgcc ttgtgaagac actttctatg aaaagtgtg acgctattgg gtggtgacc 1440  
 tcgttgggtg taccgctgac ggtattgtca cagcttgggg gtcacagccg caagcgcaca 1500  
 catcgggcac cggataagaa agatggtaca cctctaccta tcggatttac aatcatgaaa 1560  
 accctcgagg atcacgtgcg tggtaacott tctggccgca tcaccataat ggaaaactgc 1620  
 agtgtaacgt cgttgctcag tgagacgaag gaacggccag atggcactaa acagatacga 1680  
 gttactggtg tggagttcac gcaggctggc agtgggaaga cgaccatact tgcagatgct 1740  
 gtcaccttg ccaactggtg attttctaac gacaaaactg cagactccct gcttcgtgag 1800  
 cacgccccgc acttgggtcaa cttccctacg acgaatggcc cgtgggcgac aggtgatggc 1860  
 gtgaaacttg cacagcgact tggcgtcaa ctggtggata tggacaaggc ccagttgcat 1920

ES 2 522 622 T3

ccgacaggcc tcacaaacc gaaggatcca gcgaacccta caaagttcct tggacctgag 1980  
 gcgctacgtg gatccgggtg cgttttggtg aacaagcaag gcaagcgctt cgtaaatgaa 2040  
 cttgacctcc gttctgtggt atcgaaagcc atcatggaac aggggtcgga atatoctgga 2100  
 tcgggtggta gcatgttcgc ctactgtgtg ttgaatgctg cggcgcagaa gctctttggt 2160  
 gtcagctcac acgagttcta ctggaagaag atgggtctct tcgtgaaggc tgacaccatg 2220  
 agggacctcg ctgcactcat tgggtgcccc gtggaatctg tgcagcagac gctggaggag 2280  
 tacgagcggc tctccatata acagcgttcc tgccccatca cgcgcaaaag cgtctatccg 2340  
 tgcgtgctcg gactaaggg ccctactac gtgcgcttcg tgacaccttc gattcactac 2400  
 acaatgggtg gatgtctcat ctgccttct gctgaaatac aaatgaagaa cacatcatca 2460  
 cgcgctccac tgagtcacag caacccaatc ctcggttat ttggtgcccg tgaggtaacg 2520  
 ggtggtgtgc acggtgggaa ccggttgggc ggcaattcgc tgcttgagtg cgtcgtgttt 2580  
 gggagaattg cgggtgatcg ggcctcgacc atccttcaga ggaagtcctc agcactttcc 2640  
 ttcaagggtg ggaagaccgt ggtgctgcgt gaagtacgcg aagggtggtg gtacgggtgct 2700  
 gggccocgcg tgcttcgctt taatttaccg ggggcgctgc aacggtctgg tctgagcctc 2760  
 ggccaattta tcgcaattcg tgggtattgg gacggtcagc agttgatcgg ttattacagt 2820  
 cccatcaagc tgccagatga tcttggcatg atcgatatac tcgcccagag tgataagggg 2880  
 acgctgaggg agtggatttc cgctctggag ccgggtgacg ctgtggagat gaaggcatgc 2940  
 ggtggtctgg tgattgagcg ccgcttaagc gataagcact ttgtgttcat gggacacatt 3000  
 atcaacaagc tttgtctaata tgctggtgga acgggtgtgg caccgatgct gcaaataatc 3060  
 aaagcagcct ttatgaaacc cttcattgac acattggaga gcgttcatct catctatgcc 3120  
 gcggaggacg tgacggagtt gacgtatcgc gaggtgctgg aggagcgcg tcgtgagtca 3180  
 cgtggaaagt tcaagaaaac gtttgtcctc aaccggcccc cgccttatg gactgatggt 3240  
 gttggcttca tcgaccgggg catcctcaca aatcatgtgc agccgccatc tgacaacctg 3300  
 ctggtggcca tatgoggacc accgtaatg cagcgcattg taaaggcgac cctgaagact 3360  
 ttgggttaca acatgaacct tgtgaggact gtggatgaaa cggagccgag cggctcatcc 3420  
 aaaatttga 3429

<210> 6

<211> 1139

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> FRDg que carece de la señal de localización C-terminal de 3 aa

<400> 6

ES 2 522 622 T3

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  
 50 55 60

Arg Ala Lys Glu Val Ala Asp Glu Val Leu Arg Cys Ala Trp Gln Leu  
 65 70 75 80

Ala Asp Thr Val Leu Asn Ser Phe Asn Pro Asn Ser Glu Val Ser Leu  
 85 90 95

Val Gly Arg Leu Pro Val Gly Gln Lys His Gln Met Ser Ala Pro Leu  
 100 105 110

Lys Arg Val Met Ala Cys Cys Gln Arg Val Tyr Asn Ser Ser Ala Gly  
 115 120 125

Cys Phe Asp Pro Ser Thr Ala Pro Val Ala Lys Ala Leu Arg Glu Ile  
 130 135 140

Ala Leu Gly Lys Glu Arg Asn Asn Ala Cys Leu Glu Ala Leu Thr Gln  
 145 150 155 160

Ala Cys Thr Leu Pro Asn Ser Phe Val Ile Asp Phe Glu Ala Gly Thr  
 165 170 175

Ile Ser Arg Lys His Glu His Ala Ser Leu Asp Leu Gly Gly Val Ser  
 180 185 190

Lys Gly Tyr Ile Val Asp Tyr Val Ile Asp Asn Ile Asn Ala Ala Gly  
 195 200 205

ES 2 522 622 T3

Phe Gln Asn Val Phe Phe Asp Trp Gly Gly Asp Cys Arg Ala Ser Gly  
 210 215 220

Met Asn Ala Arg Asn Thr Pro Trp Val Val Gly Ile Thr Arg Pro Pro  
 225 230 235 240

Ser Leu Asp Met Leu Pro Asn Pro Pro Lys Glu Ala Ser Tyr Ile Ser  
 245 250 255

Val Ile Ser Leu Asp Asn Glu Ala Leu Ala Thr Ser Gly Asp Tyr Glu  
 260 265 270

Asn Leu Ile Tyr Thr Ala Asp Asp Lys Pro Leu Thr Cys Thr Tyr Asp  
 275 280 285

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

ES 2 522 622 T3

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

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

ES 2 522 622 T3

	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					
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					

ES 2 522 622 T3

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  
 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> 7

<211> 3498

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Codón de FRDm1 optimizado para *A. niger*



ES 2 522 622 T3

<400> 7

atgggtgccg atggtatctc ctctgcctcc attgtcgtca ccgaccccga ggctgctgcc	60
aagaagcgtg accgcatggc ccgtgagctc ctctcctcca actccggctc ttgccaggag	120
gatgagccca ccatcatcaa cctgaagggt ctggaacaca ccatccccta ccgtcttget	180
gttgtccttt gcaactctcg cagcactggg gaattcgagg ccaaggctgc tgagatcctc	240
cgcaaggctt tocacatggt tgactactct ctgaaactgt tcaaccccga gtccgagctc	300
tcccgtgtca acagcttgcc tgcgggtgag aagcaccaga tgagcgaaga tctgcgccac	360
gtcatggagt gcaccatctc cgtccaccac tctctggca tgggtttcga cctgctgct	420
ggccccatca tctcccgtct gcgtgggtgcc atgcgcgacc acaacgacat gtccgacatc	480
tccgtcaccg aggctgaggt tgagctgttc togctagcgc agtcgttcga tgttgacctc	540
gaggagggca ccattgctcg caagcactcc gaggctcgcc tcgacctgg tgggtgtcaac	600
aagggtaca ctggtgacta cgtgggtggac cacctccgag ctgctggcat gcccaacgtc	660
ctgttcgaat ggggtggtga catccgtgcc tccggccgca acatcaaggg caacctctgg	720
gctgttgcca tcaagcgccc tcctccggt gaggaggtca tccgccgtgc caaggcaag	780
atgctcaaga tgggtgaaga agaacaggag gagaaggatg atgactctcc cagcctctg	840
cacgttggtg agctcgatga tgaggccctc tgcacctccg gtgactacga gaacgtcctc	900
taccacccga agcacggtgt tgctggcagc atcttcgact ggcagcgcg tggctctgctg	960
tctcctgagg aggggtgctc tgctcaggt tccgtcaagt gctactctgc catgtacgcc	1020
gatgcccttg ccaccgtctg cctgggtcaag cgtgatgccg tccgtatccg ctacctctg	1080
gaaggctggc gctacgtcg ctctcgtgtc accaactact tcgcctacac ccgccagggt	1140
gagcgtcttg ctcacatgca cgaattgcc caggagactc gtgagctccg tgagatccgc	1200

ES 2 522 622 T3

attgctggct cctcccctc ccgtaatcgtc atcgtcgggtg gtggctctggc cggctctgtct 1260  
 gctgccattg aggctgcctc ctgcgggtgct caggctcatcc tgatggagaa ggagggctcgt 1320  
 attggtggca actctgccaa ggccacctcc ggtatcaacg gctgggggtac tcgcactcag 1380  
 gccaaagtccg acatcctgga tggcggcaag tacttcgagc gtgacacctt cctgagcgggt 1440  
 gttggtggta ccaactgacct tgctctggtc aaggctcctct ccgtcaagtc cggatgatgcc 1500  
 attggtgggt tgaccagcct tgggtttcct ctttctgttc tctcccagct gggatggctac 1560  
 tctttcaagc gtaaccaccg tgctcctgac aagactgatg gcactcctct ccccatcgggt 1620  
 cacaccatca tgcgcacctc cgaggaccac atccgcaaca acctgagcga acgtgtcacc 1680  
 atcatgacct acgtttccgt cactgagctc ctccacgaga ctgacaccac tcccgatgggt 1740  
 gctcccgagg tccgtgtcac cgggtgtccgc taccgtgacc tctccgatgt tgacggccag 1800  
 cccagcaagc tcttgccga tgcggtgtc cttgccactg gtggtttctc caacgaccgc 1860  
 gaggagaaca gcttgctttg caagtaagcc cccacctgg cctccttccc caccaccaac 1920  
 ggcccttggg ccaactggtga tgggtgcaag ctggccacct ccgtcgggtc caagctcgtc 1980  
 gacatggaca aggtccagct gcacccact ggcttgattg accccaagga ccccgccaac 2040  
 accaccaaga tctggggccc cgaggctctc cgtggcagcg gtggtatcct gctcaacaag 2100  
 cagggcaagc gcttcgtcaa cgagcttgac ctccgagcg ttgtctocaa ggccatcaac 2160  
 actcagggca acgaataccc cggcagcgggt ggctgctact tcgcctactg cgtgttgaac 2220  
 gaagatgcca ccaacctgtt ctgcgggtgggt gctcttgat tctacggcaa gaagcttgggt 2280  
 ctgttccagc gtgctgagac tggtgaggag cttgcccaagt tgattggctg cgatgagggc 2340  
 gagctccgtg acaccctcga gaagtacgag acttgctcga agccaaggt tgctgcccc 2400  
 gtgaccggca aggtcgtggt cccctgcggt gttggtacct gtggtcccta caacgtcgtc 2460  
 ttcgtcacc cctccatcca ctacaccatg ggtggctgct tgatttctcc tgctgctgag 2520  
 gtcctccagg aatacaaggg tctgaacatc ctggagaacc accgtcccat tcgctgcttg 2580  
 ttcggtgctg gtgaagtca cgggtggtgc cacgggtggca accgcctggg tggcaactcc 2640  
 ctctcagagt gcgttggtt cggcaagatc gctgggtgacc gtgctgccac cattctccag 2700  
 aagcgcgaaa ttgcctctc caagaccagc tggacctccg tcgtcgtccg cgagtcctccg 2760  
 tctggcgagc agttcggtag cggctctcgt gtcctccgct tcaacctgcc cggatgctctc 2820  
 cagcgcactg gtctgaacct gggatgagttc gtcgccatcc gtggtgaatg ggatggccag 2880

ES 2 522 622 T3

cagctggtcg gctacttctc ccccatcacc ctccccgaag atcttggtac catctcctc 2940  
 ctggtccgtg ccgacaaggg caccctcaag gaatggatat gtgccctccg ccccggtgac 3000  
 agcgttgaga tcaaggcctg cgggtggtctg cgtatcgacc aggaccctgt caagaagtgc 3060  
 ttgctattcc gcaaccgccc catcaccgcg ttcgctcttg ttgctgctgg tactggtggt 3120  
 gctcccattg tccaggtcat ccgtgctgct ctcaagaagc octacgtgga tacattggag 3180  
 tccatccgtc tgatctacgc tgctgaagaa taagacacc tgacctacc ctccatcctc 3240  
 cagcgttctg ctgaggagt ccccgacaag ttgctctgca acttcgtcct caacaacct 3300  
 cctgaaggct ggactggtgg tggttggttc gtcaacaaga agtccctcca gaaggctcct 3360  
 cagcctocta gctctgagcc tctgattgtc gtctgctgct ctcctgtcat gcagcgtgat 3420  
 gtcaagaacg agctcctcag catgggctac gacaaggagc ttgtccacac cgttgacggc 3480  
 gagtctggca ccctataa 3498

<210> 8

<211> 3420

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Gen de FRDg optimizado para *A. niger*

<400> 8

atggtcgatg gccgctcctc cgcctccatt gttgctggtg accccgagcg tgctgctcgt 60  
 gagcgtgatg ctgctgctcg tgcctcctc caggactctc ccttgcaac caccatgcag 120  
 taagccacct ccggtctgga attgactggt ccctacgccc tcaaggttgt tgctccgcc 180  
 gacaccttcg accgtgcca ggaggttgcc gatgaggtcc tccgctgctc ctggcagctg 240  
 gccgacaccg tctcaactc tttcaacccc aacagcgaag tctctctggt cggccgctc 300  
 cccgtcggtc agaagcacca gatgagcgt cctctcaagc gtgtcatggc ctgctgccag 360  
 cgtgtctaca acagctctgc tggctgcttc gaccccagca ctgctcctgt tgccaaggcc 420  
 ctccgtgaga tcgctcttgg caaggagcgc aacaacgctt gcttgaggcc tcttactcag 480  
 gcctgcaccc tccccaaactc gttcgtcatt gacttcgagg ctggcaccat ctcccgaag 540  
 cacgaacacg cctccctcga tcttggtggt gtcagcaagg gctacatcgt cgactacgtc 600  
 attgacaaca tcaacgctgc tggtttccag aacgttttct tcgactgggg tggtgactgc 660  
 cgtgcctccg gcatgaacgc ccgcaacacc ccctgggttg ttggtatcac ccgcccccg 720  
 tcattggaca tgcttcccaa ccctcccaag gaggccagct acatctccgt catctcctc 780

ES 2 522 622 T3

gacaacgagg ctcttgccac cagcggtgac tacgagaacc tgatctacac tgccgatgac 840  
aagcctotga cctgcaccta cgactggaag ggcaaggagc tcatgaagcc cagccagtcc 900  
aacattgccc aggtcagcgt caagtgtctac tctgccatgt acgccgatgc ccttgccact 960  
gcttgcttca tcaagcgtga ccccgccaag gtccgccagc tgttggatgg ctggcgctac 1020  
gtgcgcgaca ccgtccgtga ctaccgtgtc tacgtgcgcg agaacgagcg tgttgccaag 1080  
atgttcgaaa ttgccactga ggatgccgag atgogcaagc gccgatctc caacaccctc 1140  
cctgctcgtg tcattgttgt tgggtgggtg ctggctggtc tttctgctgc cattgaggct 1200  
gctggctgcg gtgctcaggt tgtcctgatg gagaaggagg ccaagctcgg tggcaactcc 1260  
gccaaggcca cctccggtat caacggctgg ggtactcgtg ctcaggccaa ggccctccatc 1320  
gtcgtaggcg gcaagtactt cgagcgtgac acctacaagt ccggtatcgg tggcaacacc 1380  
gaccctgctc tgggtcaagac cctgagcatg aagtccgccg atgccattgg ctggttgacc 1440  
agccttggtg ttocctctac tgtcctttct cagctgggtg gccactctcg caagcgcacc 1500  
cacctgctc ctgacaagaa ggacggcacc cccctccca tcggtttcac catcatgaaa 1560  
actctcgagg accacgtccg tggcaacctg tctggccgta tcaccatcat ggagaactgc 1620  
tcggtgacct cgctactctc cgagactaag gagcgcgccg atggcaccaa gcagatccgt 1680  
gtcaccggtg ttgagttcac ccaggctggc tctggcaaga ccaccatcct ggccgatgcc 1740  
gtcatcctgg ccaactggtg tttctccaac gacaagactg ccgactcgtc actccgcgaa 1800  
cacgtcccc acctggtcaa cttccccacc accaacggcc cctggggcagc tgggtgatggt 1860  
gtcaagctgg cccagcgtct ggggtgctcag ctogtcgaca tggacaaggt ccagctccac 1920  
cccactggtc tgatcaaccc caaggaccct gcccaaccca ccaagttcct tggacctgag 1980  
gctctccgtg gctccggtgg tgtccttctg aacaagcagg gcaagcgtt cgtcaacgag 2040  
ctcgatctcc gcagcgttgt ctccaaggcc atcatggagc aggggtgctga ataccocggc 2100  
agcggtgcca gcatgttcgc ctactgcgtt ctcaacgctg ctgctcagaa gctgttcggt 2160  
gtctcctccc acgaattcta ctggaagaag atgggtctgt tcgtcaaggc cgacaccatg 2220  
cgtgatcttg ctgctctgat cggttgcccc gttgagagcg tgcagcagac cctggaagaa 2280  
tacgagcgcc tctccatctc ccagcgtctt tgccccatca cccgcaagtc ggtgtaccct 2340  
tgcgctgctg gcaccaaggg tccctactac gtggctttcg tcaccccctc catccactac 2400  
accatgggtg gctgcttgat ctctccttct gctgagatcc agatgaagaa caacctctcc 2460

ES 2 522 622 T3

cgtgctcctc tctccactc caaccccac ctcggctctgt tgggtgctgg tgaagtcact 2520  
 ggtggtgtcc acggtggcaa ccgtcttggg ggcaactccc tctctgagtg cgttgtgttc 2580  
 ggccgtatcg ctgggtgaccg tgccagcacc atcctccagc gcaagagctc tgctctctcc 2640  
 ttcaaggtct ggaccactgt tgcctccgc gaagtccgcg aggggtggtgt ctacgggtgt 2700  
 ggctctcgtg tctccgctt caacctccc ggtgctctcc agcgtccgg tctgtctctt 2760  
 ggccagtcca ttgccatccg tggtgactgg gatggccagc agctcattgg ctactactct 2820  
 cccatcacc tcccgatga tcttggaatg atcgacatcc tggctcgtc cgacaagggt 2880  
 acctccgcg aatggatctc cgctctggag cccggtgatg ccggtgagat gaaggcctgc 2940  
 ggtggtctgg tcaattgagc tctctgtcc gacaagcact tctgttctat gggtcacatc 3000  
 atcaacaagc tctgcttgat tgccggtggg actggtgttg ctcccatgct tcagatcatc 3060  
 aaggctgctt tcatgaagcc ctccattgac acctcagat ccgtccacct gatctacgct 3120  
 gctgaggatg tcaactgagc gacctaccgt gaggtccttg aggagcgcg ccgctgagtc 3180  
 cgtggcaagt tcaagaaaac ctctgctctg aaccgcctc ctctctctg gactgatggt 3240  
 gttggtttca ttgacctggg tatcctgacc aaccacgtcc agcctccctc cgacaacctc 3300  
 ttagtggcca tctgcggtcc tctgtcatg cagcgcattg tcaaggccac tctcaagacc 3360  
 ctaggatata acatgaacct ggtccgcact gttgatgaga ctgagccctc cggatcataa 3420

<210> 9

<211> 3498

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Gen de FRDm1 optimizado para *S. cerevisiae*

<400> 9

atgggtgctg atggtatttc ttctgcttcc attggtgtta ctgaccacaga agctgctgcc 60  
 aagaagcgtg acagaatggc cagagaattg ttgtcctcca actctggtct atgtcaagaa 120  
 gatgaaccaa ccatcatcaa cttaaagggt ttggaacaca ccattccata cagattggcc 180  
 gttgttttgt gtaactccag atccactggg gaattcgaag ccaaggctgc tgaaatcttg 240  
 agaaaggctt tccacatggt tgactactct ttgaattgtt tcaaccacaga atctgaattg 300  
 tcccgtgtca actctttacc agtcggtgaa aagcaccaaa tgtccgaaga tctaagacat 360  
 gtcattggaat gtaccatttc tgtccaccac tctctggtg tgggtttcga cccagctgct 420  
 ggtccaatca tctccagatt gagagggtgcc atgagagatc acaacgacat gtccgatatc 480

ES 2 522 622 T3

tccgtcactg aagctgaagt tgaattatc tctttggctc aatctttcga tgtcgacttg 540  
gaagaaggta ctattgccag aaagcactct gaagccagat tggatttggg tgggtcaac 600  
aagggttaca ctgttgacta cgttgttgac catttgagag ctgctggtat gccaaacgtc 660  
ttgttcgaat ggggtggtga tatcagagct tctggtagaa acatcaaggg taacttgtgg 720  
gctgttgcca tcaagcgtcc accatctggt gaagaagtta tccgtcgtgc caagggtaag 780  
atgtaaaga tgggtgaaga agaacaagaa gaaaaggacg atgactctcc atctttgttg 840  
cacgttgttg aattggatga cgaagctttg tgtacctctg gtgactacga aaacgtctta 900  
taccatccaa agcacggtgt tgctggttcc attttcgact ggcaacgtcg tggtttattg 960  
tctccagaag aaggtgcttt agctcaagtt tccgtcaaat gttactctgc catgtacgct 1020  
gatgctttgg ccaactgttg tttggtcaag agagatgctg tcagaatcag atacttgttg 1080  
gaaggttggg gatacgtcag atctcgtgtc accaactact tcgcttacac cagacaagg 1140  
gaaagattgg ctcacatgca cgaaattgct caagaaacca gagaattaag agaaatcaga 1200  
attgctggtt ctttgccatc cagaattggt atcgtcgggt gtggtttggc tggctatcc 1260  
gctgccattg aagctgcttc ttgtggtgct caagtcattt tgatggaaa ggaaggtaga 1320  
attggtggta actctgccc ggtacctct ggtatcaacg gttggggtac cagaacccaa 1380  
gccaagtctg atacttggg tgggtgtaag tactttgaaa gagacacttt cttgtccggt 1440  
gtcggtggtg ccaactgacc agctttggtc aaggtcttgt ccgtcaaato tggtgacgct 1500  
atcggttggt taacttcttt ggggtgccc ttgtccggtt tgtctcaatt ggggtggtcac 1560  
tctttcaaga gaactcacag agctccagac aagactgatg gtactccatt accaattggt 1620  
cacaccatca tgagaacttt ggaagatcat atcagaaaca acttgtctga aagagttacc 1680  
atcatgacc acgtttctgt tactgaattg ttgcacgaaa ctgacaccac tccagatggt 1740  
gcttctgaag ttcgtgtcac oggtgtccgt tacagagact tgtctgatgt cgatgggtcaa 1800  
ccttccaaac tattggctga cgctgttgtt ttggccactg gtggtttctc caacgacaga 1860  
gaagaaaact ctttgttgtg taaatacgtc cctcatttgg cttctttccc aactaccaac 1920  
ggtccatggg ctactggtga oggtgtcaaa ttggccacct ccgttgggtgc caagttggtt 1980  
gacatggaca aggttcaatt gcaccaact ggtttgattg acccaaagga cccagctaac 2040  
accactaaga tcttgggtcc agaagctttg agaggttctg gtggtatctt gttgaacaag 2100  
caaggtgaaga gattogtcaa cgaattggac ttgagatccg ttgtttccaa ggccattaac 2160

ES 2 522 622 T3

actcaaggta acgaataccc aggttctggg ggttggtact ttgcttactg tgtcttaaac 2220  
gaagatgcta ccaacttatt ctgtggggg gctttgggtt tctacggtaa gaaattaggt 2280  
ttgttccaaa gagctgaaac tgttgaagaa ttggccaaat tgattggttg tgacgaaggt 2340  
gaattgagag acactttgga aaaatacga acctgttcca aggccaaggt tgcttgtcca 2400  
gtcactggta aggttggttt cccatgtggt gtcggtagca gaggtccata caatgttgct 2460  
ttcgtcactc catccatcca ctacaccatg ggtggttgtt tgatctctoc agctgctgaa 2520  
gtcttgcaag aatacaaggg tttgaatata ttggaaaacc acagaccaat cagatgtttg 2580  
ttcggtgctg gtgaagtcac tgggtggtgc cacgggtgta acagattagg tggtaactct 2640  
ctattggaat gtggtgtctt tggtaagatt gctggtgaca gagctgccac tatcttgcaa 2700  
aagagagaaa ttgctttgtc caagacctcc tggacctctg ttggtgtcag agaatccaga 2760  
tctggtgaac aattcggtag cggttccaga gttttgagat tcaacttgcc aggtgcttta 2820  
caaagaaccg gtttgaactt ggggtgaattc gttgccatca gaggtgaatg ggatggtcaa 2880  
caattagtcg gttacttctc tccaatcact ttgccagaag atttgggtac catctctttg 2940  
ttggtcagag ctgacaaggg tactttgaag gaatggatct gtgctttgcg tccagggtgac 3000  
tccgttgaaa tcaaggcttg tgggtggtcta agaattgacc aagatccagt caagaaatgt 3060  
ttgttgttca gaaacagacc aattaccaga tttgctttgg ttgctgctgg taccgggtgtt 3120  
gctccaatgt tgcaagttat cagagctgct ttgaagaagc catacgtoga cactttggaa 3180  
tccatcagat tgatctacgc tgctgaagaa tatgacactt taacctacag atctatcttg 3240  
caaagatttg ctgaagaatt cccagacaaa ttogtttgta acttcgtctt aaacaacct 3300  
ccagaagggt ggaccgggtg tgttggtttc gtcaacaaga aatctttgca aaaggttttg 3360  
caaccaoctt cttctgaacc attgattggt gtttggtggtc cacctgttat gcaagagat 3420  
gtcaaaaatg aattggtgtc catgggttac gacaaggaat tggttcacac tgtcgatggt 3480  
gaatctggta ccttgtaa 3498

<210> 10

<211> 3420

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Gen de FRDg optimizado para S. cerevisiae

<400> 10

atggttgatg gtagatcttc tgcttccatt gttgccgttg acccagaaag agctgccaga 60

ES 2 522 622 T3

gaaagagatg ctgctgccag agctttgttg caagactctc cattgcacac caccatgcaa 120  
 tacgtacct ctggttggga attgactggt coatacgctt tgaaggttgt tgcttctgct 180  
 gacactttcg acagagccaa ggaagttgct gatgaagtct tgagatgtgc ctggcaattg 240  
 gctgacaccg ttttgaactc tttcaaccca aactctgaag tctctttagt cggtagatta 300  
 ccagtcggtc aaaagcatca aatgtctgct ccattgaaac gtgtcatggc ttgttgtcaa 360  
 agagtctaca actcctctgc tggttgttcc gaccatcca ctgctccagt tgccaaggct 420  
 ttgagagaaa ttgctttggg taaggaaaga aacaatgctt gtttgaagc tttgactcaa 480  
 gcttgtaacct tgccaaactc tttcgtcatt gatttogaag ctggtactat ctocagaaag 540  
 cacgaacacg cttctttgga tttgggtggt gtttccaagg gttacatcgt cgattacgtc 600  
 attgacaaca tcaatgctgc tggtttccaa aacgttttct ttgactgggg tggtgactgt 660  
 cgtgcctcgg gtatgaacgc cagaacact ccattgggtg tcggtatcac tagacctcct 720  
 tccttggaaca tgttgccaaa ccctccaaag gaagcttctt acatctcgt catctctttg 780  
 gacaatgaag ctttggctac ctctggtgat tacgaaaact tgatctacac tgctgacgat 840  
 aaaccattga cctgtaccta cgattggaaa ggtaaggaat tgatgaagcc atctcaatcc 900  
 aatategctc aagtttccgt caagtgttac tctgccatgt acgctgacgc tttggctacc 960  
 gcttgtttca tcaagcgtga cccagccaag gtcagacaat tgttggatgg ttggagatac 1020  
 gttagagaca ccgtcagaga ttaccgtgtc tacgtcagag aaaacgaaag agttgccaa 1080  
 atgttcgaaa ttgccactga agatgctgaa atgagaaaga gaagaatttc caacacttta 1140  
 ccagctcgtg tcattgttgt tgggtggtggt ttggctggtt tgtccgctgc cattgaagct 1200  
 gctggttgtg tgctcaagt tgttttgatg gaaaaggaag ccaagttggg tggtaactct 1260  
 gccaaaggcta cctctggtat caacggttgg ggtactagag ctcaagctaa ggcttccatt 1320  
 gtcgatgggt gtaagtactt cgaaagagat acctacaagt ctggtatcgg tggtaacacc 1380  
 gatccagctt tggtaagac tttgtccatg aaatctgctg acgctatcgg ttggttgact 1440  
 tctctagggt ttccattgac tgttttgtcc caattagggt gtcactccag aaagagaact 1500  
 cacagagctc cagacaagaa ggatggtact ccattgcca tgggtttcac catcatgaaa 1560  
 actttagaag atcatgttag aggtaacttg tccggtagaa tcaccatcat ggaaaactgt 1620  
 tccgttacct ctttgttgtc tgaaaccaag gaaagaccag acggtaccaa gcaaatcaga 1680  
 gttaccggtg togaattcac tcaagctggt tctggtaaga ccaccathtt ggctgatgct 1740



ES 2 522 622 T3

ggtatcttgg ccaccggtgg tttctccaac gacaagactg ctgattcttt gttgagagaa 1800  
 catgccccac acttggttaa ctccaacc accaacggtc catgggctac tggatgatgg 1860  
 gtcaagttgg ctcaaagatt aggtgctcaa ttggtcgata tggacaaggt tcaattgcac 1920  
 ccaactggtt tgatcaaccc aaaggacca gccaaccaa ccaaattctt gggtcagaa 1980  
 gctctaagag gttctggtgg tgttttgtg aacaacaag gtaagagatt tgtcaacgaa 2040  
 ttggatttga gatctgttgt ttccaaggcc atcatggaac aagtgctga ataccaggt 2100  
 tctggtggtt ccatgtttgc ttactgtgtc ttgaacgctg ctgctcaaaa attgtttgg 2160  
 gtttcctctc acgaattcta ctggaagaag atgggtttgt tegtcaaggc tgacaccatg 2220  
 agagacttgg ctgctttgat tggttgtcca gttgaatccg ttcaacaaac tttagaagaa 2280  
 taagaaagat tatccatctc tcaaagatct tgtccaatta ccagaaaatc tgtttacca 2340  
 tgtgttttgg gtaccaaagg tccatactat gtcgcctttg tcaactcctc tatccactac 2400  
 accatgggtg gttgtttgat ttctccatct gctgaaatcc aaatgaagaa cacttcttcc 2460  
 agagctccat tgtcccactc caacccaatc ttgggtttat tcggtgctgg tgaagtcacc 2520  
 ggtggtgtcc acgggtgtaa cagattaggt ggtaactott tgttggaatg tgttgttttc 2580  
 ggtagaattg ccgggtgacag agcttctacc attttgcaa gaaagtcctc tgctttgtct 2640  
 ttcaaggtct ggaccactgt tgttttgaga gaagtcagag aagtggtgt ctacggtgct 2700  
 ggttccogtg tcttgagatt caacttacca ggtgctctac aaagatctgg totatccttg 2760  
 ggtcaattca ttgccatcag aggtgactgg gacggtcaac aattgattgg ttactactct 2820  
 ccaatcactt tgccagacga tttgggtatg attgacattt tggccagatc tgacaagggt 2880  
 actttaogtg aatggatctc tgctttgaa ccaggtgacg ctgtcgaaat gaaggcttgt 2940  
 ggtggtttgg tcatcgaaag aagattatct gacaagact tegttttcat gggtcacatt 3000  
 atcaacaagc tatgtttgat tgctggtggt accggtgttg ctccaatggt gcaaatcctc 3060  
 aaggccgctt tcatgaagcc attcacgac actttggaat ccgtccactt gatctacgct 3120  
 gctgaagatg tcaactgaatt gacttacaga gaagttttgg aagaacgtcg tegtgaatcc 3180  
 agaggtaaat tcaagaaaac tttcgttttg aacagacctc ctccattatg gactgacggt 3240  
 gtcggtttca tgcaccgtgg tatcttgacc aaccagttc aaccaccatc tgacaactta 3300  
 ttggttgcca tctgtggtcc accagttatg caaagaattg tcaaggccac tttaaagact 3360  
 ttaggttaca acatgaactt ggtcagaacc gttgacgaaa ctgaaccatc tggagttaa 3420

<210> 11

<211> 898

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> promotor GPDA

<400> 11

ES 2 522 622 T3

tcagcgtcca attcgagctc tgtacagtga ccggtgactc tttctggcat gcggagacac 60  
 ggacggctgc agagaggagg gctgagtaat aagcgcactc atgtcagctc tggcgctctg 120  
 aggtgcagtg gatgattatt aatccgggac cggccgcccc tccgccccga agtggaaagg 180  
 ctggtgtgccc cctcgttgac caagaatcta ttgcatcatc ggagaatatg gagcttcatc 240  
 gaatcaccgg cagtaagcga aggagaatgt gaagccaggg gtgtatagcc gtcggcgaaa 300  
 tagcatgcca ttaacctagg tacagaagtc caattgcttc cgatctggta aaagattcac 360  
 gagatagtac cttctccgaa gtaggtagag cgagtaccgg gcgcgtaagc tccctaattg 420  
 gcccatccgg catctgtagg gcgtccaaat atcgtgcctc tcctgctttg cccggtgtat 480  
 gaaaccggaa aggcgcctca ggagctggcc agcggcgcag accgggaaca caagctggca 540  
 gtcgacccat ccggtgctct gcactcgacc tgctgaggtc cctcagtccc tggtaggcag 600  
 ctttgccccg tctgtccgcc cgggtgtgtg gcgggggtga caaggtcgtt gcgtcagtc 660  
 aacatttgtt gccatatttt cctgctctcc ccaccagctg ctcttttctt ttctotttct 720  
 tttccatct tcagtatatt catcttccca tccaagaacc tttatttccc ctaagtaagt 780  
 actttgctac atccatactc catccttccc atcccttatt cctttgaacc tttcagttcg 840  
 agctttccca cttcatcgca gcttgactaa cagctacccc gcttgagcca ccgtcaaa 898

<210> 12

<211> 1000

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> promotor TDH3

<400> 12

ctattttcga ggaccttgtc accttgagcc caagagagcc aagatttaa ttttcctatg 60  
 acttgatgca aattcccaaa gctaataaca tgcaagacac gtacgggtaa gaagacatat 120  
 ttgacctctt aacaggttca gacgcgactg cctcatcagt aagaccggtt gaaaagaact 180  
 tacctgaaaa aaacgaatat atactagcgt tgaatgtag cgtcaacaac aagaagttta 240

ES 2 522 622 T3

atgacgcgga ggccaaggca aaaagattcc ttgattacgt aagggagtta gaatcatttt 300  
 gaataaaaaa cacgcttttt cagttcgagt ttatcattat caatactgcc atttcaaaga 360  
 atacgtaaat aattaatagt agtgattttc ctaactttat ttagtcaaaa aattagcctt 420  
 ttaattctgc tgtaaccctg acatgcccaa aatagggggc gggttacaca gaatatataa 480  
 catcgtaggt gtctgggtga acagtttatt cctggcatcc actaaatata atggagcccg 540  
 ctttttaagc tggcatccag aaaaaaaaaag aatcccagca ccaaaatatt gttttcttca 600  
 ccaaccatca gttcataggt ccattctctt agcgcacta cagagaacag gggcacaac 660  
 aggcaaaaaa cgggcacaac ctcaatggag tgatgcaacc tgcctggagt aaatgatgac 720  
 acaaggcaat tgaccacgc atgtatctat ctcattttct tacaccttct attaccttct 780  
 gctctctctg atttggaaaa agctgaaaaa aaaggttgaa accagttccc tgaattatt 840  
 cccctacttg actaataagt atataaagac ggtaggtatt gattgtaatt ctgtaaatct 900  
 atttctaaa cttcttaaat tctactttta tagttagtct ttttttagt tttaaaacac 960  
 caagaactta gtttgaata aacacacata aacaaacaaa 1000

<210> 13

<211> 500

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> terminador TDH3

<400> 13

gtgaatttac tttaaatctt gcatttaaat aaatthctt tttatagctt tatgacttag 60  
 tttcaattta tatactatth taatgacatt ttogattcat tgattgaaag ctttgtgtht 120  
 tttcttgatg cgctattgca ttgttcttgt ctttttcgcc acatgtaata tctgtagtag 180  
 atacctgata cattgtggat gctgagtga aatthtagtata ataattggagg cgctcttaat 240  
 aatthtgggg atattggctt tttthtttaa agthttacaaa tgaatthttt ccgcccaggat 300  
 aacgattctg aagthactct tagcgttcc atcggtagc ccatcaaatc atgctataa 360  
 atcatgocct taththcgtg cagtcagtat catctacatg aaaaaactc ccgcaatttc 420  
 ttatagaata cgttgaaaat taaatgtacg cgccaagata agataacata tatctagatg 480  
 cagtaataa cacagattcc 500

10 <210> 14

<211> 538

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> PEP carboxinasa de *A. succinogenes*, en la que EGY en la posición 120-122 está sustituido por DAF

<400> 14

ES 2 522 622 T3

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

ES 2 522 622 T3

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

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

ES 2 522 622 T3

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> 15

<211> 1617

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> PEP carboxicinasa de *A. succinogenes* nt. que codifica DAF en lugar de EGY

<400> 15

atgactgact taaacaaact cgtaaagaa cttaatgact tagggcttac cgatgttaag	60
gaaattgtgt ataaccgag ttatgaacaa cttttcgagg aagaaaccaa accgggtttg	120
gagggtttcg ataaaggac gttaaccacg cttggcgcgg ttgccgtcga tacggggatt	180
tttaccggtc gttcaccgaa agataaatat atcgtttgcg atgaaactac gaaagacacc	240
gtttggtgga acagcgaagc ggcgaaaaac gataacaaac cgatgacgca agaaacttgg	300
aaaagtttga gagaattagt ggcgaaacaa ctttccggta aacgtttatt cgtggttagac	360
gcattctgcg gcgccagtga aaaacaccgt atcgggtgtgc gtatggttac tgaagtggca	420
tggcaggcgc attttgtgaa aaacatgttt atccgaccga ccgatgaaga gttgaaaaat	480
ttcaaagcgg attttaccgt gttaaacggt gctaattgta ctaatccgaa ctggaagaa	540

ES 2 522 622 T3

caaggttga acagtgaaaa ctttgcgct ttcaatatta ccgaaggtat tcagcttate 600  
 ggcggtactt ggtacggcgg tgaaatgaaa aaaggtatgt tctcaatgat gaactacttc 660  
 ctgccgtaa aaggtgtggc ttccatgcac tgttccgccca acgtaggtaa agacggtgac 720  
 gtggctatth tcttcggttt atccggtacg ggtaaaacaa cgctttcgac cgatcctaaa 780  
 cgccaattaa tcggtgatga cgaacacggt tgggatgaat ccggcgtatt taactttgaa 840  
 ggcggttgtt acgcgaaaac cattaactta tctcaagaaa acgaaccgga tatttacggc 900  
 gcaatcogtc gtgacgcatt attagaaaac gtcgtggttc gtgcagacgg ttcogttgac 960  
 tttgacgacg gttcaaaaac agaaaatacc cgtgtttcat atccgattta ccacatcgac 1020  
 aacatcgttc gtccggtatc gaaagccggt catgcaacca aagtgatttt cttaacccgg 1080  
 gacgcattcg gcgtattgcc gccggtttca aaactgactc cggaacaaaac cgaatactac 1140  
 ttcttatccg gctttactgc aaaattagcg ggtacggaac gcggcgtaac cgaaccgact 1200  
 ccgacattct cggcctgttt cggtgccgca ttcttaagcc tgcacccgat tcaatatgcg 1260  
 gacgtgttgg tcgaacgcat gaaagcctcc ggtgcggaag cttatttggg gaacaccggt 1320  
 tggaaacgca cgggtaaacg tatttcaatc aaagataccc gcggtattat cgatgcgatt 1380  
 ttggaacggt caatcgaaaa agcggaaatg ggcgaattgc caatctttaa tttagcgatt 1440  
 cctaaagcat taccgggtgt tgatcctgct attttggatc cgcgcgatac ttacgcagac 1500  
 aaagcgaat ggcaagttaa agcgggaagat ttggcaaacc gtttcgtgaa aaactttgtg 1560  
 aatatatcgg cgaatccgga agcggcmetaa ttagttggcg ccggtccaaa agcataa 1617

<210> 16

<211> 1617

<212> ADN

5 <213> PEPCCK de *A. succinogenes* optimizada para el par de codones para *S. cerevisiae*

<400> 16

atgactgatt tgaacaaatt ggtcaaggaa ttgaatgatt tgggtttgac tgacgtcaag 60  
 gaaattgtct acaaccatc ttacgaacaa ttattcgaag aagaaaccaa gccaggtttg 120  
 gaaggtttcg acaagggtag tttgaccact ttaggtgctg ttgctgttga caccggtatt 180  
 ttcacoggtc gttctccaaa ggacaaatac attgtttgtg atgaaaccac caaggacacc 240  
 gtctggtgga actctgaagc tgccaagaac gataacaagc caatgactca agaaacctgg 300  
 aaatctttga gagaattggt tgccaagcaa ttgtctggtg agagattatt cgttgttgac 360  
 gctttctgtg gtgcttctga aaagcacaga attggtgtca gaatggctac tgaagttgct 420

ES 2 522 622 T3

tggcaagctc atttcgtcaa gaacatgttc atcagaccaa ctgacgaaga attgaagaac 480  
 ttcaaggctg acttcaccgt tttgaatggt gccaaagtga ccaacccaaa ctggaaggaa 540  
 caaggtttga actotgaaaa ctttgttgct ttcaacatca ctgaaggat ccaattgatt 600  
 ggtggtacct ggtacgggtg tgaaatgaag aagggtatgt tctccatgat gaactatttc 660  
 ttgccattga aagggtgttc ttccatgcac tgttctgcca atgtcggtaa ggatggtgac 720  
 gttgccatct tcttcgggtct atccggtact ggtaagacca ctctatccac tgacccaaag 780  
 agacaattga ttggtgatga cgaacacggg tgggacgaat ctggtgtcct taactttgaa 840  
 ggtggttgtt acgccaaagac catcaactta tctcaagaaa acgaaccaga tatctacggg 900  
 gccatccgct gtgatgcttt gttggaaaac gttggtgtca gagctgacgg ttctggtgac 960  
 ttcgacgacg gttccaagac tgaaaacacc agagtttctt acccaatcta ccacattgac 1020  
 aacattgtca gacctgttc caaggctggt cacgctacca aggttatcct ctgactgct 1080  
 gatgctttcg gtgtcttgcc acctgttcc aaattgactc cagaacaaac cgaatactac 1140  
 ttcttgtccg gtttactgc caaattggct ggtactgaaa gaggtgcac tgaaccaact 1200  
 ccaactttct ctgottgttt cgggtgctgct ttcttatcct tgcacccaat ccaatagct 1260  
 gatgtcttgg ttgaaagaat gaaggcttct ggtgctgaag cttacttggg caacaccggg 1320  
 tggaacggta ccggtaagag aatctccatc aaggatacca gaggtatcat tgatgctatc 1380  
 ttggacgggt ccattgaaaa ggctgaaatg ggtgaattgc caatcttcaa cttggccatt 1440  
 ccaaaggctt tgccagggtg tgaccagcc atcttagatc caagagacac ctacgctgac 1500  
 aaggctcaat ggcaagtcaa ggctgaagat ttggctaaca gattcgtcaa gaactttgtc 1560  
 aaatacaactg ctaaccacaga agctgccaaa ttggttggtg ctggtccaaa ggcttaa 1617

<210> 17

<211> 538

<212> PRT

5 <213> *Mannheimia succinicipoducens*

<400> 17

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



ES 2 522 622 T3

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

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

ES 2 522 622 T3

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  
290 295 300

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

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

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

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

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

Phe Thr Ala Lys Leu Ala Gly Thr Glu Arg Gly Ile 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

Thr Gln Tyr Ala Glu Val Leu Val Lys Arg Met Gln Glu 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 Asp Lys Ala Glu Met Gly Ser Leu Pro Ile Phe Asp Phe Ser Ile  
465 470 475 480

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

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

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

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

<210> 18

<211> 1617

ES 2 522 622 T3

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> PEP carboxicinas de *M. succiniciproducens* cpo para *S. cerevisiae*

5 <400> 18

```

atgaccgatt tgaaccaatt gactcaagaa ttgggtgctt tgggtattca cgatgtccaa      60
gaagttgtct acaaccctac ttacgaattg ttgtttgctg aagaaaccaa gccaggtttg      120
gaaggttacg aaaagggtac tgttaccaac caagggtgctg ttgctgtcaa caccggatc      180
ttcacoggto gttctocaaa ggacaaatac attgtcttgg atgacaagac caaggacact      240
gtctggtgga cttctgaaaa ggtcaagaac gacaacaaac caatgtccca agacacttgg      300
aactctttaa agggtttagt cgctgaccaa ttgtctggta agagattatt cgttgtcgat      360
gctttctgtg gtgccacaaa ggacaccaga ttagctgtca gagttgtcac tgaagttgct      420
tggcaagctc acttcggtac caacatgttc atcagaccat ctgctgaaga attgaaaggt      480
ttcaagcoag atttcgttgt catgaacggt gccaaatgta ccaacccaaa ctggaaggaa      540
caaggtttga actctgaaaa ctttgttgct ttcaacatca ctgaagggtg tcaattgatt      600
ggtggtacct ggtacgggtg tgaaatgaag aagggtatgt tctccatgat gaactacttc      660
ttgccattga gaggtattgc ttccatgcac tgttctgcca atgtcggtaa ggaoggtgac      720
actgccatct tcttcggtct atccggtacc ggtaagacca ctttgtccac tgacccaaag      780
agacaattga ttgggtgatga cgaacacggt tgggatgacg aaggtgtttt caactttgaa      840
ggtggttgtt acgccaagac catcaactta tctgctgaaa atgaaccaga tatctacggt      900
gccatcaagc gtgacgctct attgaaaaac gttggtgttt tggacaatgg tgacgtcgat      960
tatgctgacg gttccaagac tgaaaaacacc agagtttctt acccaatcta ccatattcaa     1020
aacattgtca agccagtttc caaggctggt ccagctacca aagttatctt cttgtctgct     1080
gatgctttcg gtgttttgcc tcctgtttcc aagttgactc cagaacaaac caagtactac     1140
ttcttgtctg gtttcaccgc caagttggct ggtactgaaa gaggtatcac tgaaccaact     1200
ccaactttct ctgcttgttt cgggtgctgcc tttttgtctt tgcacccaac tcaatacget     1260
gaagttttgg tcaagagaat gcaagaatct ggtgctgaag ottacttggg caacactggt     1320
tggaaacggtc ccggtgaagag aatctccatc aaagatacca gaggtatcat cgatgccatc     1380
ttggatggtt ccattgacaa ggctgaaatg gtttctttgc caattttcga tttctccatt     1440
ccaaaggctt tgccagggtg caaccagcc atcttagacc caagagacac ctacgctgac     1500
aaagtcfaat ggaagaaaa ggctcaagac ttggctggta gattcgtcaa gaacttcgaa     1560
aaatacactg gtactgctga aggtcaagct ttggttgctg ctggtccaaa ggcttaa     1617

```

<210> 19

<211> 365

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 522 622 T3

<220>

<223> MDH2 de *S. cerevisiae* que carece de los primeros 12 a.a.

<400> 19

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

ES 2 522 622 T3

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

Val Leu Val Ile Ser Asn Pro Val Asn Ser Leu Val Pro Val Met Val  
 130 135 140

Ser Asn Ile Leu Lys Asn His Pro Gln Ser Arg Asn Ser Gly Ile Glu  
 145 150 155 160

Arg Arg Ile Met Gly Val Thr Lys Leu Asp Ile Val Arg Ala Ser Thr  
 165 170 175

Phe Leu Arg Glu Ile Asn Ile Glu Ser Gly Leu Thr Pro Arg Val Asn  
 180 185 190

Ser Met Pro Asp Val Pro Val Ile Gly Gly His Ser Gly Glu Thr Ile  
 195 200 205

Ile Pro Leu Phe Ser Gln Ser Asn Phe Leu Ser Arg Leu Asn Glu Asp  
 210 215 220

Gln Leu Lys Tyr Leu Ile His Arg Val Gln Tyr Gly Gly Asp Glu Val  
 225 230 235 240

Val Lys Ala Lys Asn Gly Lys Gly Ser Ala Thr Leu Ser Met Ala His  
 245 250 255

Ala Gly Tyr Lys Cys Val Val Gln Phe Val Ser Leu Leu Leu Gly Asn  
 260 265 270

Ile Glu Gln Ile His Gly Thr Tyr Tyr Val Pro Leu Lys Asp Ala Asn  
 275 280 285

Asn Phe Pro Ile Ala Pro Gly Ala Asp Gln Leu Leu Pro Leu Val Asp  
 290 295 300

Gly Ala Asp Tyr Phe Ala Ile Pro Leu Thr Ile Thr Thr Lys Gly Val  
 305 310 315 320

Ser Tyr Val Asp Tyr Asp Ile Val Asn Arg Met Asn Asp Met Glu Arg  
 325 330 335

Asn Gln Met Leu Pro Ile Cys Val Ser Gln Leu Lys Lys Asn Ile Asp  
 340 345 350

Lys Gly Leu Glu Phe Val Ala Ser Arg Ser Ala Ser Ser  
 355 360 365

<210> 20

<211> 1099

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 522 622 T3

<223> MDH2 de *S. cerevisiae* cpo que carece de los primeros 12 a.a.

<400> 20

```

atggtgaaga ttgccatctt gggtgctgct ggtggatcgt gtcaatcttt gtctttggtg    60
ttgaaggctc aattgcaata ccaattgaag gaatccaaca gatctgttac ccacattcat    120
ttggctttgt acgatgtcaa ccaagaagct atcaacggtg tcaactgctga cttgtctcac    180
atcgataccc caatctctgt ttctctcac tctccagctg gtggtattga aaactgtttg    240
cacaacgctt ccattgttgt cattccagcc ggtgttccaa gaaagccagg tatgaccogt    300
gacgatttgt tcaacgtcaa tgccggatc atctctcaat taggtgattc cattgctgaa    360
tggttgact  tgtccaaggt tttcgtcttg gttatctcca acccagtcaa ctctttggtt    420
cctgttatgg tttccaacat ctgaagaac caccacaat ccagaaactc tggattgaa     480
agaagaatca tgggtgtcac caaattggac attgtcagag cttccacttt cttgagagaa    540
atcaacattg aatctggttt gactccaaga gtcaactcca tgccagatgt tccagttatc    600
gggtgctact ctggtgaaac tatcatocca ttattctctc aatctaactt cttgtccaga    660
ttgaatgaag atcaattgaa atacttgatt caccgtgtcc aatacgggtg tgacgaagtt    720
gtcaaggcca agaacggtaa gggttctgct actctatcca tggctcatgc cggttacaag    780
tgtgtgtgcc aattcgttct tctattatta ggtaacattg aacaaatcca cggtaacctac    840
tacgttccat tgaagatgc taacaacttc ccaattgctc caggtgctga ccaattattg    900
ccattagtcg acggtgctga ctactttgcc atccattga ccatcactac caaggggtgt    960
tcttacgttg actacgatat cgtcaacaga atgaacgaca tggaaagaaa ccaaatgttg   1020
cctatctgtg tttctcaatt gaagaagaac attgacaagg gtttgaatt  cgttgcttcc   1080
agatctgctt ccagttaag                                     1099

```

<210> 21

5 <211> 340

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> MDH3 de *S. cerevisiae* que carece de SKL C-terminal

10 <400> 21

ES 2 522 622 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 522 622 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Leu Asp Ser  
 340

<210> 22

<211> 1024

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> MDH3 de *S. cerevisiae* que carece de SKL que codifica nt, cpo

<400> 22

atgggtaagg .ttgccatctt aggtgcttct ggtgggtgctg gtcaaccatt atctctatta 60  
 ttgaaattgt ctccatacgt ttctgaattg gctttgtacg atatcagagc tgctgaaggt 120  
 attggtaagg atttgtccca catcaacacc aactcctctt gtggttggtta cgacaaggat 180  
 tccatogaaa acactttgtc caatgctcaa gttgtcttga ttccagctgg tgttccaaga 240



ES 2 522 622 T3

aagccaggtt tgaccagaga tgatttggtc aagatgaacg ctggatcgt taagtctttg 300  
 gttactgctg tccgtaaatt tgcccaaac gctcgtatct tagtcatctc caaccctggt 360  
 aactctttgg ttccaattgc cgttgaaact ttgaagaaga tgggtaagtt caagccaggt 420  
 aacgttatgg gtgtcaccaa cttggatttg gtcagagctg aaactttctt ggttgactac 480  
 ttgatgttga agaaccctaaa gatcgggtcaa gaacaagaca agaccacat gcacagaaag 540  
 gtcaccgtca tccggtgtca ctctggtgaa accatcattc caatcatcac tgacaaatcc 600  
 ttggttttcc aattggacaa gcaatacga ctttcatcc acagagtcca attcgggtgt 660  
 gacgaaattg tcaaggccaa gcaagggtgc ggttctgcta ccttgtccat ggctttcgt 720  
 ggtgccaat ttgctgaaga agtcttacgt tctttccaca acgaaaagcc agaaactgaa 780  
 tctttgtctg ctttcgteta cttgccaggt ttgaagaacg gtaagaaggc tcaacaatta 840  
 gtcggtgaca actccattga atacttctct ttgccaattg ttttgagaaa cggttccgtt 900  
 gtttccattg acacttctgt tttgaaaaa ttgtctcaa gagaagaaca attggtcaac 960  
 actgctgtca aggaattgag aaagaacatt gaaaagggtg agtctttcat cttggacagt 1020  
 taag 1024

<210> 23

<211> 472

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fumarasa de *R. oryzae* que carece de los primeros 23 aa+ nueva M

<400> 23

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

ES 2 522 622 T3

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

ES 2 522 622 T3

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> 24

<211> 1419

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fumarasa de *R. oryzae* que carece de los nt que codifican los primeros aa + M

<400> 24

atgtcctctg cttctgctgc ttgcaaaaa ttcagagctg aaagagatac cttcgggtgac 60

ES 2 522 622 T3

ttgcaagttc cagctgaccg ttactggggg gctcaaactc aaagatcttt gcaaaaacttt 120  
 gacattgggt gtccaactga aagaatgcca gaaccattaa tcagagcttt cgggtgtttg 180  
 aagaaggctg ctgccaccgt caacatgacc tacggtttgg acccaaagg tggatgaagcc 240  
 atccaaaagg ctgctgacga agttatgat ggttctttga ttgaccattt cccattgggt 300  
 gtctggcaaa ccggttctgg tactcaaacc aagatgaacg tcaatgaagt catctccaac 360  
 agagccattg aattgttggg tggatgaatta ggttccaagg ctccagtcca cccaaacgat 420  
 catgtcaaca tgtctcaatc ttccaacgac actttcccaa ctgccatgca cgttgctgcc 480  
 gttgttgaaa ttcacggtag attgattcca gctttgacca ctttgagaga tgctttgcaa 540  
 gccaaatctg ctgaattcga acacatcatc aagattggta gaaccactt gcaagatgct 600  
 accccattga ctttaggtca agaattctcc ggttacctc aacaattgac ctacggatt 660  
 gctcgtgttc aaggactttt ggaaagatta tacaacttgg ctcaaggagg tactgctgtc 720  
 ggtactgggt tgaacaccag aaagggttcc gatgccagg ttgctgaagc cattgcttcc 780  
 atcactgggt taccattcaa gaccgctcca aacaaattcg aagctttggc tgctcacgac 840  
 gctttgggtg aagctcacgg tgctttgaac accggtgctt gttctttgat gaagattgcc 900  
 aacgatatcc gttacttggg ttctggcca agatgtggt taggtgaatt gtctctacca 960  
 gaaaacgaac caggttcttc catcatgcca ggtaaggcca acccaactca atgtgaagct 1020  
 atgaccatgg tttgtgctca agtcatgggt aacaacactg ccactctgtg tgctgggtcc 1080  
 aacggtaaat tcgaattgaa tgcctttaa ccagtcatga tcaagaactt gatccaatcc 1140  
 atcagattaa tctctgacgc ttccatctct ttcaccaaga actgtgtgtg cggatttgaa 1200  
 gctaacgaaa agaagatctc ctccatcatg aacgaatctt tgatgttggc cactgctttg 1260  
 aacctcaca ttggttacga caaggctgcc aagtgtgcca agaaggctca caaggaagg 1320  
 accactttga aagaagctgc tctatctttg ggttacttga cctctgaaga attogaccaa 1380  
 tgggttagac ctgaggacat gatttctgcc aaggattaa 1419

<210> 25

<211> 1000

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> promotor TDH1

<400> 25

cttcctttt acagtgttc ggaaaagcac agcgttctcc aaggaacaa ttttcttca 60

ES 2 522 622 T3

agttaatgca taagaaatat ctttttttat gtttagctaa gtaaaagcag cttggagtaa 120  
 aaaaaaaaaat gagtaaattt ctcgatggat tagtttctca caggtaacat acaaaaaacc 180  
 aagaaaagcc cgcttctgaa aactacagtt gacttgatg ctaaagggcc agactaatgg 240  
 gaggagaaaa agaaacgaat gtatatgctc atttacactc tatatcacca tatggaggat 300  
 aagttgggct gagcttctga tccaatttat tctatccatt agttgctgat atgtcccacc 360  
 agccaacact tgatagtatc tactcgccat tcacttccag cagcgccagt agggttggtg 420  
 agcttagtaa aatgtgctc accacaagcc tacatgactc cacgtcacat gaaaccacac 480  
 cgtggggcct tgttgcgcta ggaataggat atgctgagaa gacgcttctg cttagtaacc 540  
 acaccacatt ttcagggggg cgatctgctt gcttccttta ctgtcacgag cggcccataa 600  
 tcgcgctttt tttttaaag gcgagagaca gcaaacagga agctcgggtt tcaaccttgc 660  
 gagtggctgc agatctggag actggatctt tacaatacag taaggcaagc caccatctgc 720  
 ttcttaggtg catgcgacgg tatccacgtg cagaacaaca tagtctgaag aaggggggga 780  
 ggagcatggt cattctctgt agcagtaaga gcttggatgat aatgaccaa actggagtct 840  
 cgaaatcata taaatagaca atatattttc acacaatgag atttgtagta cagttctatt 900  
 ctctctcttg cataaataag aaattcatca agaacttggg ttgatatttc accaacacac 960  
 acaaaaaaca gtacttcact aaatttacac acaaaacaaa 1000

<210> 26

<211> 500

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> terminador TDH1

<400> 26

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 gaacgtgggtg aattgaagtt 240  
 ctaggatggt ttaaagattt ttcttttttg ggaataagt aaacaatata ttgctgcctt 300  
 tgcaaaacgc acataccac aatatgtgac tattggcaa gaacgcatta tcctttgaag 360  
 aggtggatac tgatactaag agagtctcta ttocggetcc acttttagtc cagagattac 420  
 ttgtcttctt acgtatcaga acaagaaagc atttccaaag taattgcatt tgccttgag 480  
 10 cagtatatat atactaagaa 500

<210> 27

<211> 600

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 522 622 T3

<220>

<223> segundo promotor TDH3

<400> 27

```
ttagtcaaaa aattagcctt ttaattctgc tgtaaccogt acatgcccaa aatagggggc 60
gggttacaca gaatatataa catcgtaggt gtctgggtga acagtttatt cctggcatcc 120
actaaatata atggagcccg ctttttaagc tggcatccag aaaaaaaaaag aatcccagca 180
ccaaaatatt gttttcttca ccaaccatca gttcataggt ccattctctt agcgcaacta 240
cagagaacag gggcacaac aggcacacac cgggcacaac ctcaatggag tgatgcaacc 300
tgcctggagt aaatgatgac acaaggcaat tgaccacgc atgtatctat ctcatcttct 360
tacaccttct attaccttct gctctctctg atttggaaaa agctgaaaaa aaagggtgaa 420
accagttccc tgaattatt cccctacttg actaataagt atataaagac ggtaggtatt 480
gattgtaatt ctgtaaatct atttcttaaa cttcttaaat tctactttta tagttagtct 540
tttttttagt tttaaaacac caagaactta gtttcgaata aacacacata aacaacaaa 600
```

5 <210> 28

<211> 300

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> segundo terminador TDH3

<400> 28

```
gtgaatttac tttaaatctt gcatttaaataa aaattttctt tttatagctt tatgacttag 60
tttcaattta tatactatctt taatgacatt ttogattcat tgattgaaag ctttgtgttt 120
tttcttgatg cgctattgca ttgttcttgt ctttttcgcc acatgtaata tctgtagtag 180
atacctgata cattgtggat gctgagttaa attttagtta ataattggagg cgctcttaat 240
aattttgggg atattggctt ttttttttaa agtttacaaa tgaatttttt ccgccaggat 300
```

<210> 29

<211> 3148

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo sintético TDH1p-PCKm-TDH1t

<400> 29

ES 2 522 622 T3

ggatcccttc ccttttacag tgcttcggaa aagcacagcg ttgtccaagg gaacaatddd 60  
 tcttcaagtt aatgcataag aaatatcttt ttttatgttt agctaagtaa aagcagcttg 120  
 gagtaaaaaa aaaaatgagt aaatttctcg atggattagt ttctcacagg taacataaca 180  
 aaaaccaaga aaagcccgct tctgaaaact acagttgact tgtatgctaa agggccagac 240  
 taatgggagg agaaaaagaa acgaatgtat atgctcattt aacctctata tcacatatg 300  
 gaggataagt tgggctgagc ttctgatcca atttattcta tccattagtt gctgatatgt 360  
 cccaccagcc aaccttgat agtatctact cgccattcac ttccagcagc gccagtaggg 420  
 ttgttgagct tagtaaaaat gtgocacca caagcctaca tgactccacg tcacatgaaa 480  
 ccacaccgtg gggccttggt gcgctaggaa taggatatgc gacgaagacg cttctgctta 540  
 gtaaccacac cacattttca ggggctgat ctgcttgctt cctttactgt cagagcggc 600  
 ccataatcgc gctttttttt taaaaggcgc gagacagcaa acaggaagct cgggtttcaa 660  
 ccttcggagt ggtogcagat ctggagactg gatctttaca atacagtaag gcaagccacc 720  
 atctgcttct taggtgcatg cgacggtatc caogtgcaga acaacatagt ctgaagaagg 780  
 gggggaggag catgttcatt ctctgtagca gtaagagctt ggtgataatg accaaaactg 840  
 gagtctcgaa atcatataaa tagacaatat attttcacac aatgagattd gtagtacagt 900  
 tctattctct ctcttgcata aataagaaat tcatcaagaa cttggtttga tatttcacca 960  
 acacacacaa aaaacagtac ttcactaaat ttacacacaa acaaaaatga ctgatttgaa 1020  
 caaattggtc aaggaattga atgatttggg tttgactgac gtcaaggaaa ttgtctacaa 1080  
 cccatcttac gaacaattat tcgaagaaga aaccaagcca ggtttggaag gtttcgacaa 1140  
 gggtactttg accactttag gtgctgttgc tgttgacacc ggtattdtca ccggctgttc 1200  
 tccaaaggac aaatacattg tttgtgatga aaccaccaag gacaccgtct ggtggaactc 1260  
 tgaagctgcc aagaacgata acaagccaat gactcaagaa acctggaaat ctttgagaga 1320  
 attggttgc aagcaattgt ctgtaagag attattcgtt gttgacgctt tctgtggtgc 1380  
 ttctgaaaag cacagaattg gtgtcagaat ggtcactgaa gttgcttggc aagctcattt 1440  
 cgtcaagaac atgttcatca gaccaactga cgaagaattg aagaacttca aggctgactt 1500

ES 2 522 622 T3

caccgttttg aatggtgcca agtgtacca cccaaactgg aaggaacaag gtttgaactc 1560  
 tgaaaacttt gttgctttca acatcaactga aggtatccaa ttgattggtg gtacctggta 1620  
 cgggtggtgaa atgaagaagg gtatgttctc catgatgaac tatttcttgc cattgaaagg 1680  
 tgttgcttcc atgcactggt ctgccaatgt cggttaaggat ggtgacgttg ccatcttctt 1740  
 cggctctatcc ggtactggta agaccactct atccactgac ccaaagagac aattgattgg 1800  
 tgatgacgaa cacggttggg acgaatctgg tgtctttaac tttgaagggtg gttgttacgc 1860  
 caagaccatc aacttatctc aagaaaacga accagatatac tacggtgcca tccgtctgta 1920  
 tgctttgttg gaaaacgttg ttgtcagagc tgacggttct gttgacttgc acgacggttc 1980  
 caagactgaa aacaccagag tttcttacc aatctaccac attgacaaca ttgtcagacc 2040  
 tgtttccaag gctggtcacg ctaccaaggt tatcttcttg actgctgatg cttcgggtgt 2100  
 cttgccacct gtttccaaat tgactccaga acaaaccgaa tactacttct tgtccggttt 2160  
 cactgccaaa ttggctggtg ctgaaagagg tgactcactgaa ccaactccaa ctttctctgc 2220  
 ttgtttcggg gctgctttct tatctttgca cccaatccaa tacgctgatg tcttggttga 2280  
 aagaatgaag gcttctggtg ctgaagctta cttgggtcaac accgggttga acgggtaccg 2340  
 taagagaatc tccatcaagg ataccagagg tatcattgat gctatcttgg acggttccat 2400  
 tgaaaaggct gaaatgggtg aattgcdaat cttcaacttg gccattccaa aggetttgcc 2460  
 aggtgttgac ccagccatct tagatccaag agacacctac gctgacaagg ctcaatggca 2520  
 agtcaaggct gaagatttgg ctaacagatt cgtcaagaac tttgtcaaat aactgctaa 2580  
 cccagaagct gccaaattgg ttggtgctgg tccaaaggct taaggcccgg gcataaagca 2640  
 atcttgatga ggataatgat ttttttttga atatacataa atactaccgt tttctgcta 2700  
 gattttgtga agacgtaaat aagtacatat tactttttaa gccaaagaca gattaagcat 2760  
 taactttacc ctttctctt ctaagtttca atactagtta tcaactgtta aaagttatgg 2820  
 cgagaacgct ggcgggttaa atatattacc ctgaacgtgg tgaattgaag ttctaggatg 2880  
 gtttaaagat ttttccttt tgggaaataa gtaaacaata tattgctgcc ttgcaaaac 2940  
 gcacataccc acaatatgtg actattggca aagaacgcat tatcctttga agagggtgat 3000  
 actgatacta agagagtctc tattccggct ccaacttttag tccagagatt acttgtcttc 3060  
 ttacgtatca gaacaagaaa gcatttccaa agtaattgca tttgcccttg agcagtatat 3120  
 atatactaag aaggcgcgcc gcggccgc 3148

<210> 30

<211> 3148

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo sintético TDH1p-PCK1-TDH1t

<400> 30



ES 2 522 622 T3

ggatcccttc ccttttacag tgcttcggaa aagcacagcg ttgtccaagg gaacaatttt	60
tcttcaagtt aatgcataag aaatatcttt ttttatgttt agctaagtaa aagcagcttg	120
gagtaaaaaa aaaaatgagt aaatttctcg atggattagt ttctcacagg taacataaca	180
aaaaccaaga aaagcccgct tctgaaaact acagttgact tgtatgctaa agggccagac	240
taatgggagg agaaaaagaa acgaatgtat atgctcattt aactctata tcaccatag	300
gaggataagt tgggctgagc ttctgatcca atttattcta tccattagtt gctgatatgt	360
cccaccagcc aacacttgat agtatctact cgccattcac ttccagcagc gccagtaggg	420
ttgttgagct tagtaaaaat gtgcgacca caagcctaca tgactccacg tcacatgaaa	480
ccacaccgtg gggccttggt gcgctaggaa taggatatgc gacgaagacg cttctgctta	540
gtaaccacac cacattttca ggggctgat ctgcttgctt cctttactgt caggagcggc	600
ccataatcgc gctttttttt taaaaggcgc gagacagcaa acaggaagct cgggtttcaa	660
ccttcggagt ggtcgcagat ctggagactg gatctttaca atacagtaag gcaagccacc	720
atctgcttct taggtgcatg cgacggatc cacgtgcaga acaacatagt ctgaagaagg	780
gggggaggag catgttcatt ctctgtagca gtaagagctt ggtgataatg accaaaactg	840
gagtctogaa atcatataaa tagacaatat attttcacac aatgagattt gtagtacagt	900
tctattotct ctottgcata aataagaaat tcatcaagaa cttggtttga tatttcacca	960
acacacacaa aaaacagtac ttcactaat ttacacacaa acaaaaatga ccgatttga	1020
ccaattgact caagaattgg gtgctttggg tattcacgat gtccaagaag ttgtctacaa	1080
cccatcttac gaattgttgt ttgctgaaga aaccaagcca ggtttggaag gttacgaaaa	1140
gggtactggt accaaccaag gtgctgttgc tgtcaacacc ggtatcttca ccggtcgttc	1200
tccaaaggac aaatacattg tcttgatga caagaccaag gacactgtct ggtggacttc	1260
tgaaaaggtc aagaacgaca acaaccaat gtccaagac acttggaaact ctttaaagg	1320
tttagtcgct gaccaattgt ctggtaagag attatcggtt gtcgatgctt tctgtggtgc	1380
caacaaggac accagattag ctgtcagagt tgtcactgaa gttgcttggc aagctcactt	1440

ES 2 522 622 T3

cgttaccaac atgttcatca gaccatctgc tgaagaattg aaaggtttca agccagattt 1500  
 cgttgtcatg aacggtgcca aatgtaccaa cccaaactgg aaggaacaag gtttgaactc 1560  
 tgaaaacttt gttgctttca acatcactga aggtgttcaa ttgattggtg gtacctggta 1620  
 cgggtggtgaa atgaagaagg gtatgttctc catgatgaac tacttcttgc cattgagagg 1680  
 tattgcttcc atgcaactgt ctgccaatgt cggttaaggac ggtgacactg ccatcttctt 1740  
 cggcttatcc ggtaccggtg agaccacttt gtccactgac ccaaagagac aattgattgg 1800  
 tgatgacgaa cacggttggg atgacgaagg tgttttcaac tttgaagggtg gttgttacgc 1860  
 caagaccatc aacttatctg ctgaaaatga accagatata tacggtgcca tcaagcgtga 1920  
 cgctctattg gaaaacgttg ttgttttggg caatggtgac gtcgattatg ctgacggttc 1980  
 caagactgaa aacaccagag tttcttacc aatctaccat attcaaaaca ttgtcaagcc 2040  
 agtttccaag gctggtccag ctaccaaagt tatcttcttg tctgctgatg ctttcgggtg 2100  
 tttgcctctt gtttccaagt tgactccaga acaaaccaag tactacttct tgtctggttt 2160  
 caccgccaag ttggctggtg ctgaaagagg tatcactgaa ccaactcaa ctttctctgc 2220  
 ttgtttcggg gctgcctttt tgtctttgca cccaactcaa tacgctgaag ttttggtcaa 2280  
 gagaatgcaa gaatctggtg ctgaagctta cttggtcaac actggttggg acggtaccgg 2340  
 taagagaatc tccatcaaag ataccagagg tatcatcgat gccatcttgg atggttccat 2400  
 tgacaaggct gaaatgggtt ctttgccaat tttcgatttc tccattcaa aggctttgcc 2460  
 aggtgtcaac ccagccatct tagaccaag agacacctac gctgacaaaag ctcaatggga 2520  
 agaaaaggct caagacttgg ctggtagatt cgtcaagaac ttcgaaaaat acactggtac 2580  
 tgctgaaggc caagctttgg ttgctgctgg tocaaaggcc taaggcccgg gcataaagca 2640  
 atcttgatga ggataatgat ttttttttga atatacataa atactaccgt ttttctgcta 2700  
 gattttgtga agacgtaaat aagtacatat tactttttaa gccaaagaaa gattaagcat 2760  
 taactttacc ctttctctt ctaagtttca atactagtta tcaactgttga aaagttatgg 2820  
 cgagaacgtc ggcggttaaa atatattacc ctgaacgtgg tgaattgaag ttctaggatg 2880  
 gtttaaagat ttttctttt tgggaaataa gtaacaata tattgctgcc tttgcaaac 2940  
 gcacataccc acaatatgtg actattggca aagaacgcat tatcctttga agaggtggat 3000  
 actgatacta agagagtctc tattccggct ccacttttag tccagagatt acttgtcttc 3060  
 ttacgtatca gaacaagaaa gcatttcaa agtaattgca tttgcccttg agcagtatat 3120  
 atatactaag aaggcgcgcc gcggccgc 3148

<210> 31

<211> 2637

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo sintético TDH3p-delta 12N MDH2-TDH3t

<400> 31

ES 2 522 622 T3

ggatccggcg cgcoctatth tcgaggacct tgtcaccttg agcccaagag agccaagatt 60  
 taaatthtcc tatgacttga tgcaaatcc caaagctaata aacatgcaag acacgtacgg 120  
 tcaagaagac atatthtgacc tcttaacagg ttcagacgcg actgcctcat cagtaagacc 180  
 cgttgaaaag aacttacctg aaaaaaacga atatatacta gcgthgaaag ttagcgtcaa 240  
 caacaagaag thtaatgacg cggaggccaa ggcaaaaaga ttccttgatt acgtaaggga 300  
 gttagaatca ththgaaataa aaaacacgct ththcagthc gagthtatca ttatcaatac 360  
 tgccatthca aagaatacgt aaataatthaa tagtagtgat ththcctaact thththtagtc 420  
 aaaaaatthag cthththtaatt ctgctgtaac ccgtacatgc ccaaaatagg gggcgggthta 480  
 cacagaatata aataacatcgt aggtgtctgg gtgaacagtht ththcctggc atccactaaa 540  
 tataatggag ccgcgththth aagctggcat ccagaaaaaa aaagaatccc agcaccaaaa 600  
 ththgththc thcaccaacc atcagthcat aggtccatthc ththtagcgc actacagaga 660  
 acaggggac aaacaggcaa aaaacgggca caacctcaat ggagtgatgc aacctgcctg 720  
 gagtaaatga tgacacaagg caatthgacc acgcatgtat ctatctcatt thththacacc 780  
 thctattacc thctgctctc thctgaththg aaaaagctga aaaaaaagg thgaaaccagth 840  
 thcctgaaat ththccccta cthgactaat aagthataata agacggtagg ththgaththg 900  
 aathctgthaa atctaththct thaaactthct aaathctact ththtagthta gththththth 960  
 tagthththaa acaccaagaa cthgaththc aataaacaca cataaacaaa caaaatgthg 1020  
 aagaththgca ththgggthc thgctggthg atcggthcaat cththgthth gthgthgaaag 1080  
 gthcaaththc aataccaath gaaggaatcc aacagatctg ththcccat thcaththggct 1140  
 thgtacgat thcaaccaaga agctatcaac ggtgtcactg ctgactthgthc thcatcgtat 1200  
 acccaatct ctgththctc thactctcca gctggthgta thgaaaactg ththgcacaac 1260  
 gththcathth thgtcaththc agccggthgth ccaagaaagc caggtatgac ccgtgacgat 1320  
 thgthcaacg thcaatgcgg thcatctct caathaggthg aththcaththc thaatgththg 1380

ES 2 522 622 T3

gacttgtoca aggttttctgt ottggttato tccaaccag tcaactcttt ggttcctggt 1440  
atggtttcca acatcttgaa gaaccacca caatccagaa actctggtat tgaagaaga 1500  
atcatgggtg tcaccaaatt ggacattgto agagcttcca ctttcttgag agaaatcaac 1560  
attgaatctg gtttgactoc aagagtcaac tccatgccag atgttccagt tatcgggtgt 1620  
cactctggtg aaactatcat cccattatto tctcaatcta acttcttgto cagattgaat 1680  
gaagatcaat tgaataactt gattcacogt gtccaatagc gtggtgacga agttgtcaag 1740  
gccaagaacg gtaagggttc tgctactcta tccatggctc atgccggta caagtgtgtt 1800  
gtccaattcg tttctctatt attaggtaac attgaacaaa tccacggtag ctactacgtt 1860  
ccattgaaag atgctaacaa cttcccaatt gctccagggtg ctgaccaatt attgccatta 1920  
gtcgacgggtg ctgactactt tgccatccca ttgaccatca ctaccaaggg tgtttcttac 1980  
gttgactacg atatcgtcaa cagaatgaac gacatggaaa gaaaccaaatt gttgcctatc 2040  
tgtgtttctc aattgaagaa gaacattgac aagggtttgg aattcgttgc ttccagatct 2100  
gcttccagtt aaggcccggg cgtgaattta ctttaaactc tgcatttaa taaatcttct 2160  
ttttatagct ttatgactta gtttcaattt atatactatt ttaatgacat tttcgattca 2220  
ttgattgaaa gctttgtgtt ttttcttgat gcgctattgc attgttcttg tctttttcgc 2280  
cacatgtaat atctgtagta gatacctgat acattgtgga tgctgagtga aatcttagtt 2340  
aataatggag gcgctcttaa taatcttggg gatattggct ttttttttta aagtttacia 2400  
atgaatcttt tccgccagga taacgattct gaagttactc ttagcgttcc tatcgggtaca 2460  
gccatcaaat catgcctata aatcatgcct atatttgctg gcagtcagta tcatctacat 2520  
gaaaaaaact cccgcaattt cttatagaat acgttgaaaa ttaaatgtac gcgccaagat 2580  
aagataacat atatctagat gcagtaatat acacagattc oggcccggcg cggccgc 2637

<210> 32

<211> 1966

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo sintético TDH3p-MDH3-TDH3t

<400> 32

ggatccggcg cgccacgcgt ggccggcctt agtcaaaaaa ttagcctttt aattctgctg 60  
taaccctgac atgccccaaa tagggggcgg gttacacaga atatataaca tcgtaggtgt 120  
ctgggtgaac agttttattcc tggcatccac taaatataat ggagcccgcct ttttaagctg 180

ES 2 522 622 T3

gcatccagaa aaaaaaagaa tcccagcacc aaaatattgt tttcttcacc aaccatcagt 240  
 tcatagggcc attctcttag cgcaactaca gagaacaggg gcacaaacag gcaaaaaacg 300  
 ggcacaacct caatggagtg atgcaacctg cctggagtaa atgatgacac aaggcaattg 360  
 acccaacgcat gtatctatct cattttotta caccttctat taccttctgc tctctctgat 420  
 ttgaaaaag ctgaaaaaaa aggttgaaac cagttccctg aaattattcc cctacttgac 480  
 taataagtat ataaagacgg taggtattga ttgtaattct gtaaatctat 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 tcaacaccaa 780  
 ctctcttctg gttgggttac acaaggattc catcgaaaac actttgtcca atgctcaagt 840  
 tgtcttgatt ccagctggtg ttccaagaaa gccaggtttg accagagatg atttgttcaa 900  
 gatgaacgct ggtatcgtta agtctttggg tactgctgtc ggtaaatttg ccccaaacgc 960  
 tcgtatctta gtcactctca acctgttaa ctctttgggt ccaattgccc ttgaaacttt 1020  
 gaagaagatg ggtaagtcca agccaggtaa cgttatgggt gtcaccaact tggatttggg 1080  
 cagagctgaa actttcttgg ttgactactt gatgttgaag aacccaaaga tcggtaaga 1140  
 acaagacaag accacatgac acagaaaggc caccgtcatc ggtggtcact ctgggtgaaac 1200  
 catcattcca atcatcactg acaaatcctt ggttttccaa ttggacaagc aatacgaaca 1260  
 tttcatccac agagtccaat tcggtgggta cgaaattgtc aaggccaagc aagggtgccc 1320  
 ttctgctacc ttgtccatgg ctctcgctgg tgccaaattt gctgaagaag tcttacgttc 1380  
 tttccacaac gaaaagccag aaactgaatc tttgtctgct ttcgtctact tgccaggttt 1440  
 gaagaacggg aagaaggctc aacaattagt cggtgacaac tccattgaat acttctcttt 1500  
 gccaatgtt ttgagaaaac gttccggtgt ttccattgac acttctgttt tggaaaaatt 1560  
 gtctccaaga gaagaacaat tggcaacac tgctgtcaag gaattgagaa agaacattga 1620  
 aaagggtaag 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 ggcgctotta ataattttgg ggatattggc tttttttttt 1920  
 aaagtttaca aatgaatttt ttccgccagg atgggcccgc ggccgc 1966

<210> 33

<211> 2950

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo sintético TDH1-FUMR-TDH1t

<400> 33

ES 2 522 622 T3

ggatcccttc ccttttacag tgcttcggaa aagcacagcg ttgtccaagg gaacaat	60
tcttcaagtt aatgcataag aaatatcttt ttttatgttt agctaagtaa aagcagcttg	120
gagtaaaaaa aaaaatgagt aaatttctcg atggattagt ttctcacagg taacataaca	180
aaaaccaaga aaagcccgc tctgaaaact acagttgact tgtatgctaa agggccagac	240
taatgggagg agaaaaagaa acgaaatgtat atgctcattt acactctata tcaccatag	300
gaggataagt tgggctgagc ttctgatcca atttattcta tccattagtt gctgatatgt	360
cccaccagcc aacacttgat agtatctact cgccattcac ttccagcagc gccagtaggg	420
ttgttgagct tagtaaaaat gtgcgcacca caagcctaca tgactccaag tcacatgaaa	480
ccacaccgtg gggccttggt gcgctaggaa taggatatgc gacgaagacg cttctgctta	540
gtaaccacac cacattttca gggggtcgat ctgcttgctt cctttactgt cacgagcggc	600
ccataatcgc gctttttttt taaaaggcgc gagacagcaa 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
tctattotct ctcttgcata aataagaaat tcatcaagaa cttggtttga tatttcacca	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 cc aaagggttgg gaagccatcc aaaaggctgc	1260
tgacgaagtt atcgatggtt ctttgattga ccatttcca ttggttgtct ggcaaaccgg	1320

ES 2 522 622 T3

ttctgggtact caaaccaaga tgaacgtcaa tgaagtcata tccaacagag ccattgaatt 1380  
 gttgggtgggt gaattaggtt ccaaggctcc agtccacca aacgatcatg tcaacatgtc 1440  
 tcaatcttcc aacgacactt tccaactgc catgcacgtt gctgcocttg ttgaaattca 1500  
 cggtagattg attocagctt tgaccacttt gagagatgct ttgcaagcca aatctgctga 1560  
 attcgaacac atcatcaaga ttggtagaac ccacttgcaa gatgctaccc cattgacttt 1620  
 aggtcaagaa ttctccgggtt aactcaaca attgacctac ggtattgtct gtgttcaagg 1680  
 tactttggaa agattataca acttggctca aggtgggtact gctgtcggta ctggtttgaa 1740  
 caccagaaag ggtttcogatg ccaaggttgc tgaagccatt gcttccatca ctggtttacc 1800  
 attcaagacc gctccaaaca aattcgaagc tttggctgct cagcagctt tggttgaagc 1860  
 tcacgggtgct ttgaacaccg ttgcttgctt tttgatgaag attgccaacg atatccgtta 1920  
 cttgggttct ggtocaagat gtggtttagg tgaattgtct ctaccagaaa acgaaccagg 1980  
 ttcttccatc atgccaggta aggtcaacc aactcaatgt gaagctatga ccatggtttg 2040  
 tgctcaagtc atgggtaaca aactgccat ctctgttctt ggttccaaag gtcaattcga 2100  
 attgaatgtc tttaaaccag tcatgatcaa gaacttgatc caatccatca gattaatctc 2160  
 tgacgcttcc atctctttca ccaagaactg tgttgctcgggt attgaagcta acgaaaagaa 2220  
 gatctcctcc atcatgaacg aatctttgat gttggctact gctttgaacc ctcacattgg 2280  
 ttacgacaag gctgccaagt gtgccaagaa ggctcacaag gaaggtacca ctttgaaaga 2340  
 agctgctota tctttgggtt acttgacctc tgaagaattc gaccaatggg ttagacctga 2400  
 ggacatgatt tctgccaagg attaaggccc gggcataaag caatcttgat gaggataatg 2460  
 attttttttt gaatatacat aaatactacc gtttttctgc tagattttgt gaagacgtaa 2520  
 ataagtacat attacttttt aagccaagac aagattaagc attaacttta cccttttctc 2580  
 ttctaagttt caatactagt tctactggtt taaaagttat ggcgagaacg tcgggggtta 2640  
 aaatatatta cctggaacgt ggtgaattga agttctagga tggttttaaag atttttcctt 2700  
 tttgggaaat aagtaaacaa tatattgotg cctttgcaaa acgcacatac ccacaatatg 2760  
 tgactattgg caaagaacgc attatccttt gaagaggtgg atactgatac taagagagtc 2820  
 tctattccgg ctccactttt agtccagaga ttacttgtct tcttacgtat cagaacaaga 2880  
 aagcatttcc aaagtaattg catttgccct tgagcagtat atatatacta agaaggcgcg 2940  
 ccgcgccgc 2950

<210> 34

<211> 5037

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> constructo sintético TDH3p-FRDm1-TDH3t

<400> 34

ES 2 522 622 T3

ggatccggcg cgccctatth tggaggacct tgtcaccttg agcccaagag agccaagatt 60  
 taaatthtcc tatgacttga tgcaaatthc caaagctaat aacatgcaag acacgtacgg 120  
 tcaagaagac atatthtgacc thttaacagg thcagacgcg actgcctcat cagtaagacc 180  
 cgttgaaaag aactthacctg aaaaaaacga atatatacta gcgttgaatg thagcgtcaa 240  
 caacaagaag thtaatgacg cggaggccaa ggcaaaaaga thccttgatt acgtaaggga 300  
 gttagaatca thttgataa aaaaacgct thttcagthc gagthtatca thtatcaatac 360  
 tgccatthca aagaatacgt aaataatthaa tagtagtgat thtthcact thtatthagthc 420  
 aaaaaatthag cththtaath ctgctgthaac cgtacatgc ccaaataggg gggcgggthta 480  
 cacagaatath ataacatcgt aggtgthctgg gthgaacagth ththcctggc atthcactaaa 540  
 tataatggag ccgctththt aagctggcat ccagaaaaaa aagaathccc agcaccaaaa 600  
 ththgththc thcacciaacc atcagththc aggtthcathc ththtagcgc actacagaga 660  
 acaggggac aaacaggcaa aaaaaggca caactthaat ggagthgagc aactgctgthc 720  
 gagthaatga thgacacaagg caathgaccc acgcatgthc ththctthcatt thththcacc 780  
 thctaththc thctgctthc thctgaththg aaaaagctga aaaaaaggt thgaaaccagth 840  
 thcctgaaath ththcctthc ththgacthaath aagthataaa agacggthagg ththgaththg 900  
 aathctgthaa atthctththc thaaactthct aaaththcact ththathgthta gththththth 960  
 thgthththaa acaccaagaa ththgththc aataaacaca cthaaacaaa caaathgggt 1020  
 gctgathgthta ththctthcgc ththcathgth ththactgacc cagaagctgc thccaagaag 1080  
 cgtgacagaa thggccagaga athgthgthc thcaactctg gthctathgthc agaagathgaa 1140  
 ccaaccathca thcaactthaa gggththgaa cacaccathc cthacagath ggcgthgth 1200  
 thgthgthact ccagathccac thgthgathc gaagccaagg ctgctgaaath ththgagaaag 1260  
 gctththcaca thgthgacta thctththgath thgththcaacc cagaathctga athgthcccgt 1320  
 gthcaactthc thaccagthcgg thgaaagcac caathgthcgg aagaththcag acathgthcag 1380  
 gaathgthacca ththctgthca cthctthct gthathgggt thgaccagc thgthgthca 1440



ES 2 522 622 T3

atcatctcca gattgagagg tgccatgaga gatcacaacg acatgtccga tatctccgtc 1500  
 actgaagctg aagttgaatt attctctttg gtcfaatctt tcgatgtcga cttggaagaa 1560  
 ggtactattg ccagaaagca ctctgaagcc agattggatt tgggtggtgt caacaagggc 1620  
 tacactgttg actacgtttg tgaccatttg agagctgctg gtatgccaaa cgtcttgctc 1680  
 gaatgggggtg gtgatatcag agcttctggt agaaacatca agggtaactt gtgggctggt 1740  
 gccatcaagc gtccaccatc tgttgaagaa gttatccgtc gtgccaaagg taagatgtta 1800  
 aagatgggtg aagaagaaca agaagaaaag gacgatgact ctccatcttt gttgcacgct 1860  
 gttgaattgg atgacgaagc tttgtgtacc tctggtgact acgaaaacgt cttataccat 1920  
 ccaaagcacg gtggtgctgg ttccattttc gactggcaac gtcgtggttt attgtctcca 1980  
 gaagaagggtg ctttagctca agtttccgtc aaatgttact ctgccatgta cgctgatgct 2040  
 ttggccactg tttgtttggt caagagagat gctgtcagaa tcagatactt gttggaaggt 2100  
 tggagatacg tcagatctcg tgtcaccaac tacttccgctt acaccagaca agtgaaaga 2160  
 ttggctcaca tgcacgaaat tgctcaagaa accagagaat taagagaaat cagaattgct 2220  
 ggttctttgc catccagaat tgttatcgtc ggtggtggtt tggctggtct atccgctgcc 2280  
 attgaagctg cttottgtgg tgctcaagtc attttgatgg aaaaggaagg tagaattggt 2340  
 ggtaactctg ccaaggctac ctctggtatc aacggttggg gtaccagaac ccaagccaag 2400  
 tctgatatct tggatggtg taagtacttt gaaagagaca ctttcttgtc cgggtcgggt 2460  
 ggtaccactg acccagcttt ggtcaaggtc ttgtccgctc aatctggtga cgetatcggc 2520  
 tggttaactt ctttgggtgt occattgtcc gttttgtctc aattgggtgg tcactctttc 2580  
 aagagaactc acagagctcc agacaagact gatggtactc cattaccaat tggtcacacc 2640  
 atcatgagaa ctttgggaaga tcatatcaga aacaacttgt ctgaaagagt taccatcatg 2700  
 acccagcttt ctgttactga attggtgcac gaaactgaca ccactccaga tggtgcttct 2760  
 gaagttcgtg tcaccgggtg ccgttacaga gacttgtctg atgtcgatgg tcaaccttcc 2820  
 aaactattgg ctgacgctgt tgttttggcc actggtggtt tctccaacga cagagaagaa 2880  
 aactctttgt tgtgtaaata cgctcctcat ttggcttctt tcccaactac caacggtcca 2940  
 tgggctactg gtgacgggtg caaattggcc acctccgctg gtgccaaagt ggttgacatg 3000  
 gacaaggctc aattgcaccc aactggtttg attgacccaa aggaccagc taacaccact 3060  
 aagatcttgg gtccagaagc tttgagaggt tctggtggtt ttttgttgaa caagcaaggt 3120

ES 2 522 622 T3

aagagattcg tcaacgaatt ggacttgaga tccgttgttt ccaaggccat taactactca 3180  
 ggtaacgaat acccaggttc tgggtggtgt tactttgctt actgtgtctt aaacgaagat 3240  
 gctaccaact tattctgtgg tgggtgctttg ggtttctacg gtaagaaatt aggtttgttc 3300  
 caaagagctg aaactggtga agaattggcc aaattgattg gttgtgacga aggtgaattg 3360  
 agagacactt tggaaaaata cgaaacctgt tccaaggcca aggttgcttg tccagtcaact 3420  
 ggtaaggtg ttttccatg tgttgcggt accagaggtc catacaatgt tgctttcgtc 3480  
 actccatcca tccactacac catgggtggt tgtttgatct ctccagctgc tgaagtcttg 3540  
 caagaataca aggtttgaa tatcttgaa aaccacagac caatcagatg tttgttcggt 3600  
 gctggtgaag tcaactggtg tgtccacggt ggtaacagat taggtggtaa ctctctattg 3660  
 gaatgtgtg tctttggtga gattgctggt gacagagctg ccaactatctt gcaaaaagaga 3720  
 gaaattgctt tgtccaagac ctctggacc tctgttgtg tcagagaatc cagatctggt 3780  
 gaacaattcg gtaccggttc cagagttttg agattcaact tgccaggtgc tttacaaaga 3840  
 accggtttga acttgggtga atctggtgcc atcagagggtg aatgggatgg tcaacaatta 3900  
 gtcggttact tctctccaat cactttgcc gaagatttgg gtaccatctc tttgttggtc 3960  
 agagctgaca aggttacttt gaaggaatgg atctgtgctt tgcgtccagg tgactccggt 4020  
 gaaatcaagg cttgtggtg tctaagaatt gaccaagatc cagtcaagaa atgtttgtg 4080  
 ttcagaaaca gaccaattac cagatttgc tgggtgctg ctggtaccgg tgttgcctca 4140  
 atgttgcaag ttatcagagc tgctttgaag aagccatacg tcgacacttt ggaatccatc 4200  
 agattgatct acgctgctga agaatatgac actttaacct acagatctat cttgcaaaga 4260  
 tttgctgaag aattccaga caaattcgtt tgtaacttcg tcttaacaa cctccagaa 4320  
 ggttgaccg gtggtggtg tttcgtcaac aagaatctt tgcaaaagg tttgcaacca 4380  
 ccttctctg aaccattgat tgttgtttgt ggtccaactg ttatgcaaag agatgtcaaa 4440  
 aatgaattgt tgtccatggg ttacgacaag gaattgggtc aactgtcga tgggtaatct 4500  
 ggtacctgt aaggccggg cgtgaattta ctttaaactc tgcatttaa taaattttct 4560  
 ttttatagct ttatgactta gtttcaatt atatactatt ttaatgacat tttcgattca 4620  
 ttgattgaaa gctttgtgtt ttttctgat gcgctattgc attgttcttg tcttttcgc 4680  
 cacatgtaat atctgtagta gatacctgat acattgtgga tgctgagtga aattttagtt 4740  
 aataatggag gcgctcttaa taattttgg gatattggct tttttttta aagtttaca 4800  
 atgaatttt tccgccagga taacgattct gaagtactc ttagcgttcc tatcgttaca 4860  
 gccatcaaat catgcctata aatcatgcct atatttgcgt gcagtcagta tcatctacat 4920  
 gaaaaaact cccgcaattt cttatagaat acgttgaaaa ttaaagtac gcgccaagat 4980  
 aagataacat atatctagat gcagtaatat acacagattc cggccggccg cggccgc 5037

<210> 35

<211> 4959

5 <212> ADN

<213> Construcción artificial

ES 2 522 622 T3

<220>

<223> secuencia artificial TDH3p-FRDg-TDH3t

<400> 35

```

ggatccggcg cgccctatTT tGaggacct tGtcacctg agcccaagag agccaagatt    60
taaattttcc tatgacttga tgcaaattcc caaagctaata aacatgcaag acacgtacgg    120
tcaagaagac atatttgacc tcttaacagg ttcagacgcg actgcctcat cagtaagacc    180
cgttgaaaag aacttacctg aaaaaaacga atatatacta gcggtgaaTg ttagcgtcaa    240
caacaagaag tttaatgacg cggaggccaa ggcaaaaaga ttccttgatt acgtaaggga    300
gttagaatca ttttgaataa aaaacaogct ttttcagttc gagtttatca ttatcaatac    360
tgccatttca aagaatacgt aaataattaa tagtagtgat tttcctaact ttatttagtc    420
aaaaaattag ccttttaatt ctgctgtaac ccgtacatgc ccaaaatagg gggcgggTta    480
cacagaatat ataacatcgt aggtgtctgG gtgaacagtt tattcctggc atccactaaa    540
tataatggag cccgcttttt aagctggcat ccagaaaaaa aaagaatccc agcaccaaaa    600
tattgttttc ttcaccaacc atcagttcat aggtccattc tcttagcgca actacagaga    660
acaggggcac aaacaggcaa aaaacgggca caacctcaat ggagtgatgc aacctgcctg    720
gagtaaatga tgacacaagg caattgaccc acgcatgtat ctatctcatt ttottacacc    780
ttctattacc ttctgctctc tctgatttgG aaaaagctga aaaaaaaggT tgaaaccagt    840
tcctgaaat tattcccta cttgactaat aagtatataa agacggtagg tattgattgt    900
aattctgtaa atctatttct taaacttctt aaattctact tttatagTta gtotTTTTTT    960
tagttttaaA acaccaagaa cttagtttcg aataaacaca cataaacaAA caaaatggTt    1020
gatggtagat cttctgcttc cattgttgcc gttgaccag aaagagctgc cagagaaaga    1080
gatgctgctg ccagagcttt gttgcaagac tctccattgc acaccacat gcaatacgt    1140
acctctggtt tggaattgac tgttcatac gctttgaagg ttgttgcttc tgetgacact    1200

```

ES 2 522 622 T3

ttcgacagag ccaaggaagt tgctgatgaa gtcttgagat gtgcctggca attggctgac 1260  
 accgttttga actctttcaa cccaaactct gaagtctctt tagtcggtag attaccagtc 1320  
 ggtcaaaaagc atcaaatgtc tgctccattg aaacgtgtca tggcttggtg tcaaagagtc 1380  
 tacaactoct ctgctgggtg tttcgacca tccactgctc cagttgcca ggctttgaga 1440  
 gaaattgctt tgggtaagga aagaaacaat gcttgtttgg aagctttgac tcaagcttgt 1500  
 accttgcca actctttcgt cattgatttc gaagctggta ctatctccag aaagcacgaa 1560  
 cacgcttctt tggatttggg tgggtttcc aagggttaca tcgtcgatta cgtcattgac 1620  
 aacatcaatg ctgctgggtt caaaaacgtt ttctttgact ggggtgggta ctgtcgtgcc 1680  
 tccggtatga acgocagaaa cactccatgg gttgtcggta tcactagacc tccttccttg 1740  
 gacatgttgc caaacctcc aaaggaagct tcttacatct ccgtcatctc tttggacaat 1800  
 gaagctttgg ctacctctgg tgattacgaa aacttgatct aactgctga cgataacca 1860  
 ttgacctgta cctacgattg gaaaggtaag gaattgatga agccatctca atccaatctc 1920  
 gctcaagttt ccgtcaagtg ttactctgcc atgtacgctg acgctttggc taccgcttgt 1980  
 ttcacatcaagc gtgaccacgc caaggtcaga caattgttgg atggttgag atacgtaga 2040  
 gacaccgtca gagattaccg tgtctacgtc agagaaaacg aaagagttgc caagatgttc 2100  
 gaaattgcca ctgaagatgc tgaaatgaga aagagaagaa tttccaacac tttaccagct 2160  
 cgtgtcattg ttgttgggtg tggtttggct ggtttgtccg ctgccattga agctgctggt 2220  
 tgtggtgctc aagtgtttt gatggaaaag gaagccaagt tgggtggtaa ctctgccaag 2280  
 gctacctctg gtatcaacgg ttgggtact agagctcaag ctaaggcttc cattgtcgat 2340  
 ggtggttaagt acttcgaaaag agatacctac aagtctggta tcggtggtaa caccgatcca 2400  
 gctttgggta agactttgtc catgaaatct gctgacgcta tcggttggtt gacttctcta 2460  
 ggtgttccat tgactgtttt gtccaatta ggtggtcact ccagaaagag aactcacaga 2520  
 gctccagaca agaaggatgg tactccattg ccaattggtt tcaccatcat gaaaacttta 2580  
 gaagatcatg ttagaggtaa cttgtccggt agaatcacca tcatggaaaa ctgttccggt 2640  
 acctcttgt tgtctgaaac caaggaaaga ccagacggtc ccaagcaat cagagttacc 2700  
 ggtgtcgaat tcaactcaagc tggttctggt aagaccacca ttttggtgta tgcgtttatc 2760  
 ttggccaccg gtggtttctc caacgacaag actgctgatt ctttgttgag agaacatgcc 2820  
 ccacacttgg ttaacttccc aaccaccaac ggtccatggg ctactggtga tgggtgcaag 2880  
 ttggctcaaa gattaggtgc tcaattggtc gatatggaca aggttcaatt gcaccaact 2940

ES 2 522 622 T3

ggtttgatca acccaaagga cccagccaac ccaaccaa at tcttgggtcc agaagctcta 3000  
 agaggttctg gtggtgtttt gttgaacaaa caaggttaaga gatttgtcaa cgaattggat 3060  
 ttgagatctg ttgtttccaa ggccatcatg gaacaagggtg ctgaatacc aggttctgggt 3120  
 ggttccatgt ttgcttactg tgtcttgaac gctgctgctc aaaaattggt tgggttttcc 3180  
 tctcacgaat tctactggaa gaagatgggt ttgttcgtca aggctgacac catgagagac 3240  
 ttggctgctt tgattggttg tccagttgaa tccgttcaac aaactttaga agaatacgaa 3300  
 agattatcca tctctcaaag atcttgtcca attaccagaa aatctgttta cccatgtggt 3360  
 ttgggtacca aaggtccata ctatgtcgcc tttgtcactc catctatcca ctacaccatg 3420  
 ggtggttgtt tgatttctcc atctgctgaa atccaaatga agaacacttc ttccagagct 3480  
 ccattgtccc actccaaccc aatcttgggt ttattcgggtg ctggtgaagt caccgggtgg 3540  
 gtccacgggtg gtaacagatt aggtggtaac tcttggttgg aatgtgttgt tttcggtaga 3600  
 attgccgggtg acagagcttc taccattttg caaagaaagt cctctgcttt gtctttcaag 3660  
 gtctggacca ctggtgtttt gagagaagtc agagaagggtg gtgtctacgg tgctggttcc 3720  
 cgtgtcttga gattcaactt accaggtgct ctacaaagat ctggtctatc cttgggtcaa 3780  
 ttcattgcca tcagagggtg ctgggaocgt caacaattga ttggttacta ctctccaatc 3840  
 actttgccag acgatttggg tatgattgac attttggcca gatctgacaa gggactttta 3900  
 cgtgaatgga tctctgcttt ggaaccaggt gacgctgctg aatgaaggc ttgtgggtgg 3960  
 ttgggtcatg aaagaagatt atctgacaag cacttcggtt tcatgggtca cattatcaac 4020  
 aagctatggt tgattgctgg tggtagcgggt gttgctocaa tgttgcaaat catcaaggcc 4080  
 gctttcatga agccattcat cgacactttg gaatccgtcc acttgatcta cgctgctgaa 4140  
 gatgtcactg aattgactta cagagaagtt ttggaagaac gtcgtcgtga atccagaggt 4200  
 aaattcaaga aaactttcgt tttgaacaga cctcctocat tatggactga cgggtgctgg 4260  
 ttcactgacc gtggtatctt gaccaaccac gttcaaccac catctgacaa cttattgggt 4320  
 gccatctgtg gtccaccagt tatgcaaaga attgtcaagg ccactttaa gactttaggt 4380  
 tacaacatga acttggctcag aaccggtgac gaaactgaac catctggaag ttaaggccc 4440  
 ggctggaatt tactttaaat cttgcattta aataaatttt ctttttatag ctttatgact 4500  
 tagtttcaat ttatatacta ttttaatgac attttcgatt cattgattga aagctttgtg 4560  
 ttttttcttg atgcgctatt gcattgttct tgtcttttcc gccacatgta atatctgtag 4620  
 tagataacctg atacattgtg gatgctgagt gaaattttag ttaataatgg aggcgctctt 4680  
 aataattttg gggatattgg cttttttttt taaagtttac aatgaattt tttccgccag 4740  
 gataacgatt ctgaagttac tcttagcgtt cctatcggta cagccatcaa atcatgccta 4800  
 taaatcatgc ctatatttgc gtgcagtcag tatcatctac atgaaaaaaaa ctcccgcaat 4860  
 ttcttataga atacgttgaa aattaaatgt acgcgccaaag ataagataac atatatctag 4920  
 atgcagtaat atacacagat tccggccggc cgcggccgc 4959

<210> 36

<211> 438

ES 2 522 622 T3

<212> PRT

<213> *Schizosaccharomyces pombe*

<400> 36

Met Gly Glu Leu Lys Glu Ile Leu Lys Gln Arg Tyr His Glu Leu Leu  
 1 5 10 15

Asp Trp Asn Val Lys Ala Pro His Val Pro Leu Ser Gln Arg Leu Lys  
 20 25 30

His Phe Thr Trp Ser Trp Phe Ala Cys Thr Met Ala Thr Gly Gly Val  
 35 40 45

Gly Leu Ile Ile Gly Ser Phe Pro Phe Arg Phe Tyr Gly Leu Asn Thr  
 50 55 60

Ile Gly Lys Ile Val Tyr Ile Leu Gln Ile Phe Leu Phe Ser Leu Phe  
 65 70 75 80

Gly Ser Cys Met Leu Phe Arg Phe Ile Lys Tyr Pro Ser Thr Ile Lys  
 85 90 95

Asp Ser Trp Asn His His Leu Glu Lys Leu Phe Ile Ala Thr Cys Leu  
 100 105 110

Leu Ser Ile Ser Thr Phe Ile Asp Met Leu Ala Ile Tyr Ala Tyr Pro  
 115 120 125

Asp Thr Gly Glu Trp Met Val Trp Val Ile Arg Ile Leu Tyr Tyr Ile  
 130 135 140

Tyr Val Ala Val Ser Phe Ile Tyr Cys Val Met Ala Phe Phe Thr Ile

ES 2 522 622 T3

145 150 155 160

Phe Asn Asn His Val Tyr Thr Ile Glu Thr Ala Ser Pro Ala Trp Ile  
165 170 175

Leu Pro Ile Phe Pro Pro Met Ile Cys Gly Val Ile Ala Gly Ala Val  
180 185 190

Asn Ser Thr Gln Pro Ala His Gln Leu Lys Asn Met Val Ile Phe Gly  
195 200 205

Ile Leu Phe Gln Gly Leu Gly Phe Trp Val Tyr Leu Leu Leu Phe Ala  
210 215 220

Val Asn Val Leu Arg Phe Phe Thr Val Gly Leu Ala Lys Pro Gln Asp  
225 230 235 240

Arg Pro Gly Met Phe Met Phe Val Gly Pro Pro Ala Phe Ser Gly Leu  
245 250 255

Ala Leu Ile Asn Ile Ala Arg Gly Ala Met Gly Ser Arg Pro Tyr Ile  
260 265 270

Phe Val Gly Ala Asn Ser Ser Glu Tyr Leu Gly Phe Val Ser Thr Phe  
275 280 285

Met Ala Ile Phe Ile Trp Gly Leu Ala Ala Trp Cys Tyr Cys Leu Ala  
290 295 300

Met Val Ser Phe Leu Ala Gly Phe Phe Thr Arg Ala Pro Leu Lys Phe  
305 310 315 320

Ala Cys Gly Trp Phe Ala Phe Ile Phe Pro Asn Val Gly Phe Val Asn  
325 330 335

Cys Thr Ile Glu Ile Gly Lys Met Ile Asp Ser Lys Ala Phe Gln Met  
340 345 350

Phe Gly His Ile Ile Gly Val Ile Leu Cys Ile Gln Trp Ile Leu Leu  
355 360 365

Met Tyr Leu Met Val Arg Ala Phe Leu Val Asn Asp Leu Cys Tyr Pro  
370 375 380

Gly Lys Asp Glu Asp Ala His Pro Pro Pro Lys Pro Asn Thr Gly Val  
385 390 395 400

Leu Asn Pro Thr Phe Pro Pro Glu Lys Ala Pro Ala Ser Leu Glu Lys  
405 410 415

Val Asp Thr His Val Thr Ser Thr Gly Gly Glu Ser Asp Pro Pro Ser  
420 425 430

Ser Glu His Glu Ser Val  
435

ES 2 522 622 T3

<210> 37

<211> 1317

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> malato permeasa de *S. pombe* cpo para *S. cerevisiae*

<400> 37

atgggtgaat tgaaggaaat cttgaagcaa cgttaccatg aattggttga ctggaacgtc	60
aaggctccac acgttccatt gtctcaaaga ttgaagcatt tcacctggtc ctggtttgc	120
tgtaccatgg ccaactggtg tgctcggttg atcattgggt ctttcccatt cagattctac	180
ggtttgaaca ccattggtaa gattgtctac atcttcaaaa tcttcttatt ctctttgttt	240
ggttcttgta tgttgttcag attcatcaaa taccatctca ccatcaagga ctctggaac	300
caccacttgg aaaaattatt cattgctacc tgtttgctat ccatctccac tttcattgac	360
atggtggcca totacgctta cccagacact ggtgaatgga tggctcgggt tatcagaatc	420
ttatactaca tctacgttgc tgtctcttcc atctactgtg tcatggcttt ctccaccatt	480
ttcaacaacc acgtttacac cattgaaact gcttctccag cttggatctt accaatttcc	540
ccaccaatga tctgtggtgt cattgctggg gctgtcaact ccaactcaacc agctcaccaa	600
ttgaagaaca tggttatctt cggtatctta ttccaagggt tgggtttctg ggtttacttg	660
ttgttgtttg ctgtcaacgt tttgagattc ttcaccgttg gtttgccaa gcctcaagac	720
agaccaggta tgttcatggt tgttgggtcca ccagctttct ccggtttggc tttgatcaac	780
attgccogtg gtgctatggg ttccagacca tacattttcg tcggtgccaa ttcttctgaa	840
tacttggggt tcgtttccac ttccatggcc attttcatct ggggtttggc tgccttgggt	900
tactgtttgg ccatggtttc tttcttggct ggtttcttca ccagagctcc attgaaattt	960
gcttgtgggt gggttgcctt catcttccca aaogtgggt tcgttaactg taccattgaa	1020
attggtgaaga tgattgactc caagccttc caaatgttcg gtcacatcat cgggtgcatc	1080
ctatgtatcc aatggatctt gttgatgtac ttgatggcca gagctttctt ggtcaacgat	1140
ttgtgttacc caggtgaagga tgaagatgct caccacctc caaagccaaa cactggtggt	1200
ttgaacccaa ctttcccacc agaaaaggct ccagcttctt tggaaaagggt tgacaccac	1260
gttacttcca ctgggtggtga atctgatcct ccatcttctg aacacgaaag cgtttaa	1317

10 <210> 38

<211> 600

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> T del promotor ENO1 en la posición -5 se cambió a A a fin de obtener una secuencia de Kozak mejor

<400> 38



ES 2 522 622 T3

ccgcggaacc gccagatatt cactacttga cgcaaaagcg tttgaaataa tgacgaaaaa 60  
 gaaggaagaa aaaaaaagaa aaataccgct tctaggcggg ttatctactg atccgagctt 120  
 ccactaggat agcacccaaa cacctgcata tttggaagac ctttacttac accaccaaaa 180  
 accactttcg cctctcccgc ccctgataac gtccactaat tgagcgatta cctgagcggg 240  
 cctcttttgt ttgcagcatg agacttgcac actgcaaatac gtaagtagca acgtctcaag 300  
 gtcaaaaactg tatggaaacc ttgtcacctc acttaattct agctagccta ccctgcaagt 360  
 caagaggctc ccgtgattcc tagccacctc aaggatgcc tctcccggga aactgtggcc 420  
 tttctggca cacatgatct ccacgatctc aacatataaa tagcttttga taatggcaat 480  
 attaataaaa tttattttac ttctttcttg taacatctct cttgtaatcc cttattcctt 540  
 ctagctattt ttcataaaaa accaagcaac tgcttatcaa cacacaaaca ctaaaacaaa 600

<210> 39

<211> 300

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> terminador ENO1

<400> 39

agcttttgat taagccttct agtccaaaaa acacgttttt ttgtcattta tttcattttc 60  
 ttagaatagt ttagtttatt cattttatag tcacgaatgt tttatgattc tatatagggt 120  
 tgcaacaag catttttcat tttatgttaa aacaatttca ggtttacctt ttattctgct 180  
 tgtggtgacg cgggtatccg cccgctcttt tggtcacca tgtatttaat tgcataaata 240  
 10 attcttaaaa gtggagctag tctatttcta tttacatacc tctcatttct catttctctc 300

<210> 40

<211> 2240

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> constructo sintético ENO1p-SpMAE-ENO1t

<400> 40

ES 2 522 622 T3

ggatccggcg cgccccggg aaccgccaga tattcattac ttgacgcaa agcgtttgaa 60  
 ataatgacga aaaagaagga agaaaaaaaa agaaaaatac cgcttctagg cgggttatct 120  
 actgatccga gcttccacta ggatagcacc caaacacctg catatttggga cgacctttac 180  
 ttacaccacc aaaaaccact ttgcctctc cgcacctga taacgtccac taattgagcg 240  
 attacctgag cggtcctctt ttgtttgcag catgagactt gcatactgca aatcgtaagt 300  
 agcaacgtct caaggtcaaa actgtatgga aaccttgtca cctcacttaa ttctagctag 360  
 cctaccctgc aagtcaagag gtctccgtga ttcttagcca cctcaaggta tgcctctccc 420  
 cggaaactgt ggccttttct ggcacacatg atctccacga tttcaacata taaatagctt 480  
 ttgataatgg caatattaat caaatttatt ttacttcttt cttgtaacat ctctcttgta 540  
 atcccttatt ccttctagct atttttcata aaaaaccaag caactgctta tcaacacaca 600  
 aacctaaaa caaatgggt gaattgaagg aaatcttgaa gcaacgttac catgaattgt 660  
 tggactggaa cgtcaaggct ccacacgttc cattgtctca aagattgaag catttcacct 720  
 ggtcctggtt tgcttgtaac atggccaactg gtgggtgcgg tttgatcatt ggttctttcc 780  
 cattcagatt ctacggtttg aacaccattg gtaagattgt ctacatctta caaatcttct 840  
 tattctcttt gtttggttct tgtatgttgt tcagattcat caaatacca tctaccatca 900  
 aggactctg gaaccaccac ttggaaaaat tattcattgc tacctgtttg ctatccatct 960  
 ccactttcat tgacatgttg gccatctacg cttaccaga cactggtgaa tggatggtct 1020  
 gggttatcag aatcttatac tacatctacg ttgctgtctc tttcatctac tgtgtcatgg 1080  
 ctttcttcaac cattttcaac aaccacgttt acaccattga aactgcttct ccagcttgga 1140  
 tcttaccaat ttcccacca atgatctgtg gtgtcattgc tgggtgctgc aactccactc 1200

ES 2 522 622 T3

aaccagctca ccaattgaag aacatgggta tcttcggtat cttattocaa ggtttggggtt 1260  
tctgggttta cttggtgttg tttgctgtca acgttttgag attcttcacc gttgggttgg 1320  
ccaagcctca agacagacca ggtatgttca tgtttgttgg tccaccagct ttctccggtt 1380  
tggctttgat caacattgcc cgtgggtgcta tgggttccag accatacatt ttcgtcggtg 1440  
ccaattcttc tgaatacttg ggtttcgttt ccactttcat ggccattttc atctgggggtt 1500  
tggctgcttg gtgttactgt ttggccatgg tttctttctt ggctggtttc ttcaccagag 1560  
ctccattgaa atttgcttgt ggttgggttg ctttcatctt cccaaacgtc ggtttcggtta 1620  
actgtacat tgaattgggt aagatgattg actccaaggc cttccaaatg ttcggtcaca 1680  
tcctcgggtg catcctatgt atccaatgga tcttgttgat gtacttgatg gtcagagctt 1740  
tcttgggtcaa cgatttgtgt taccaggta aggatgaaga tgctcaccca cctccaaagc 1800  
caaacaactgg tgttttgaac ccaactttcc caccagaaaa ggctccagct tctttggaaa 1860  
aggttgacac ccacgttact tccactgggtg gtgaatctga tcctccatct tctgaacacg 1920  
aaagcgttta agagcttttg attaagcctt ctagtccaaa aaacacgttt ttttgcatt 1980  
tatttcattt tottagaata gtttagttta ttcattttat agtcacgaat gttttatgat 2040  
tctatatagg gttgcaaaca agcatttttc attttatggt aaaacaattt cagggttacc 2100  
ttttattctg cttgtggtga cgcgggtatc cgcccgtctt tttggtcacc catgtattta 2160  
attgcataaa taattcttaa aagtggagct agtctatttc tatttacata cctctcattt 2220  
ctcatttctt cgcggtccgc 2240

<210> 41

<211> 1180

<212> PRT

5 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 41

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

ES 2 522 622 T3

Ile Tyr Ser His Glu Asp Arg Leu Ser Met His Arg Leu Lys Ala Asp  
50 55 60

Glu Ala Tyr Val Ile Gly Glu Glu Gly Gln Tyr Thr Pro Val Gly Ala  
65 70 75 80

Tyr Leu Ala Met Asp Glu Ile Ile Glu Ile Ala Lys Lys His Lys Val  
85 90 95

Asp Phe Ile His Pro Gly Tyr Gly Phe Leu Ser Glu Asn Ser Glu Phe  
100 105 110

Ala Asp Lys Val Val Lys Ala Gly Ile Thr Trp Ile Gly Pro Pro Ala  
115 120 125

Glu Val Ile Asp Ser Val Gly Asp Lys Val Ser Ala Arg His Leu Ala  
130 135 140

Ala Arg Ala Asn Val Pro Thr Val Pro Gly Thr Pro Gly Pro Ile Glu  
145 150 155 160

Thr Val Gln Glu Ala Leu Asp Phe Val Asn Glu Tyr Gly Tyr Pro Val  
165 170 175

Ile Ile Lys Ala Ala Phe Gly Gly Gly Gly Arg Gly Met Arg Val Val  
180 185 190

Arg Glu Gly Asp Asp Val Ala Asp Ala Phe Gln Arg Ala Thr Ser Glu  
195 200 205

Ala Arg Thr Ala Phe Gly Asn Gly Thr Cys Phe Val Glu Arg Phe Leu  
210 215 220

Asp Lys Pro Lys His Ile Glu Val Gln Leu Leu Ala Asp Asn His Gly  
225 230 235 240

Asn Val Val His Leu Phe Glu Arg Asp Cys Ser Val Gln Arg Arg His  
245 250 255

Gln Lys Val Val Glu Val Ala Pro Ala Lys Thr Leu Pro Arg Glu Val  
260 265 270

Arg Asp Ala Ile Leu Thr Asp Ala Val Lys Leu Ala Lys Val Cys Gly

ES 2 522 622 T3

275		280		285											
Tyr	Arg	Asn	Ala	Gly	Thr	Ala	Glu	Phe	Leu	Val	Asp	Asn	Gln	Asn	Arg
	290					295					300				
His	Tyr	Phe	Ile	Glu	Ile	Asn	Pro	Arg	Ile	Gln	Val	Glu	His	Thr	Ile
305					310					315					320
Thr	Glu	Glu	Ile	Thr	Gly	Ile	Asp	Ile	Val	Ser	Ala	Gln	Ile	Gln	Ile
					325				330					335	
Ala	Ala	Gly	Ala	Thr	Leu	Thr	Gln	Leu	Gly	Leu	Leu	Gln	Asp	Lys	Ile
			340					345					350		
Thr	Thr	Arg	Gly	Phe	Ser	Ile	Gln	Cys	Arg	Ile	Thr	Thr	Glu	Asp	Pro
		355					360						365		
Ser	Lys	Asn	Phe	Gln	Pro	Asp	Thr	Gly	Arg	Leu	Glu	Val	Tyr	Arg	Ser
	370					375					380				
Ala	Gly	Gly	Asn	Gly	Val	Arg	Leu	Asp	Gly	Gly	Asn	Ala	Tyr	Ala	Gly
385					390					395					400
Ala	Thr	Ile	Ser	Pro	His	Tyr	Asp	Ser	Met	Leu	Val	Lys	Cys	Ser	Cys
				405					410					415	
Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Glu	Ile	Val	Arg	Arg	Lys	Met	Ile	Arg	Ala	Leu
			420					425					430		
Ile	Glu	Phe	Arg	Ile	Arg	Gly	Val	Lys	Thr	Asn	Ile	Pro	Phe	Leu	Leu
		435					440					445			
Thr	Leu	Leu	Thr	Asn	Pro	Val	Phe	Ile	Glu	Gly	Thr	Tyr	Trp	Thr	Thr
	450					455					460				
Phe	Ile	Asp	Asp	Thr	Pro	Gln	Leu	Phe	Gln	Met	Val	Ser	Ser	Gln	Asn
465					470					475					480
Arg	Ala	Gln	Lys	Leu	Leu	His	Tyr	Leu	Ala	Asp	Leu	Ala	Val	Asn	Gly
				485					490					495	
Ser	Ser	Ile	Lys	Gly	Gln	Ile	Gly	Leu	Pro	Lys	Leu	Lys	Ser	Asn	Pro
			500					505						510	

ES 2 522 622 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Ala Leu Asn Asp Leu Glu Gln Leu Lys Val Gly Val Asn Ala Val  
 675 680 685

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

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

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

ES 2 522 622 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 522 622 T3

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

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

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

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

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

Ile Glu Val Thr Ile Glu Gln Gly Lys Thr Leu Ile Ile Lys Leu  
 1040 1045 1050

Gln Ala Val Gly Asp Leu Asn Lys Lys Thr Gly Gln Arg Glu Val  
 1055 1060 1065

Tyr Phe Glu Leu Asn Gly Glu Leu Arg Lys Ile Arg Val Ala Asp  
 1070 1075 1080

Lys Ser Gln Asn Ile Gln Ser Val Ala Lys Pro Lys Ala Asp Val  
 1085 1090 1095

His Asp Thr His Gln Ile Gly Ala Pro Met Ala Gly Val Ile Ile  
 1100 1105 1110

Glu Val Lys Val His Lys Gly Ser Leu Val Lys Lys Gly Glu Ser  
 1115 1120 1125

Ile Ala Val Leu Ser Ala Met Lys Met Glu Met Val Val Ser Ser  
 1130 1135 1140

Pro Ala Asp Gly Gln Val Lys Asp Val Phe Ile Lys Asp Gly Glu  
 1145 1150 1155

Ser Val Asp Ala Ser Asp Leu Leu Val Val Leu Glu Glu Glu Thr  
 1160 1165 1170

Leu Pro Pro Ser Gln Lys Lys

1175 1180

<210> 42

<211> 3543

5 <212> ADN

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 42



ES 2 522 622 T3

atgagcagta gcaagaaatt ggccggtott agggacaatt tcagtttgct cggcgaaaag 60  
 aataagatct tggtcgccaa tagagtgaa attccgatta gaatttttag atctgctcat 120  
 gagctgtcta tgagaacat cgccatatac tcccatgagg accgtcttcc aatgcacagg 180  
 ttgaaggcgg acgaagcgta tggatocggg gaggagggcc agtatacacc tgtgggtgct 240  
 tacttgcaaa tggacgagat catcgaaatt gcaaagaagc ataaggtgga tttcatccat 300  
 ccaggttatg ggttcttctc tgaaaattcg gaatttgccg acaaagtagt gaaggccggt 360  
 atcacttgga tcggccctcc agctgaagtt attgactctg tgggtgacaa agtctctgcc 420  
 agacacttgg cagcaagagc taacgttccct accgttcccg gtactccagg acctatcgaa 480  
 actgtgcaag aggcacttga cttcgttaat gaatacggct acccggtgat cattaagccc 540  
 gcctttgggtg gtgggtgtag aggtatgaga gtcgtagag aaggtgacga cgtggcagat 600  
 gcctttcaac gtgctacctc cgaagcccggt actgccttcc gtaatggtac ctgctttgtg 660  
 gaaagattct tggacaagcc aaagcatatt gaagttcaat tgttggtgta taaccacgga 720  
 aacgtgggtc atcttttcga aagagactgt tctgtgcaaa gaagacacca aaaagttgtc 780  
 gaagtcgctc cagcaaagac tttgccccgt gaagttcgtg acgctatctt gacagatgct 840  
 gttaaattag ctaaggtatg tggttacaga aacgcaggta ccgccgaatt cttggttgac 900  
 aacccaaaaca gacactatct cattgaaatt aatccaagaa ttcaagtgga gcataccatc 960  
 actgaagaaa tcaccggtat tgacattggt tctgccc aaa tccagattgc cgcagggtgcc 1020  
 actttgactc aactaggtct attacaggat aaaatcacca cccgtgggtt ttccatccaa 1080  
 tgctgtatta ccaactgaaga tccctctaag aatttccaac cggataccgg tcgcttgag 1140  
 gtctatcggt ctgccggtgg taatggtgtg agattggacg gtggtaacgc ttatgcaggt 1200  
 gctactatct cgctcacta cgactcaatg ctggtcaaat gttcatgctc tggttctact 1260  
 tatgaaatcg tccgtaggaa gatgattcgt gccctgatcg aattcagaat cagaggtggt 1320  
 aagaccaaca ttcccttccct attgactcct ttgaccaatc cagtttttat tgagggtaca 1380  
 tactggaaga cttttattga cgacacccca caactgttcc aaatggtatc gtcacaaaac 1440

ES 2 522 622 T3

agagcgcaaa aactggtaca ctatttggca gacttggcag ttaacggtto ttctattaag 1500  
 ggtcaaattg gcttgccaaa actaaaatca aatccaagtg tccccattt gcacgatgct 1560  
 cagggcaatg tcatcaacgt tacaaaagtct gcaccacat cgggatggag acaagtgcta 1620  
 ctggaaaagg gaccatctga atttgccaag caagtcagac agttcaatgg tactctactg 1680  
 atggacacca cctggagaga cgctcatcaa tctctacttg caacaagagt cagaaccac 1740  
 gatttggcta caatcgctcc aacaacgca catgoccttg caggtgcttt cgctttagaa 1800  
 tgttggggtg gtgctacatt cgacgttgca atgagattct tgcattgagga tccatgggaa 1860  
 cgtctgagaa aattaagatc tctggtgoc t aatattccat tccaaatggt attacgtggt 1920  
 gccaacgggtg tggottactc ttcattacct gacaatgcta ttgaccattt tgtcaagcaa 1980  
 gccaaaggata atgggtgttg tatatttaga gtttttgatg ccttgaatga tttagaacaa 2040  
 ttaaaagttg gtgtgaatgc tgtcaagaag gccgggtggtg ttgtcgaagc tactgtttgt 2100  
 tactctgggtg acatgcttca gccaggtgaa aaatacaact tagactacta cctagaagtt 2160  
 gttgaaaaaa tagttcaaat gggtagacat atcttgggta ttaaggatat ggcaggtact 2220  
 atgaaaccgg ccgctgccaa attattaatt ggctccctaa gaaccagata tccggattta 2280  
 ccaattcatg ttcacagtca tgactccgca ggtactgctg ttgcgtctat gactgcatgt 2340  
 gccctagcag gtgctgatgt tgcgatgta gctatcaatt caatgctggg cttaaacttc 2400  
 caaccatcaa ttaatgcact gttggcttca ttagaaggta acattgatac tgggattaac 2460  
 gttgagcatg ttcgtgaatt agatgcatac tgggccgaaa tgagactggt gtattcttgt 2520  
 ttcgagggccg acttgaaggg accagatcca gaagttacc aacatgaaat cccaggtggt 2580  
 caattgacta acttgttatt ccaagctcaa caactgggtc ttggtgaaca atgggctgaa 2640  
 actaaaagag cttacagaga agccaattac ctactgggag atattgttaa agttacccca 2700  
 acttctaagg ttgtcgggtga tttagctcaa ttcattggtt ctaacaaact gacttccgac 2760  
 gatattagac gtttagctaa ttctttggac tttcctgact ctggtatgga cttttttgaa 2820  
 ggtttaattg gtcaaccata cgggtgggtc ccagaaccat taagatctga tgtattgaga 2880  
 aacaagagaa gaaagttgac gtgcccoca ggtttagaat tagaaccatt tgatctcgaa 2940  
 aaaattagag aagacttgca gaacagattc ggtgatattg atgaatgca tgttgcttct 3000  
 tacaatatgt atccaagggt ctatgaagat ttccaaaaga tcagagaaac atacgggtgat 3060  
 ttatcagttc taccaaccaa aaatttcta gcaccagcag aacctgatga agaaatcgaa 3120  
 gtcaccatcg aacaaggtaa gactttgatt atcaaattgc aagctgttgg tgacttaaat 3180  
 aagaaaactg ggcaaagaga agtgatattt gaattgaacg gtgaattaag aaagatcaga 3240  
 gttgcagaca agtcacaaaa catacaatct gttgctaac caaaggctga tgtccacgat 3300  
 actcaccaaa tcgggtgcacc aatggctggt gttatcatag aagttaaagt acataaaggg 3360  
 tctttggtga aaaagggcga atcgattgct gttttgagtg ccatgaaaat ggaaatggtt 3420  
 gtctcttcac cagcagatgg tcaagttaaa gaogttttca ttaaggatgg tgaaagtgtt 3480  
 gacgcatcag atttggtggt tgccttagaa gaagaaacc taccoccatc ccaaaaaaag 3540  
 taa 3543

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> cebador P1

<400> 43

ggactagtat gagcagtagc aagaaattgg 30

<210> 44

<211> 31

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador P2

<400> 44

15 ccgctcgagt tactttttt gggatggggg t 31

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula eucariota recombinante seleccionada del grupo que consiste en una levadura y un hongo filamentoso que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una fumarato reductasa dependiente de NAD(H) que cataliza la conversión de ácido fumárico en ácido succínico, en la que la fumarato reductasa dependiente de NAD(H) es activa en el citosol con la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica fumarato reductasa dependiente de NAD(H).
- 10 2. Una célula según la reivindicación 1, en la que la célula expresa una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima que cataliza la formación de ácido succínico, en la que la secuencia de nucleótidos codifica una fumarato reductasa dependiente de NAD(H), que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 40% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 3, y/o SEC ID NO: 6.
- 15 3. Una célula según la reivindicación 1 ó 2, en la que la fumarato reductasa dependiente de NAD(H) deriva de una *Trypanosoma* sp.
- 20 4. Una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la célula sobreexpresa además una secuencia de nucleótidos que codifica una piruvato carboxilasa.
- 25 5. Una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una fosfoenolpiruvato carboxinasa heteróloga.
6. Una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una malato deshidrogenasa activa en el citosol con la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica malato deshidrogenasa.
- 30 7. Una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima que cataliza la conversión de ácido málico en ácido fumárico en el citosol, con la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica enzima que cataliza la conversión de ácido málico en ácido fumárico.
- 35 8. Una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica un transportador de ácido dicarboxílico.
- 40 9. Una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que al menos un gen que codifica alcohol deshidrogenasa es no funcional.
10. Una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que al menos un gen que codifica glicerol-3-fosfato deshidrogenasa es no funcional.
- 45 11. Una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que al menos un gen que codifica succinato deshidrogenasa es no funcional.
12. Una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que es una *Aspergillus*, preferiblemente una *Aspergillus niger*.
- 50 13. Una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que es una *Saccharomyces cerevisiae*.
14. Un procedimiento para la preparación de ácido succínico, que comprende fermentar una célula eucariota según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en un medio de fermentación adecuado, en el que se prepara ácido succínico.
- 55 15. Un caldo de fermentación que comprende ácido succínico, en el que el caldo de fermentación es obtenible mediante el procedimiento según la reivindicación 14.

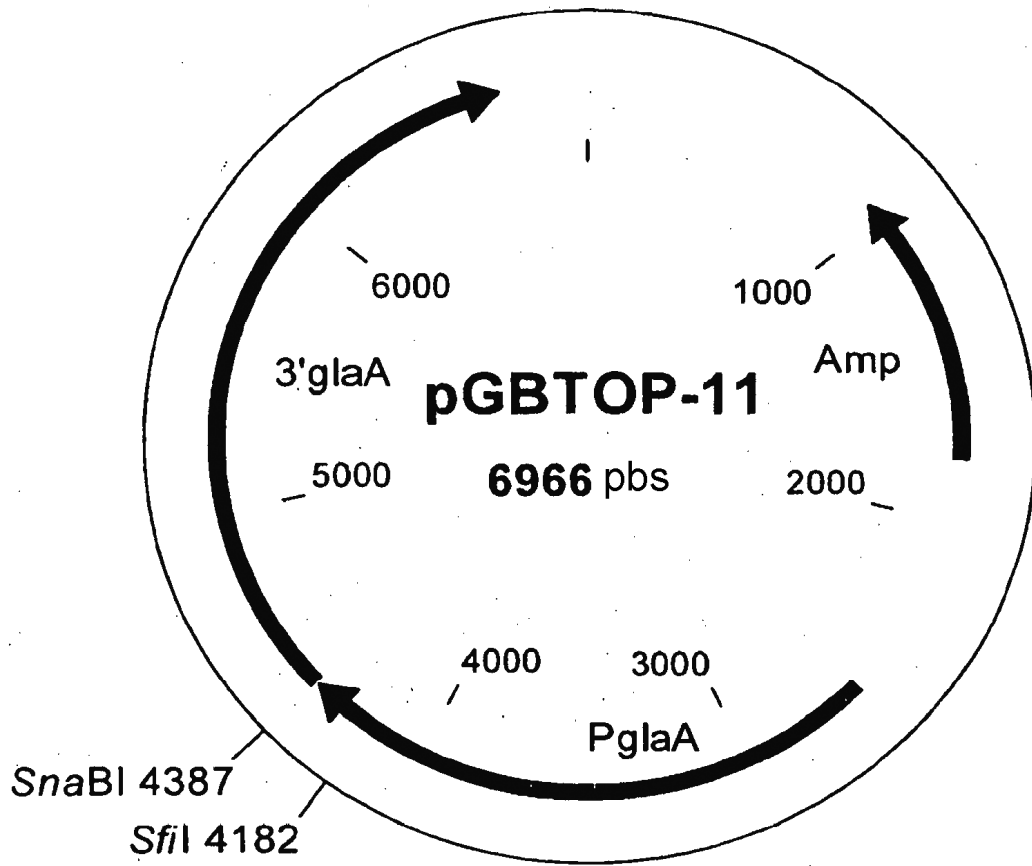


Figura 1

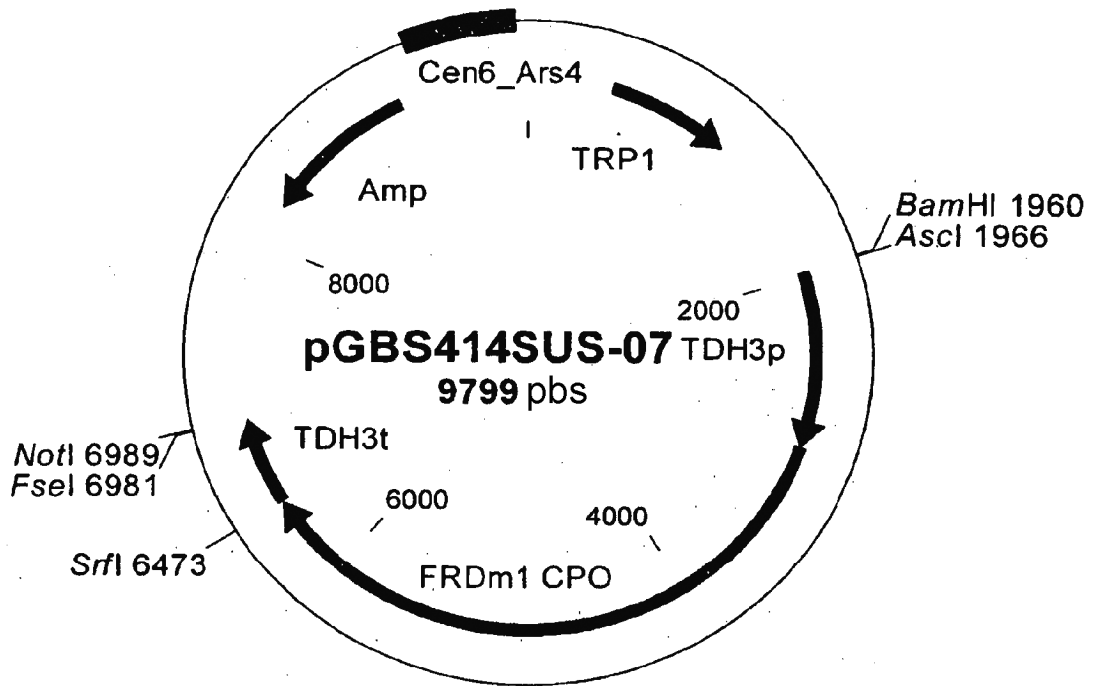


Figura 2

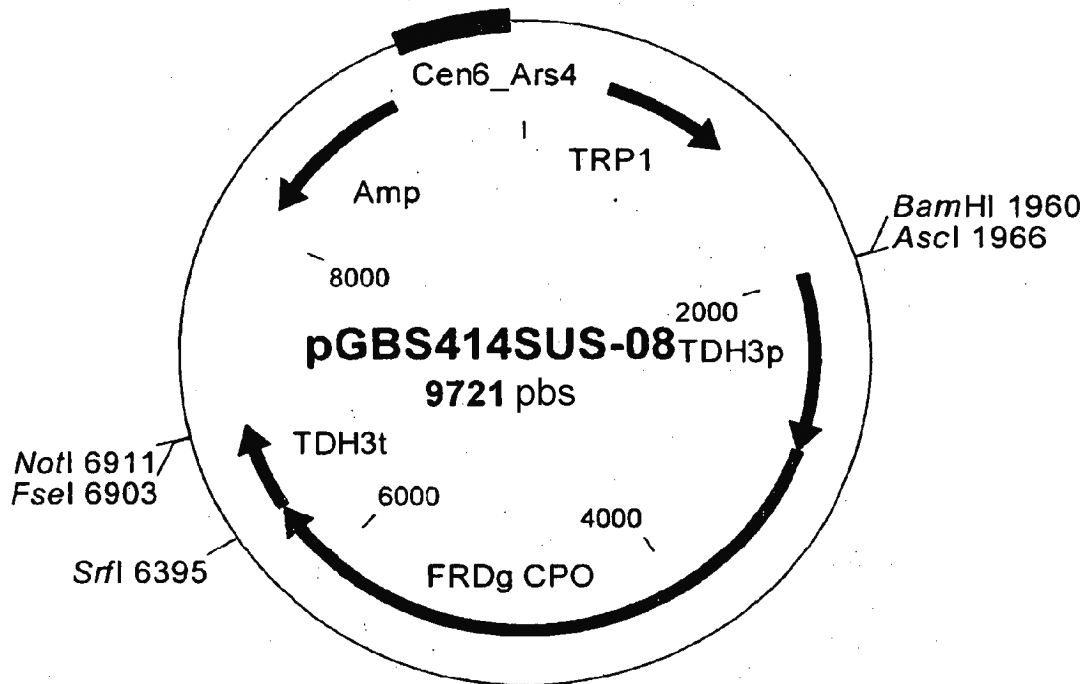


Figura 3

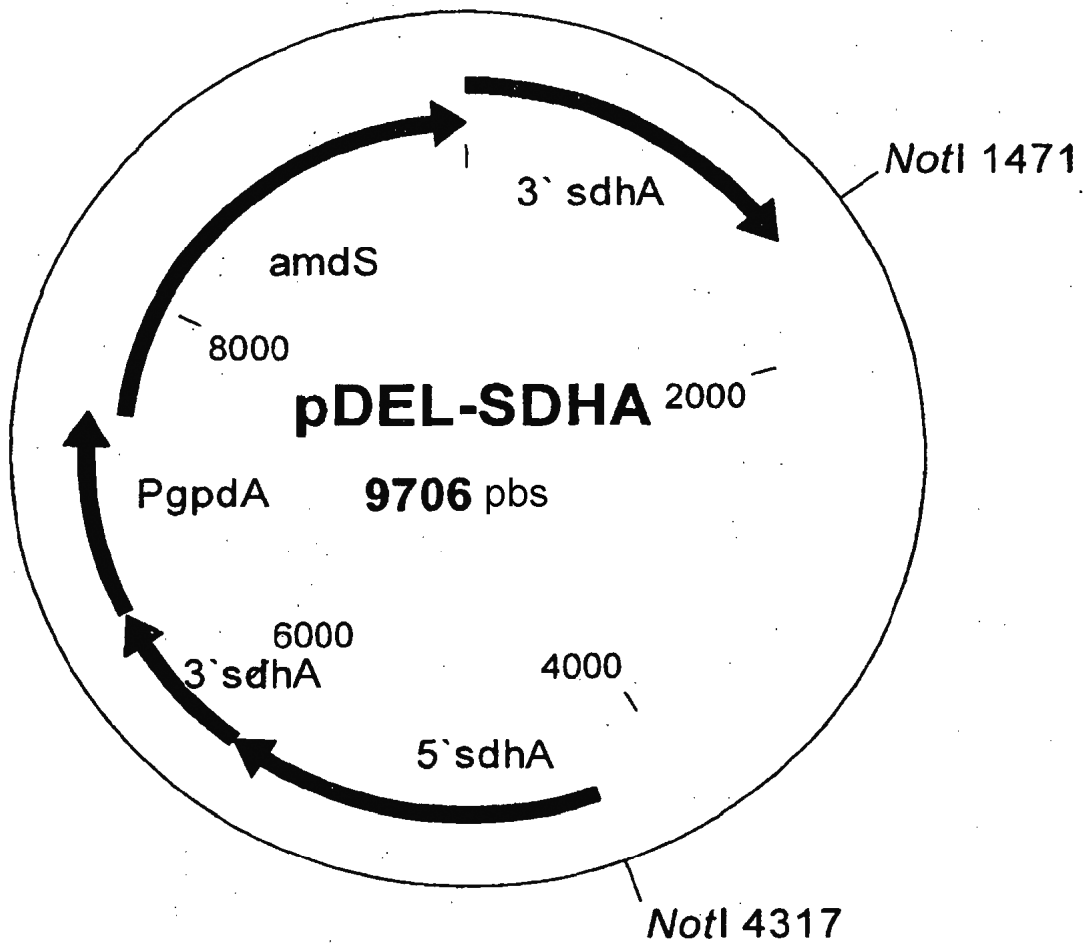


Figura 4



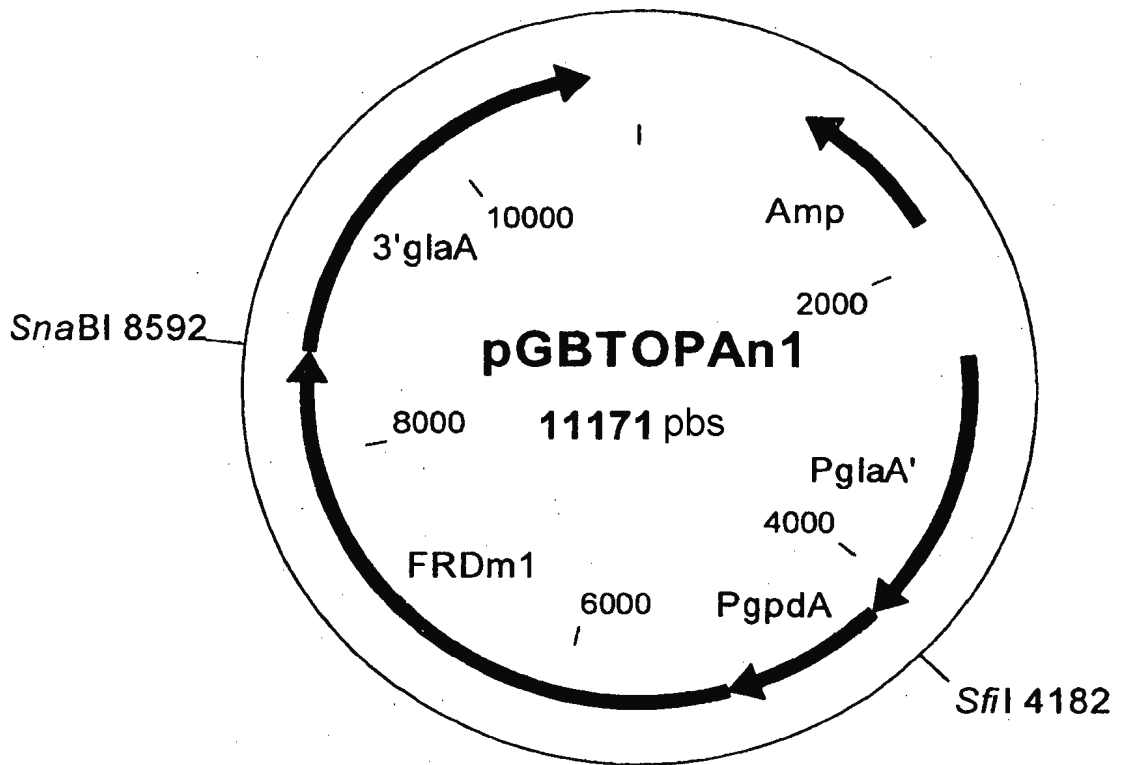


Figura 5

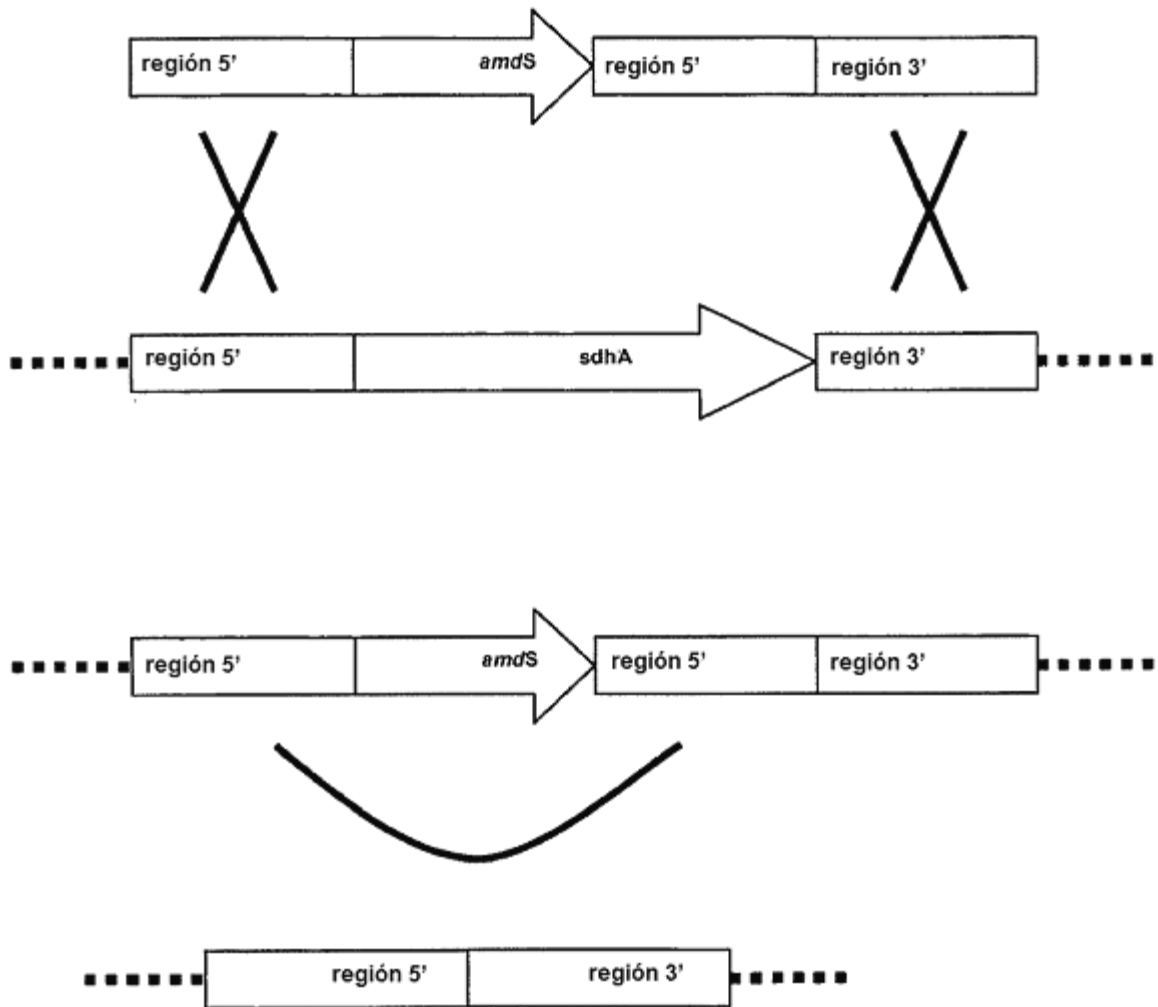


Figura 6

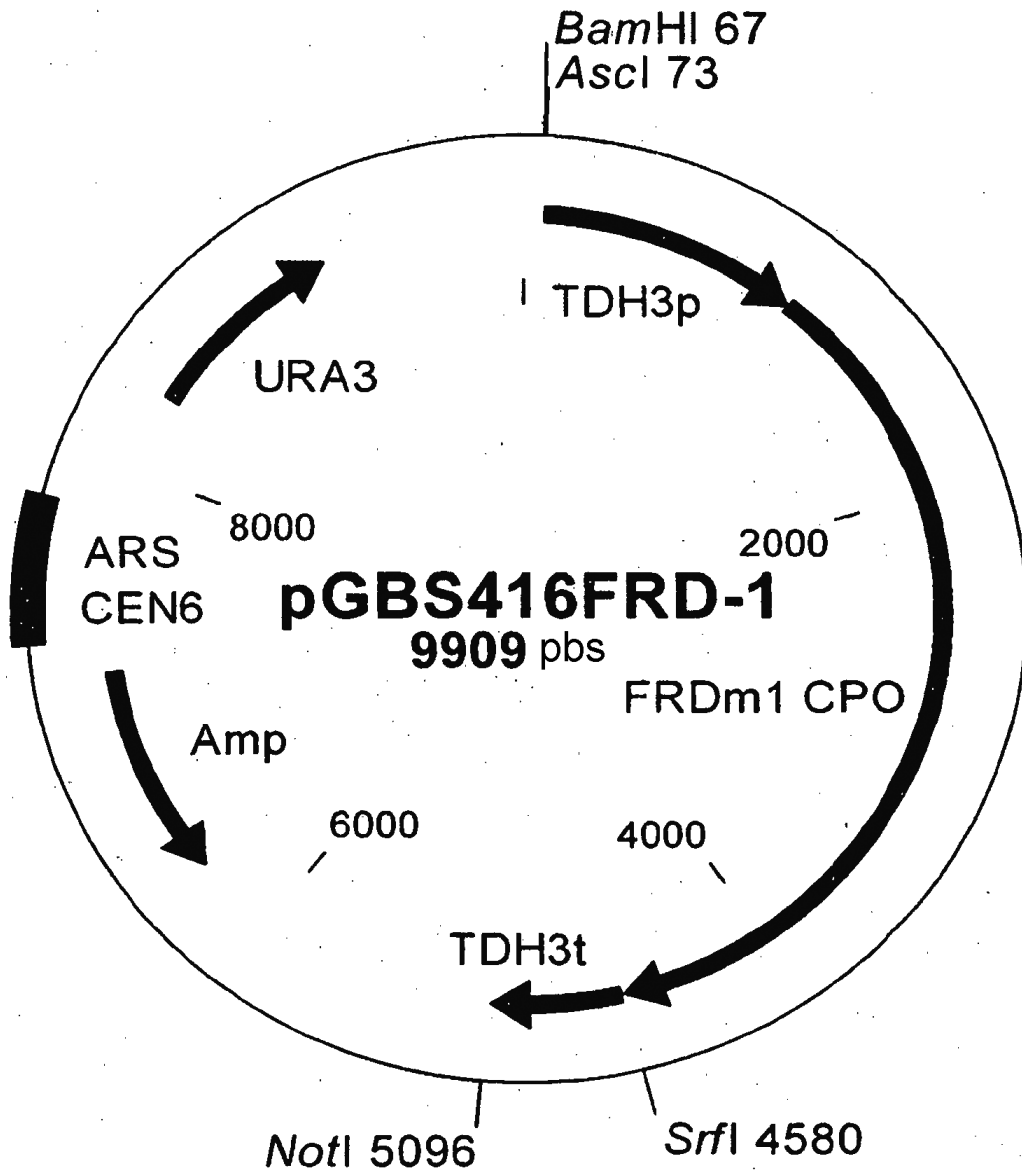


Figura 7

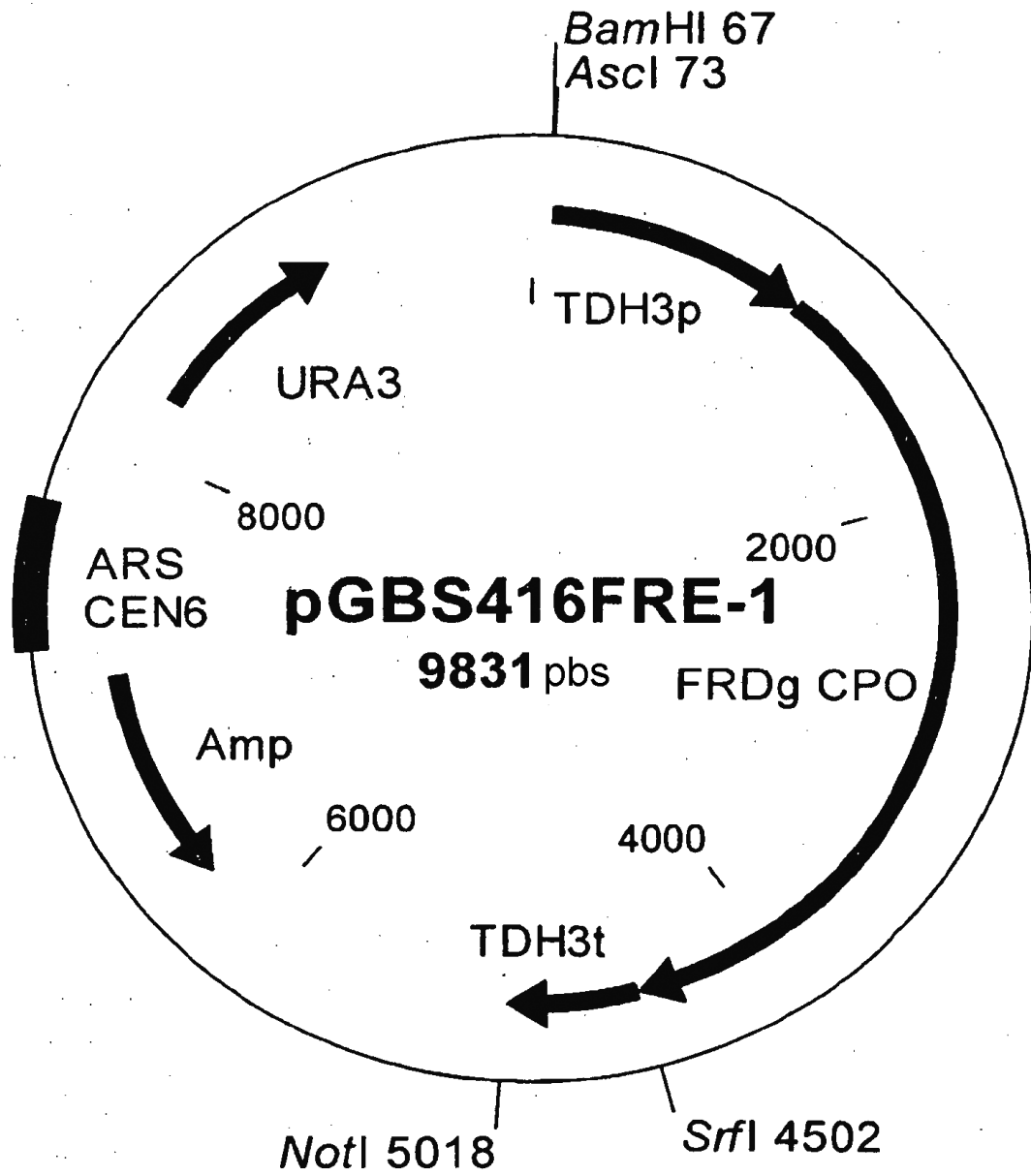


Figura 8

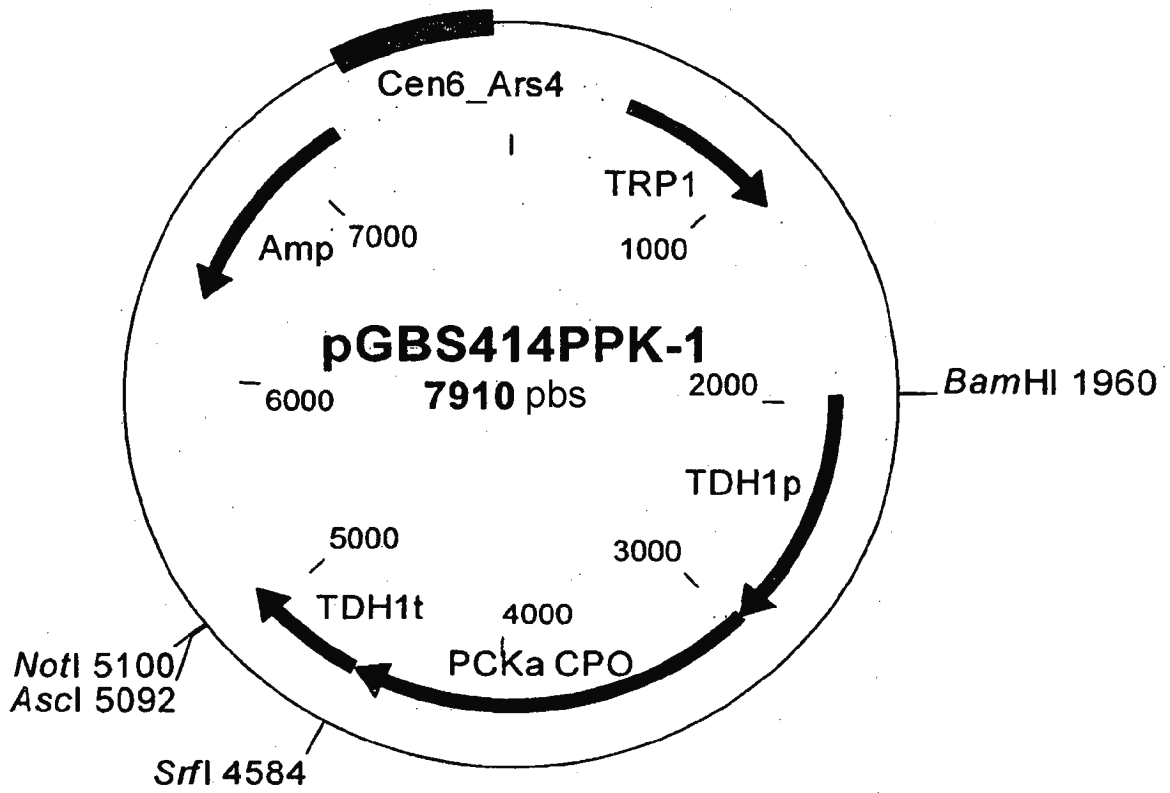


Figura 9

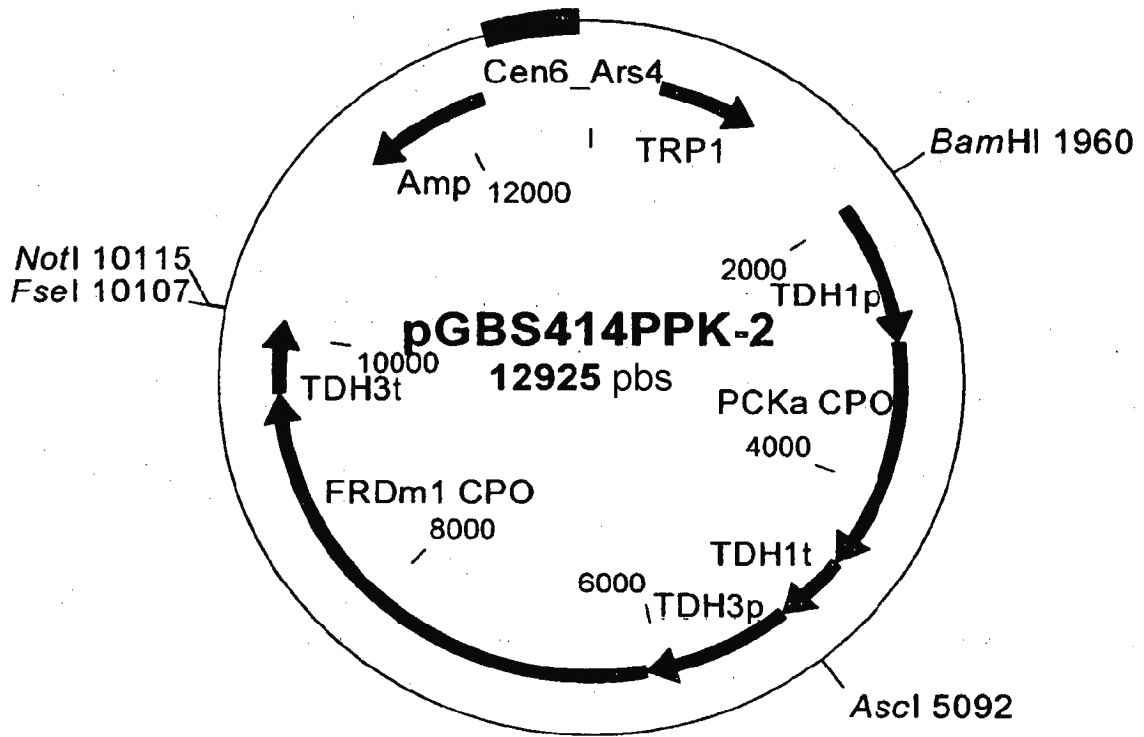


Figura 10

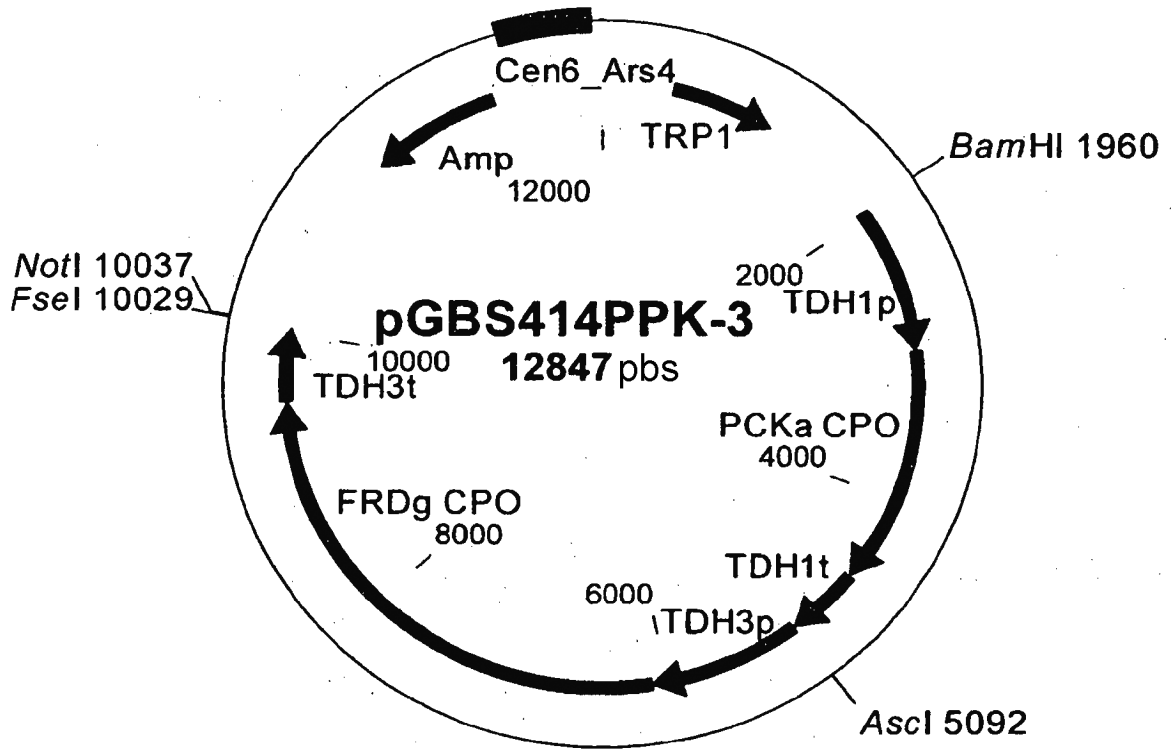


Figura 11

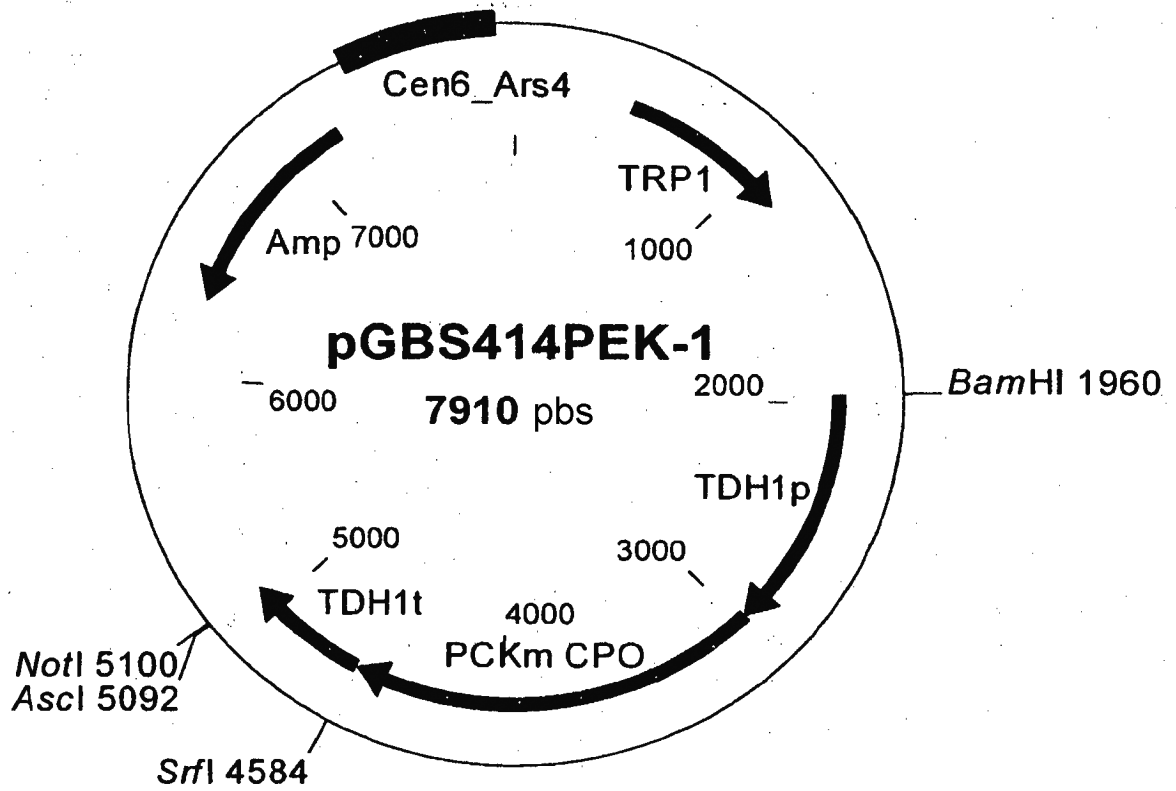


Figura 12



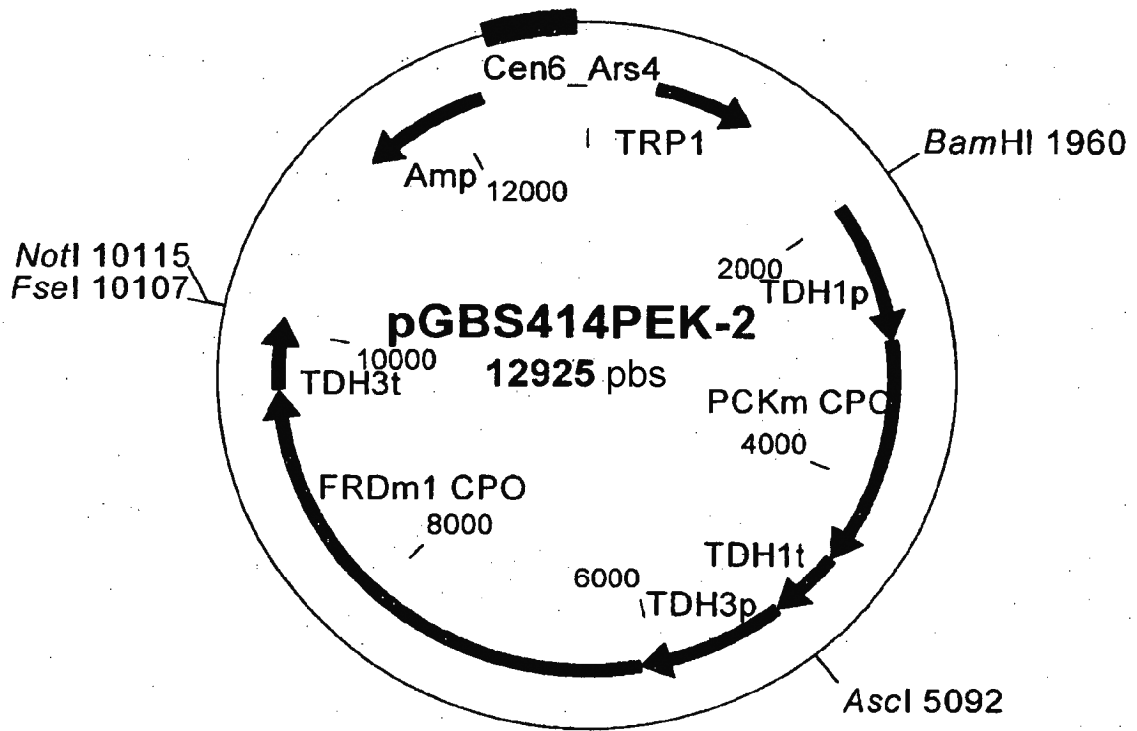


Figura 13

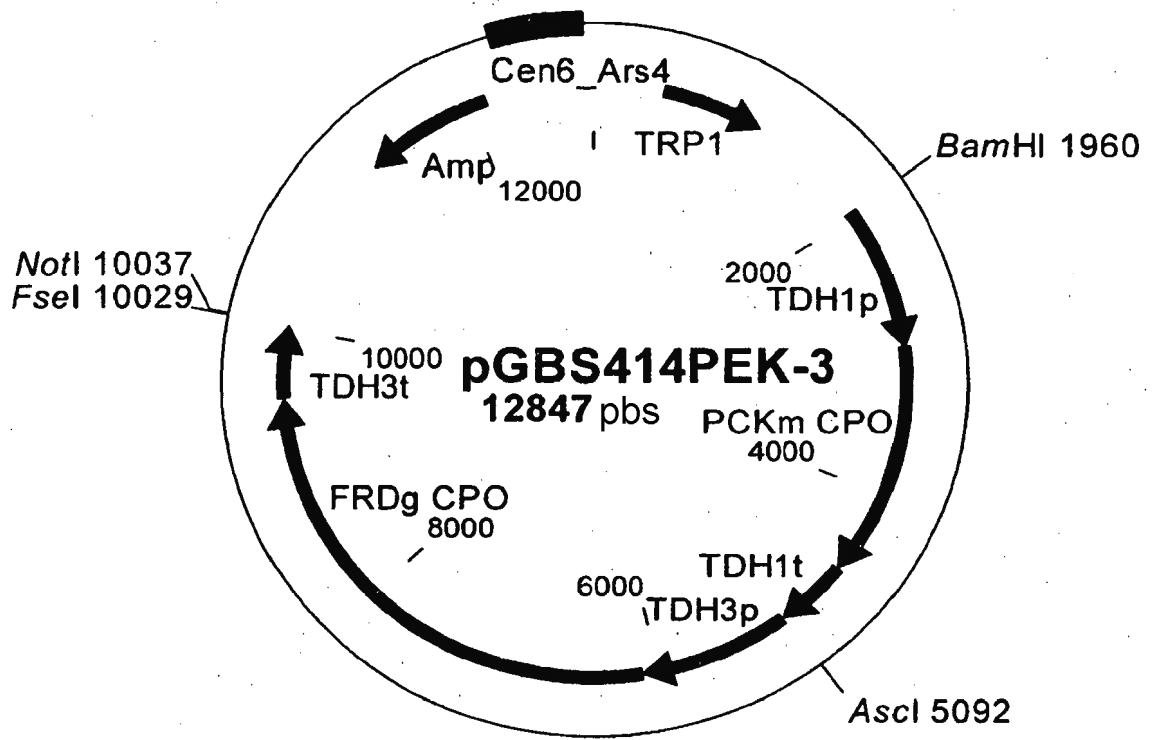


Figura 14

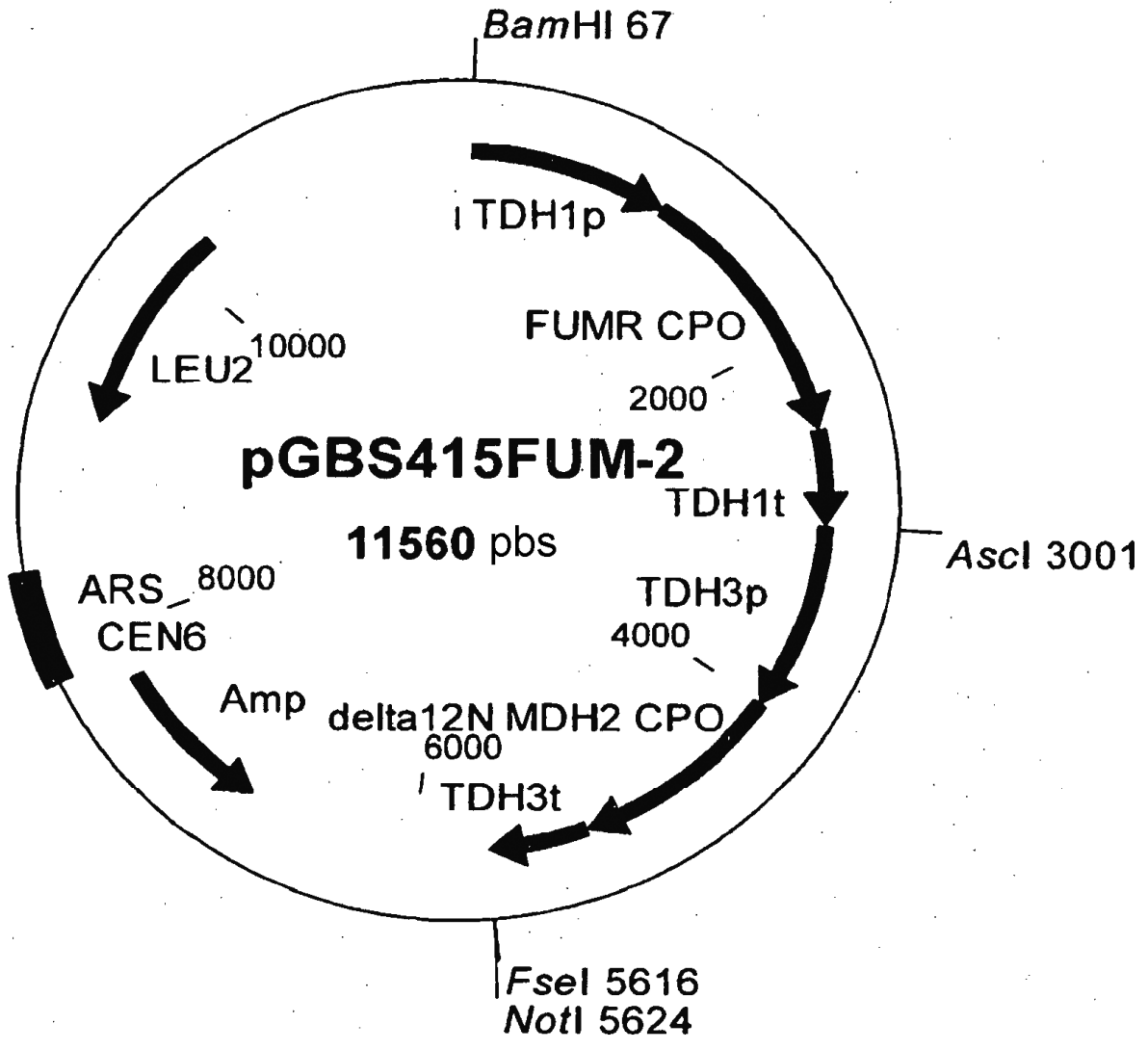


Figura 15

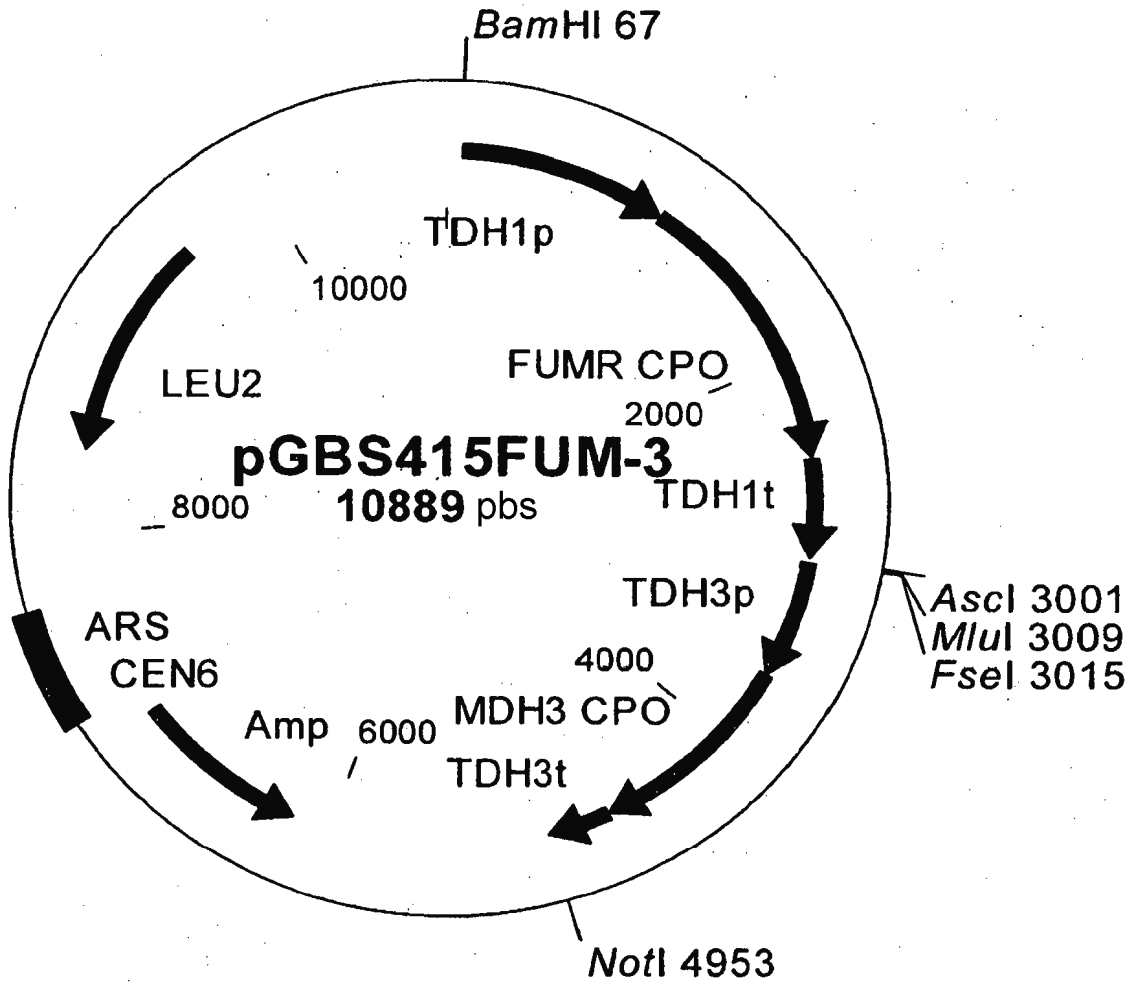


Figura 16

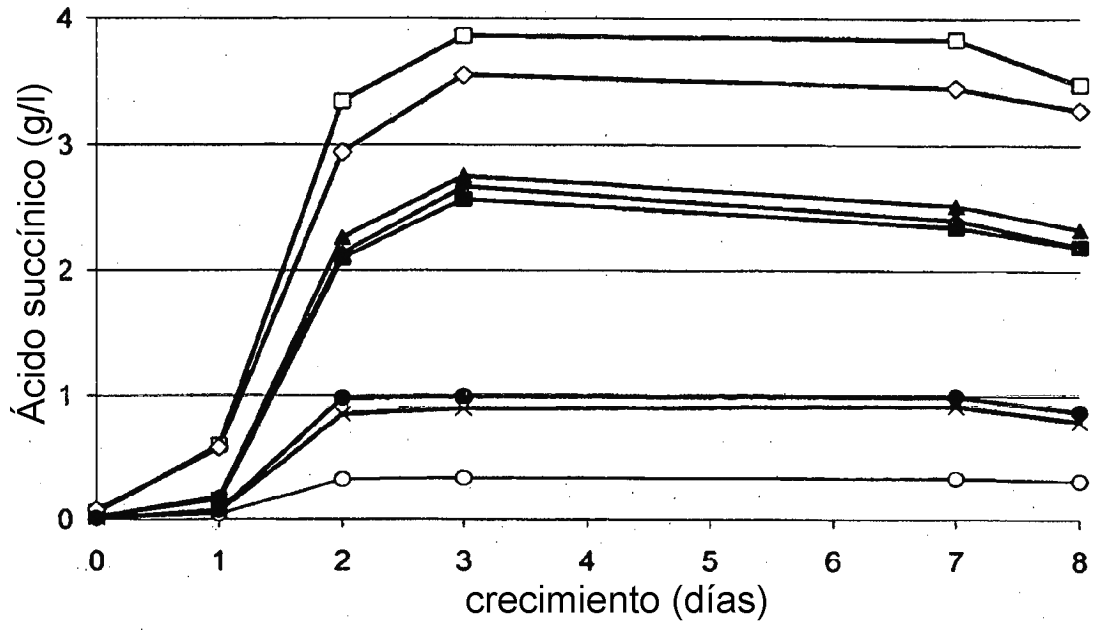


Figura 17

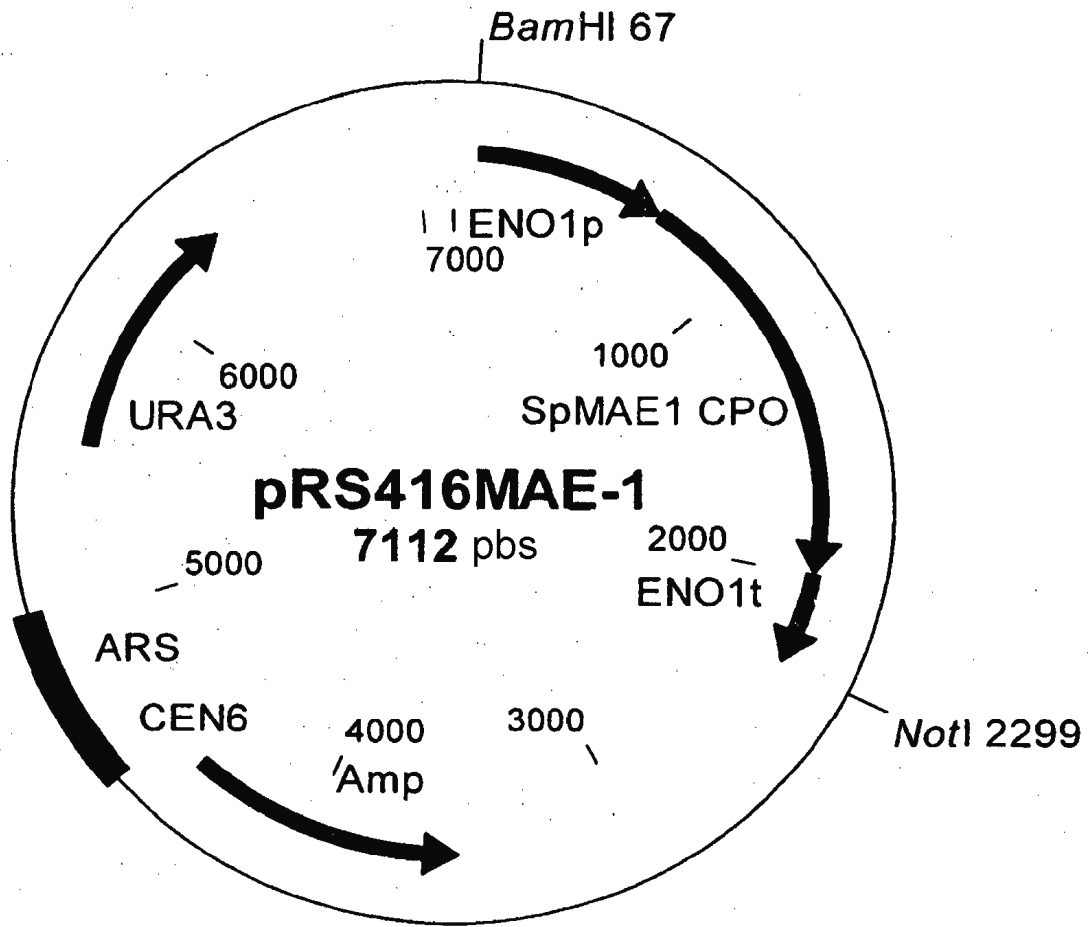


Figura 18

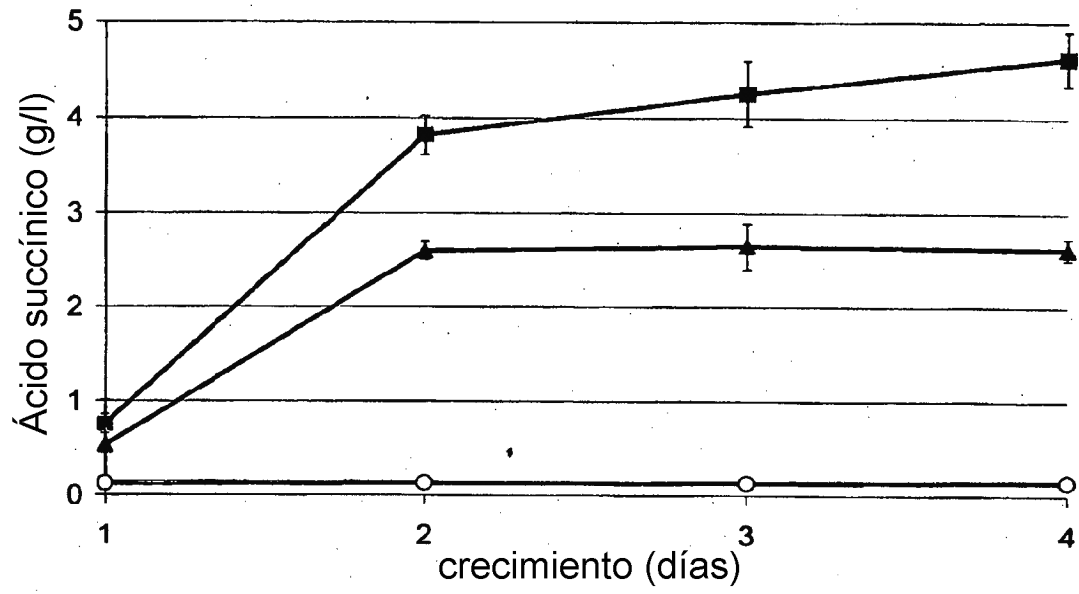


Figura 19

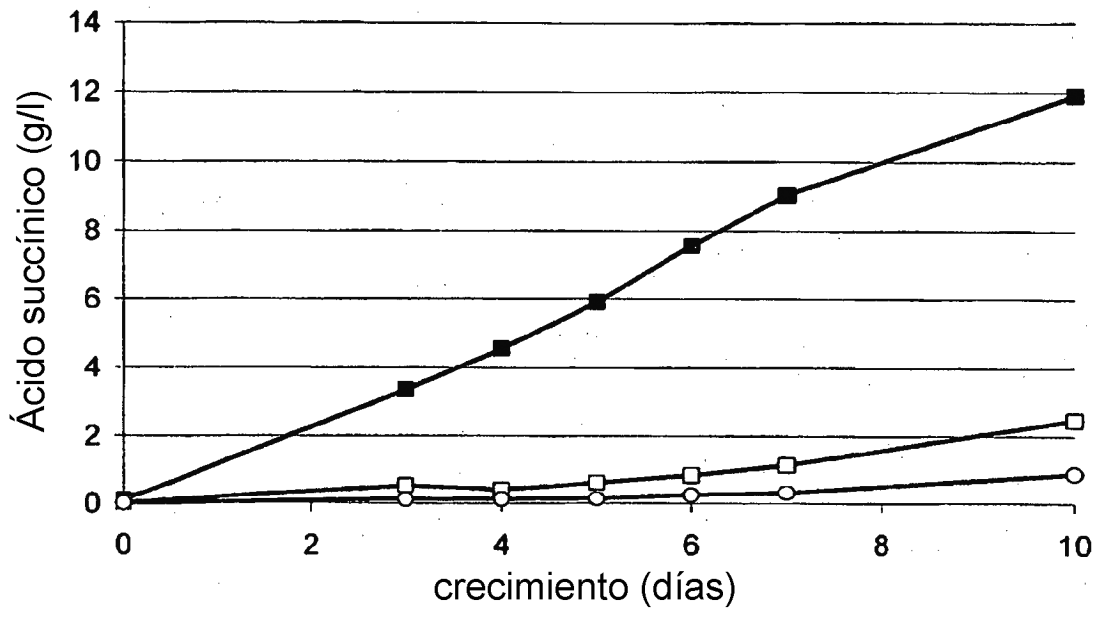


Figura 20



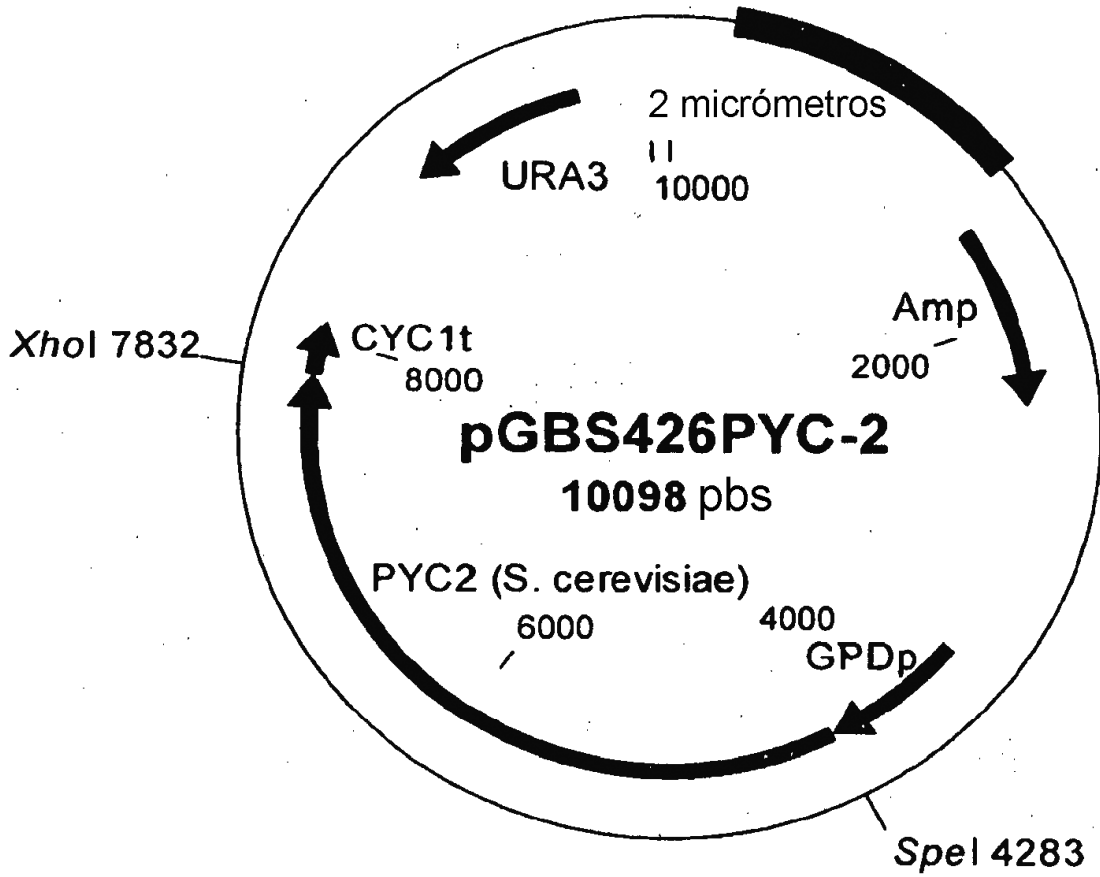


Figura 21

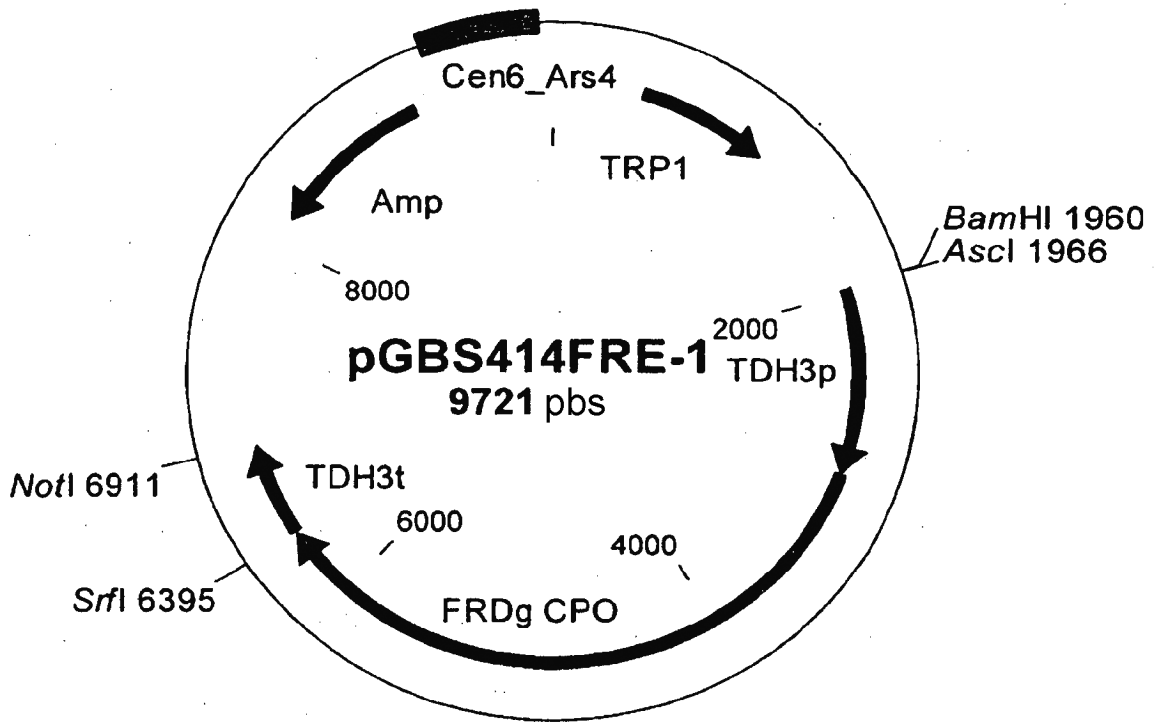


Figura 22

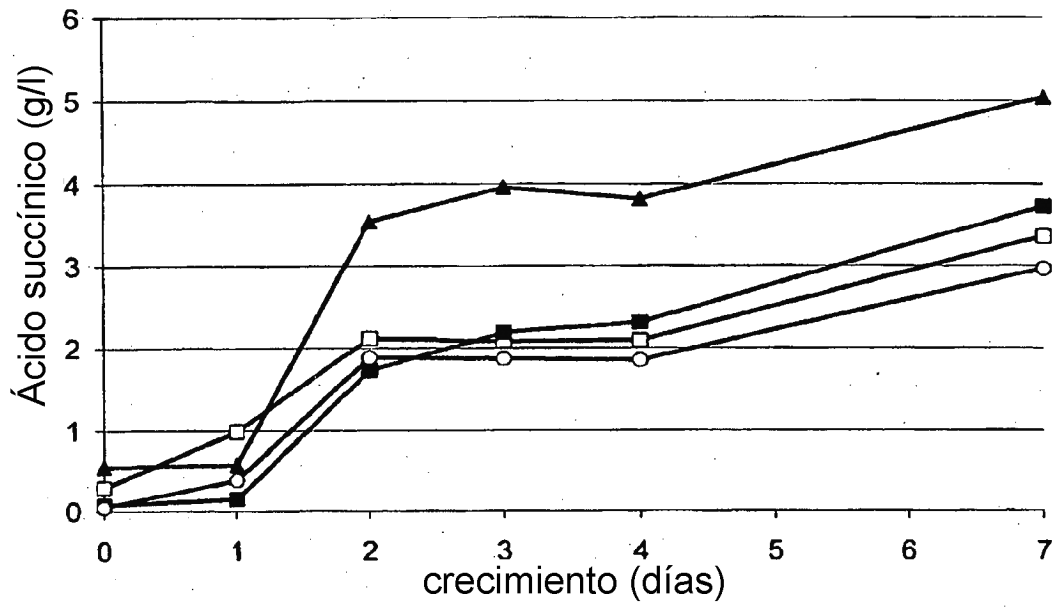


Figura 23