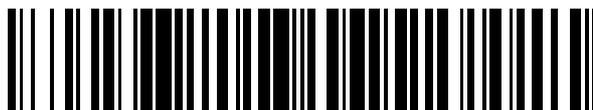


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 430**

51 Int. Cl.:

C12N 15/53 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

C12N 1/16 (2006.01)

C12P 7/22 (2006.01)

C12P 7/24 (2006.01)

C12P 7/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2007 E 07731065 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015 EP 1989310**

54 Título: **Sistema de expresión en levadura para la producción de moléculas aromáticas**

30 Prioridad:

01.03.2006 FR 0601838

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

19.02.2016

73 Titular/es:

**V. MANE FILS (100.0%)
620, ROUTE DE GRASSE
06620 BAR SUR LOUP, FR**

72 Inventor/es:

**ZUCCA, JOSEPH;
LAMBERT, FANNY;
MANE, JEAN;
NESS, FRÉDÉREQUE y
AIGLE, MICHEL**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 560 430 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

Sistema de expresión en levadura para la producción de moléculas aromáticas

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a la producción de moléculas aromáticas naturales. Más particularmente, la invención se refiere a un nuevo sistema de expresión en levadura que utiliza una casete de expresión y que permite la producción de derivados fenólicos por bioconversión, siendo dichos derivados fenólicos utilizables para la producción de moléculas aromáticas naturales empleados en aromática alimentaria o en perfumería (aromas o fragancias).

Estado de la técnica

15 La producción de moléculas aromáticas naturales puede obtenerse por vía biológica o por síntesis química. Por ejemplo, la vanillina puede obtenerse por una u otra de estas dos vías.

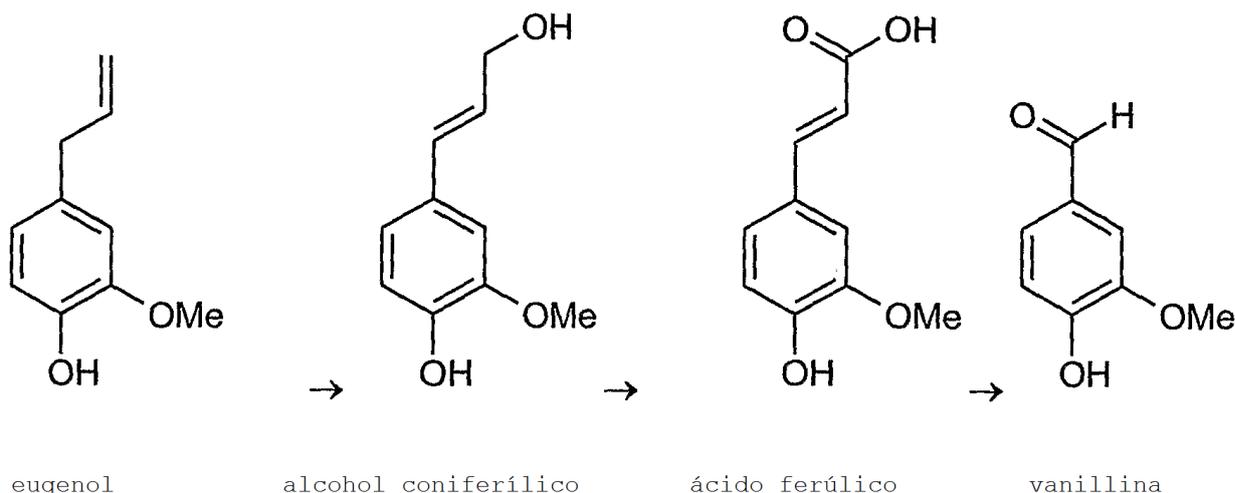
La vanillina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído) es el componente principal responsable de las propiedades olfativas y gustativas del extracto de vainilla derivado de vainas de *Vanillia planifolia*. Se trata de una de las moléculas aromáticas más utilizadas en la industria. Sin embargo, la producción de vanillina natural a partir de vaina de vainilla o de extracto de vainilla solamente cubre el 20 % de este mercado; su utilización está limitada debido, por un lado, al potencial de vainas disponibles a nivel mundial y, por otro lado, debido al elevado precio, muy fluctuante, de estas vainas (del orden de 30 €/kg a 450 €/kg es decir, como mínimo, 1500 €/kg de potencial en vanillina natural).

25 La vanillina de síntesis se utiliza, por lo tanto, frecuentemente como un sustituyente económico (aproximadamente 15 €/kg) de la vanillina natural. Sin embargo, si la vanillina de síntesis conviene a aplicaciones en perfumería y en cosmética, puede plantear dificultades de orden reglamentario en las industrias agroalimentarias. Además, los aromas de síntesis son, generalmente, menos apreciados por los consumidores que los aromas naturales.

30 Es por esto que se busca obtener moléculas aromáticas naturales, en particular vanillina, mediante procedimientos biológicos, concretamente de bioconversión, que emplean microorganismos (bacterias, levaduras, mohos), células vegetales o sus sistemas enzimáticos.

35 En el sentido de la presente invención, se entiende por bioconversión la transformación biológica de un sustrato, preferentemente procedente de una fuente natural, para obtener aromas, fragancias o precursores de aromas o de fragancias naturales.

La vanillina puede producirse siguiente el siguiente esquema de reacción:



40 Cada una de las moléculas mencionadas puede permitir el acceso a la vanillina por poco disponibles que estén, sabiendo que las más importantes son el ácido ferúlico y el eugenol.

45 Por ejemplo, las solicitudes EP 453 368, PCT WO/96/08576 y PCT WO/00/61721 describen procedimientos que permiten la producción de vanillina natural por bioconversión a partir de ácido ferúlico en presencia de hongos filamentosos. El ácido ferúlico utilizado en estos procedimientos proviene de la extracción de co-productos agrícolas que contienen ésteres de ácido ferúlico: maíz, arroz, remolacha o trigo. Pero la baja concentración de ácido ferúlico

de estos co-productos y las múltiples etapas necesarias para su extracción-purificación hacen que el rendimiento de extracción a partir de estos ésteres siga siendo bastante bajo; lo que induce un precio elevado para esta materia prima y, por lo tanto, un precio de coste elevado para la vanillina que se deriva de ella.

- 5 Para que un procedimiento biológico que emplea microorganismos pueda ser rentable, es preferible, por lo tanto, utilizar un sustrato más disponible y económico.

Éste es el caso del eugenol que puede ser fuente de alcohol coniferílico o de ácido ferúlico.

- 10 El artículo publicado por J. Overhage et al., describe que la expresión del gen de la vanillil alcohol oxidasa procedente de *Penicillium simplicissimum* en *Escherichia coli* permite catalizar la conversión del eugenol en alcohol coniferílico. Para convertir el alcohol coniferílico en ácido ferúlico, J. Overhage et al, expresan a continuación otras dos enzimas procedentes de *Penicillium simplicissimum* en *Escherichia coli*: la coniferil alcohol deshidrogenasa y la coniferil aldehído deshidrogenasa (Highly efficient biotransformation of eugenol to ferulic acid and further conversion to vanillin in recombinant strains of *Escherichia coli*, 2003, Applied and Environmental microbiology p 6569-6576). Si bien este procedimiento utiliza un sustrato disponible y poco costoso, el eugenol, este sistema de producción de ácido ferúlico en *E. coli* sigue siendo, sin embargo, difícil de implementar debido a la triple clonación necesaria para convertir eugenol en ácido ferúlico.

20 Objeto de la invención

La presente invención tiene, por lo tanto, por objeto un procedimiento de producción de precursores de vanillina natural o de la propia vanillina natural, a un coste de producción menor que el de la técnica anterior, y con un procedimiento sencillo de implementar a nivel industrial.

- 25 Las soluciones propuestas por la invención son utilizar o producir sustratos naturales disponibles, de bajo coste como eugenol y ácido ferúlico. Este último que es el sustrato más utilizado para la síntesis de vanillina, es a menudo de un precio elevado y de una calidad difícil de controlar.

- 30 Otro objeto de la invención es, por lo tanto, un procedimiento sencillo y eficaz de producción de ácido ferúlico natural y/o de alcohol coniferílico natural, de un precio industrialmente aceptable. Si el ácido ferúlico puede utilizarse como precursor de vanillina natural, el alcohol coniferílico puede ser fuente de alcohol deshidroconiferílico que se encuentra en perfumes raros como el de flores de tiaré y puede, por oxidación, ser fuente de ácido ferúlico.

- 35 El medio esencial de los procedimientos de acuerdo con la invención es una levadura transformada mediante el gen que codifica vanillil alcohol oxidasa, del tipo del gen de vanillil alcohol oxidasa (SEC. ID. N.º 1) procedente de *Penicillium Simplicissimum* (referencia Genbank Y15627), o cualquier secuencia nucleotídica que tenga al menos el 70 %, preferentemente el 80 %, muy preferentemente 90 %, de identidad con la secuencia de SEC. ID. N.º 1.

- 40 De este modo, un objeto de la invención es proponer la bioconversión de sustratos de bajo coste, en una levadura que comprende al menos un gen que codifica vanillil alcohol oxidasa.

La bioconversión de eugenol por la levadura de la invención permite, por un lado, la producción de ácido ferúlico y/o de alcohol coniferílico naturales, sin impureza y de precio bajo y, por otro lado, la producción de vanillina natural.

- 45 De acuerdo con una realización de la invención, la levadura comprende al menos un sistema de expresión que contiene el gen que codifica vanillil alcohol oxidasa. Ventajosamente, dicho sistema de expresión comprende:

- 50 (1) medios destinados a la integración de dicho sistema en el genoma de dicha célula, que comprenden dos secuencias nucleotídicas,
 (2) medios destinados a la selección de dicha célula que tiene integrado dicho sistema, que comprenden un inserto de selección que comprende dos secuencias LoxP que enmarca un promotor, un marcador de selección del tipo gen de resistencia a los antibióticos y un terminador,
 55 (3) una casete de expresión del gen que codifica vanillil alcohol oxidasa, que comprende un promotor que permite la expresión de dicho gen, al menos un sitio de clonación que permite la integración de dicho gen, y un terminador.

Se entiende por "casete de expresión" una secuencia nucleotídica que comprende un promotor, un sitio de inserción para la clonación del gen de interés o un sitio de clonación múltiple (MCS por Multiple Cloning Site) y un terminador.

- 60 Se entiende por "promotor" una secuencia de ADN necesaria para el inicio y para el control de la transcripción, por "sitio de inserción para la clonación" o "sitio de clonación múltiple" una secuencia de ADN que contiene uno o varios sitios de restricción, y por "terminador" una secuencia de ADN necesaria para la terminación de la transcripción. Se entiende por "vector" cualquier secuencia de ADN en la que es posible insertar fragmentos de ácido nucleico extraño, los vectores permiten introducir ADN extraño en una célula huésped. Son ejemplos de vectores los plásmidos, los cósmidos, los cromosomas artificiales de levaduras (YAC), los cromosomas artificiales de bacterias (BAC) y los cromosomas artificiales derivados del bacteriófago P1 (PAC), los vectores derivados de virus. Se

entiende por “marcador de selección” un gen cuya expresión otorga a las células que lo contienen una característica que permite seleccionarlas. Se trata, por ejemplo, de un gen de resistencia a los antibióticos.

5 De acuerdo con una realización preferida de la invención, el sitio de clonación comprende los sitios de restricción de enzimas de restricción, NotI, BamHI, MfeI, XhoI, que permiten la inserción de la secuencia nucleotídica de vanillil alcohol oxidasa en la casete de expresión. Ventajosamente, este sitio de clonación tiene como secuencia la secuencia SEC. ID. N.º 2 o cualquier secuencia idéntica en al menos el 70 %, preferentemente el 80 %, muy preferentemente el 90 %, a la secuencia SEC. ID. N.º 2.

10 De acuerdo con una realización preferida de la invención, el enmarcado del marcador de selección por dos sitios LoxP permitirá la escisión de este marcador de selección gracias al sistema CRE/Lox. La enzima CRE es una recombinasa que reconoce específicamente los sitios LoxP. La secuencia nucleotídica comprendida entre estos dos sitios se califica como ADN diana y será eliminada en presencia de la enzima CRE. En efecto, cuando la enzima CRE se une a los sitios LoxP, corta estos sitios en dos y vuelve a pegar entre sí dos mitades después de que el ADN
15 diana ha sido eliminado. Ventajosamente, las secuencias LoxP tienen como secuencia la secuencia SEC. ID. N.º 3 o cualquier secuencia idéntica en al menos el 70 %, preferentemente el 80 %, muy preferentemente el 90 %, a la secuencia SEC. ID. N.º 3.

20 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, las secuencias que permiten la integración del sistema de expresión en el genoma de dicha levadura son múltiples y se seleccionan entre el grupo que comprende las secuencias TY, las secuencias teloméricas X e Y', las secuencias DUP, la secuencia □ o cualesquiera secuencias repetidas en el genoma de la levadura.

25 Ventajosamente, dichas secuencias son las secuencias TY1A y TY1B de *Saccharomyces cerevisiae*, y tienen preferentemente como secuencia las secuencias SEC. ID. N.º 4 y SEC. ID. N.º 5 respectivamente o cualesquiera secuencias que son idénticas a éstas en al menos el 70 %, preferentemente el 80 %, muy preferentemente el 90 %.

30 De acuerdo con otra realización preferida de la invención, los promotores utilizados en el sistema de expresión son promotores fuertes, es decir promotores que inducen una fuerte transcripción de los genes bajo su control. Son ejemplos de promotores fuertes 1) promotores que rigen la expresión de genes cuyas proteínas son abundantes en la levadura como los promotores que rigen la expresión de proteínas de la glucólisis o del metabolismo del nitrógeno; 2) promotores cuya expresión es específica, por ejemplo promotores cuya actividad está regulada por la presencia de azúcar o de nitrógeno; 3) promotores cuya actividad es importante en vista de los experimentos de transcriptoma; o 4) promotores artificiales diseñados para permitir una fuerte transcripción de los genes que regulan.
35 Los terminadores utilizados en el sistema de expresión se seleccionan por su capacidad para permitir una buena estabilidad de los ARNm. Ventajosamente, el terminador seleccionado corresponde al promotor fuerte seleccionado anteriormente.

40 Ventajosamente, el promotor que permite la expresión del gen de interés en el sistema de expresión es el promotor del gen TDH3 de *Saccharomyces cerevisiae*, y tiene preferentemente como secuencia la secuencia SEC. ID. N.º 6 o cualquier secuencia idéntica en al menos el 70 %, preferentemente el 80 %, muy preferentemente el 90 %, a la secuencia SEC. ID. N.º 6. Ventajosamente, el terminador asociado es el terminador del gen CYC1 de *Saccharomyces cerevisiae*, y tiene preferentemente como secuencia la secuencia SEC. ID. N.º 7 o cualquier secuencia idéntica en al menos el 70 %, preferentemente el 80 %, muy preferentemente el 90 %, a la secuencia SEC. ID. N.º 7. Ventajosamente, el promotor y el terminador que permiten la expresión del marcador de selección son el promotor y el terminador del gen TEF1 de *Ashbya gossypii*, y tienen preferentemente como secuencia la secuencia SEC. ID. N.º 8 y SEC. ID. N.º 9 respectivamente o cualesquiera secuencias que son idénticas a éstas en al menos el 70 %, preferentemente el 80 %, muy preferentemente el 90 %.

50 De acuerdo con otra realización preferida de la invención, el marcador de selección utilizado en el sistema de expresión es un gen de resistencia a los antibióticos seleccionado entre el grupo que comprende los genes de resistencia a geneticina, nourseotricina, fleomicina, zeocina o cualquier otro gen de resistencia a un antibiótico dominante para el que la levadura silvestre es sensible.

55 Ventajosamente, el marcador de selección utilizado en el sistema de expresión es el gen de resistencia a geneticina, y tiene preferentemente como secuencia la secuencia SEC. ID. N.º 10 o cualquier secuencia idéntica en al menos el 70 %, preferentemente el 80 %, muy preferentemente el 90 %, a la secuencia SEC. ID. N.º 10.

60 De acuerdo con otra realización preferida de la invención, el sistema de expresión que contiene el gen de la vanillil alcohol oxidasa tiene como secuencia la secuencia nucleotídica de SEC. ID. N.º 11 o cualquier secuencia idéntica en al menos el 70 %, preferentemente el 80 %, muy preferentemente el 90 %, a la secuencia SEC. ID. N.º 11.

65 La presente invención tiene también por objeto un vector que comprende un sistema de expresión tal como se ha definido anteriormente.

De acuerdo con otra realización preferida de la invención, el vector que comprende el sistema de expresión es un

plásmido, y ventajosamente pUC57.

La presente solicitud describe también bacterias transformadas, que comprenden al menos un vector tal como se ha definido anteriormente.

5 Estas bacterias transformadas pueden pertenecer a cualquier especie que permita la replicación del vector portador seleccionado. Ventajosamente, se trata de bacterias del género *E. coli*.

La presente solicitud describe también un vector de escisión del gen de resistencia a los antibióticos, comprendiendo dicho vector de escisión:

10 (1) medios destinados a la selección de las células que lo contienen, que comprenden el promotor y el terminador del gen TEF1 de *Ashbya gossypii* y el gen de resistencia a nourseotricina, y

(2) medios destinados a la escisión del marcador de selección presente en el sistema de expresión, que comprenden el promotor del gen GAL1 de *Saccharomyces cerevisiae*, el gen CRE y el terminador del gen CYC1 de *Saccharomyces cerevisiae*.

15 Ventajosamente, el vector de escisión comprende la secuencia SEC. ID. N.º 12 o cualquier secuencia idéntica en al menos el 70 %, preferentemente el 80 %, muy preferentemente el 90 %, a la secuencia SEC. ID. N.º 12.

20 De acuerdo con una realización preferida de la invención, el vector de escisión descrito anteriormente se selecciona entre los vectores que son mal segregados durante las divisiones celulares, que causan debido a esta característica una pérdida del vector en ausencia de presión de selección frecuente, por ejemplo vectores replicativos de tipo multicopia.

25 Ventajosamente, el vector de escisión es el plásmido pFL44s.

Este vector de escisión tiene como primera ventaja permitir la eliminación del gen de resistencia a los antibióticos presente en el genoma de las levaduras después de su transformación con el sistema de expresión. Las levaduras que permiten la producción de moléculas aromáticas de acuerdo con la invención no contienen, por lo tanto, ADN no originario de cepas que pertenecen al mismo género o a la misma familia, a excepción del gen que codifica vanillil alcohol oxidasa.

30 Además, la eliminación del gen de resistencia por el vector de escisión permite también transformar varias veces una levadura, para aumentar el número de copias del sistema de expresión presentes en el genoma y aumentar, de este modo, la cantidad de proteína vanillil alcohol oxidasa producida.

35 La invención tiene por objeto levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* que comprenden el sistema de expresión que contiene vanillil alcohol oxidasa, teniendo dicho sistema de expresión como secuencia la secuencia SEC. ID. N.º 11 o cualquier secuencia idéntica en al menos el 70 %, preferentemente el 80 %, muy preferentemente el 90 %, a la secuencia SEC. ID. N.º 11.

40 La invención también tiene por objeto levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* tales como las descritas anteriormente y/o transformadas con el vector de escisión tal como se ha descrito anteriormente.

45 De acuerdo con una realización preferida de la invención, las levaduras pertenecen a la especie *Saccharomyces cerevisiae* capaz de realizar la bioconversión de los precursores de vanillina (concretamente eugenol, ácido ferúlico, alcohol coniferílico) en vanillina de acuerdo con procedimientos conocidos por el experto en la materia.

50 Las levaduras pertenecen al género *Saccharomyces*. Muy preferentemente, las levaduras provienen de una cepa *cerevisiae*.

La presente invención tiene por objeto un procedimiento de producción de alcohol coniferílico y/o de ácido ferúlico naturales, que comprende las siguientes etapas:

- 55 a) clonación de la secuencia nucleotídica del gen que codifica vanillil alcohol oxidasa en el sistema de expresión,
 b) transformación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con el sistema de expresión obtenido de este modo,
 c) cultivo de la levadura en las condiciones que permiten la expresión de vanillil alcohol oxidasa,
 d) puesta en contacto de la levadura con eugenol.

60 De acuerdo con una realización preferida de la invención, la secuencia nucleotídica del gen que codifica vanillil alcohol oxidasa y el vector que comprende el sistema de expresión son, en un primer momento, digeridas por una o varias enzimas de restricción. La secuencia del gen que codifica vanillil alcohol oxidasa es insertada a continuación mediante simple ligamiento o cualquier otro medio de inserción en el sistema de expresión portado por el vector.

65 Para amplificar el sistema de expresión, se transforman bacterias de acuerdo con cualquier procedimiento conocido con el producto de ligamiento (vector que porta el sistema de expresión que contiene el gen de la vanillil alcohol oxidasa). Las bacterias que tienen integrado el sistema de expresión se seleccionan gracias al gen de resistencia a

los antibióticos presente en el vector que porta el sistema de expresión que contiene el gen que codifica vanillil alcohol oxidasa.

5 En un segundo momento, el vector que porta el sistema de expresión es digerido por una o varias enzimas de restricción, preferentemente PvuII, que cortan a uno y otro lado del sistema de expresión. El sistema de expresión es purificado a continuación y después transformado en las levaduras que pertenecen a la especie *Saccharomyces cerevisiae* de acuerdo con cualquier procedimiento conocido. Las levaduras que tienen integrado el sistema de expresión se seleccionan gracias al gen de resistencia presente en el sistema de expresión.

10 Finalmente, las levaduras transformadas se cultivan en las condiciones conocidas por el experto en la materia que permiten la expresión de vanillil alcohol oxidasa. Cuando se añade eugenol al cultivo, la vanillil alcohol oxidasa permite catalizar su bioconversión en alcohol coniferílico y/o en ácido ferúlico.

15 La invención también tiene por objeto un procedimiento de producción de alcohol coniferílico y/o de ácido ferúlico naturales, en el que el marcador de selección presente en el genoma de la levadura ha sido escindido, comprendiendo dicho procedimiento, después de la etapa b) y antes de las etapas c) y d), las etapas b1), b2) y b3) siguientes:

- 20 b1) transformación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con el vector de escisión,
- b2) cultivo de la levadura en las condiciones que permiten la expresión de la enzima CRE,
- b3) aislamiento de las levaduras que han perdido el marcador de selección.

25 De acuerdo con una realización preferida de la invención, la secuencia nucleotídica del gen que codifica vanillil alcohol oxidasa se inserta en el sistema de expresión, y las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* se transforman, en un primer momento, con este sistema de expresión como se ha descrito anteriormente. Las levaduras que tienen integrado el sistema de expresión son seleccionables gracias a la presencia de un primer marcador de selección, preferentemente un gen de resistencia a los antibióticos. Las levaduras seleccionadas positivamente se transforman a continuación con el vector de escisión de acuerdo con cualquier procedimiento conocido. Las levaduras que tienen integrado el vector de escisión se seleccionan gracias al gen de resistencia a nourseotricina presente en el vector de escisión.

35 Las levaduras, que tienen, por lo tanto, integrado el sistema de expresión y el vector de escisión, son cultivadas entonces en las condiciones que permiten la expresión de la enzima CRE. La enzima CRE activa permitirá escindir el primer marcador de selección enmarcado por las secuencias loxP en el sistema de expresión. Las levaduras que hayan perdido este marcador de selección se seleccionan a continuación. Por ejemplo, las levaduras que hayan perdido este primer gen de resistencia a un antibiótico se seleccionan gracias a su ausencia de resistencia a este antibiótico.

40 Las levaduras obtenidas después de esta etapa de selección ya no poseen el marcador de selección presente en el sistema de expresión, pero siguen poseyendo el gen de resistencia a nourseotricina presente en el vector de escisión. Tal como se ha descrito anteriormente, el vector de escisión se selecciona entre los vectores que son mal segregados durante las divisiones celulares. Debido a esta característica, el vector de escisión se pierde fácilmente en ausencia de presión de selección frecuente. Se entiende por presión de selección cualquier procedimiento que contribuya a seleccionar las células. Por ejemplo, mantener en cultivo levaduras que poseen un gen de resistencia a un antibiótico en presencia de este antibiótico corresponde a un procedimiento de presión de selección. Las levaduras obtenidas en la etapa anterior son, por lo tanto, cultivadas en ausencia de presión de selección para perder el vector de escisión, y a continuación se seleccionan para la pérdida del gen de resistencia a nourseotricina.

50 Las levaduras obtenidas de este modo tienen integrado en su genoma el sistema de expresión que permite la expresión de vanillil alcohol oxidasa, mientras que su genoma ya no contiene genes de resistencia a los antibióticos. Las levaduras transformadas se cultivan a continuación en las condiciones conocidas por el experto en la materia que permiten la expresión de vanillil alcohol oxidasa. Cuando el eugenol se añade al cultivo, la vanillil alcohol oxidasa permite catalizar su bioconversión en alcohol coniferílico y/o en ácido ferúlico.

55 Finalmente, la invención también tiene por objeto un procedimiento de producción de alcohol coniferílico y/o de ácido ferúlico naturales en el que las etapas b), b1), b2) y b3) se repiten tantas veces como copias del sistema de expresión se deseen, con el fin de aumentar el número de copias del sistema de expresión en el genoma de la levadura. De acuerdo con una realización preferida de la invención, las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* se transforman, en un primer momento, con el sistema de expresión y a continuación se seleccionan como se ha descrito anteriormente. Estas levaduras se transforman a continuación con el vector de escisión, para permitir la eliminación del marcador de selección como se ha descrito anteriormente. Las levaduras obtenidas de este modo ya no poseen marcador de selección en su genoma y tienen integrada al menos una copia del sistema de expresión.

65 En un segundo momento, para aumentar el número de copias del sistema de expresión, estas levaduras se transforman de nuevo con el sistema de expresión. El mismo procedimiento de selección, de transformación con el vector de escisión y de selección final se realiza como anteriormente. Las levaduras obtenidas de este modo ya no

poseen marcadores de selección y tienen integradas en su genoma al menos dos copias del sistema de expresión. Este procedimiento puede repetirse tantas veces como se desee.

5 La presente invención tiene por objeto un procedimiento de producción de vanillina que comprende las etapas a), b), c) y d) tal como se han descrito anteriormente y una etapa posterior de conversión del ácido ferúlico y/o del alcohol coniferílico, producidos en la etapa d), en vanillina.

10 De acuerdo con una realización preferida de la invención, la *Saccharomyces cerevisiae*, debido a su propio material genético, es capaz de convertir el ácido ferúlico producido en la etapa d) en vanillina.

De acuerdo con otra realización preferida de la invención, la etapa de conversión del ácido ferúlico y/o del alcohol coniferílico en vanillina se realiza por vía enzimática o vía bioquímica de acuerdo con los procedimientos descritos en las patentes EP 0 606 441 y EP 0 804 606.

15 La presente invención se entenderá mejor con ayuda del complemento de descripción a continuación, que se refiere a ejemplos de obtención del sistema de expresión que comprende vanillil alcohol oxidasa, de vectores que contienen este sistema de expresión, de vectores de escisión, y de su utilización para la producción, por bioconversión de eugenol, de alcohol coniferílico y de ácido ferúlico.

20 Descripción de las figuras

En los ejemplos siguientes, dados a título ilustrativo, se hará referencia a las figuras adjuntas, en las que:

- 25 - la figura 1 presenta un esquema del sistema de expresión,
- la figura 2 presenta la expresión de vanillil alcohol oxidasa por las levaduras,
- la figura 3 presenta el procedimiento de obtención del vector de escisión pFL44s-NAT1-CRE.

Descripción detallada de la invención

30 **Ejemplo 1: Expresión de vanillil alcohol oxidasa en la levadura por transformación de la levadura con el sistema de expresión.**

1/ Síntesis del sistema de expresión.

35 El sistema de expresión comprende la secuencia nucleotídica de 2715 pb descrita en SEC. ID. N.º 13. Esta secuencia nucleotídica se ha construido a partir de una secuencia sintética (SEC. ID. N.º 14) y de un inserto de selección (SEC. ID. N.º 15).

La secuencia sintética posee un tamaño de 1225 pb y ha sido sintetizada por GenScript Corporation. Esta secuencia comprende:

- 40 - la secuencia TY1A
- una secuencia LoxP
- la secuencia del promotor del gen TDH3
- una secuencia de sitios de clonación múltiple
- 45 - la secuencia del terminador del gen CYC1
- la secuencia TY1B

50 El inserto de selección se aisló a partir del vector pUG6 clonado en *E. coli* (Güldener, U., Heck, S., Fiedler, T., BeinHauer, J., y Hegemann, J.H. 1996. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. Nucleic Acids Res. 24: 2519-2524). El inserto de selección consta de 1500 pb y comprende:

- una secuencia loxP
- la secuencia del promotor del gen TEF1
- la secuencia del gen kan^r
- 55 - la secuencia del terminador del gen TEF1

Este inserto se aisló mediante digestión del vector pUG6 con las enzimas de restricción Sall y SacI.

60 El sistema de expresión que comprende la secuencia sintética se clonó en el vector pUC57 (GenScript Corporation) gracias a los sitios de restricción de EcoRI y PstI.

El vector pUG6 y el vector pUC57 que contiene el sistema de expresión se digirieron mediante las enzimas de restricción Sall y SacI. El inserto de selección se inserta a continuación mediante simple ligamiento en la secuencia sintética entre TY1A y la secuencia LoxP situadas a uno y otro lado de los sitios de restricción Sall y SacI.

65 El vector obtenido de este modo que consta del sistema de expresión (secuencia sintética + inserto de selección) se

denomina pM2-KAN (**figura 1**)

Los sitios de restricción XbaI y SacI presentes en el inserto de selección permiten cambiar el marcador de selección y sus secuencias de expresión si el usuario lo desea.

Los sitios de restricción Sall y SpeI permiten eliminar o sustituir el conjunto de las secuencias constituido por el marcador de selección y sus secuencias de expresión enmarcadas por las dos secuencias LoxP.

2/ Inserción del gen que codifica vanillil alcohol oxidasa en el sistema de expresión.

La secuencia nucleotídica de la VAO se obtiene de *Penicillium simplicissium* (referencia Genbank Y15627). La secuencia de la VAO (SEC. ID. N.º 1) utilizada en este experimento se sintetizó con un sitio NotI en 5' y XhoI en 3' para permitir su clonación en el vector pivex, y esto en fase con una secuencia nucleotídica que permite producir una proteína con una etiqueta de seis histidinas en extremo C.

El vector pivex que contiene la secuencia de la VAO, tal como se ha descrito anteriormente, fue digerido por NotI y EcoRI para liberar la secuencia de la VAO-6His. Esta secuencia es clonada a continuación mediante simple ligamiento en el vector pUC57 que contiene el sistema de expresión digerido previamente por NotI y MfeI.

3/ Transformación de las levaduras con el sistema de expresión que comprende el gen que codifica vanillil alcohol oxidasa.

El vector pUC57 que contiene el sistema de expresión es digerido por la enzima de restricción PvuII. Esta enzima corta a uno y otro lado del sistema de expresión que contiene el gen de interés: el gen de la VAO. El fragmento de ADN procedente de esta digestión se purifica y se transforma en las levaduras de acuerdo con un método de choque térmico en presencia de PEG/acetato de litio.

Las levaduras transformadas, gracias a la presencia del gen de resistencia KANr portado por el sistema de expresión, se seleccionan en medio rico YPD (extracto de levadura al 1 %, peptona al 1 %, glucosa al 2 %) que contiene 300 mg/l de Geneticina. Se obtuvieron veinticuatro clones de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (cepa 92411) después de la transformación (clones 92411 KANVAO).

3/ Análisis de la expresión de vanillil alcohol oxidasa por las levaduras transformadas.

Las levaduras transformadas se cultivan en medio completo Glucosado (YPD). La proteína VAO (vanillil alcohol oxidasa) se purifica después por afinidad sobre resina Ni NTA como en el ejemplo 1. Las proteínas retenidas sobre la resina se analizan por electroforesis sobre gel de poliacrilamida (gel SDS-PAGE) y se detectan con azul de Coomassie. La figura 2 muestra para dos clones que la proteína VAO se produce (columnas E 92411 KANVAO). El clon 92411 T- corresponde al control negativo, es decir a una cepa 92411 no transformada, no produce de proteína VAO, mientras que BL21 I+F corresponde a un control positivo resultante de la clonación de la vanillil VAO en el vector pivex y de su producción en *E. coli*.

Ejemplo 2: Producción de alcohol coniferílico y de ácido ferúlico por bioconversión de eugenol en las levaduras que expresan vanillil alcohol oxidasa.

Las levaduras transformadas con el sistema de expresión que contiene vanillil alcohol oxidasa, tal como se han descrito anteriormente, se seleccionaron en primer lugar por su capacidad para convertir eugenol en alcohol coniferílico y a continuación, para algunas de ellas, por su capacidad para producir ácido ferúlico. De este modo, el clon 93205, preseleccionado por su capacidad para formar alcohol coniferílico se ha mostrado capaz posteriormente, mediante sus derivados, de convertir eugenol en ácido ferúlico.

El clon 93207 y su descendencia, se seleccionaron como ejemplos de cepas capaces de convertir eugenol en alcohol coniferílico en fermentador.

1/ Producción de alcohol coniferílico en fermentador con la cepa 93207 y uno de sus derivados 93334.

Dos esporas de la cepa 93207 se cruzaron para dar la cepa diploide 93334, que comprende de este modo dos copias del sistema de expresión que contiene vanillil alcohol oxidasa.

La cepa 93334 se cultivó a continuación en 100 ml de medio con malta durante dos días para alcanzar una concentración de aproximadamente $3 \text{ a } 6 \times 10^8$ células/ml. Las células se inoculan a continuación en un fermentador que contiene 3 litros de medio con malta. La inoculación se efectúa con la mitad del volumen de precultivo, a 30 °C y con agitación de 500 rpm. La aireación se lleva a 1 litro de aire/minuto.

Después de 20 h de cultivo, se añade el eugenol en solución en glucosa al 50 % (60 g de eugenol + 120 ml de glucosa al 50 % en H₂O).

Después 18 h de conversión, se detiene la fermentación. Se efectúa una extracción. Se acidifica con ácido fosfórico, se diluye 2 veces en etanol y se centrifuga a 8000 rpm. El sobrenadante se analiza en HPLC.

- 5 Los resultados muestran que en 18 horas el eugenol se convierte casi en su totalidad y que se sintetizaron 22 g/l de alcohol coniferílico (rendimiento molar cercano al 100 %).

2/ Producción de ácido ferúlico en fermentador con la cepa 93205 y uno de sus derivados 93342.

- 10 La cepa haploide 93242, procedente de la esporulación de la cepa 93205, se cultiva en 100 ml de medio con malta durante dos días, con agitación (150 rpm) y a 30 °C. Las células se ponen a continuación en cultivo en un fermentador que contiene 3 litros de medio con malta. La inoculación se efectúa con la mitad del volumen de precultivo, con agitación (500 rpm) y a 30 °C. La aireación se lleva a 0,45 litros de aire/minuto durante 24 h.

- 15 Después de 24 h de cultivo, la solución de eugenol se añade de forma continua con un caudal de 0,25 a 0,5 g de eugenol por hora. Se efectúan extracciones regularmente para seguir la conversión del sustrato en derivados fenólicos. Cada extracción se acidifica con ácido fosfórico y se centrifuga a 8000 rpm. El sobrenadante se analiza en HPLC.

- 20 Caudal de sustrato: 2,5 ml/H Concentraciones en gramos por litro

Tiempo (horas)	Eugenol distribuido	Eugenol restante	Alcohol coniferílico	Ácido ferúlico
0	0	0	0	0
16	1,6	0	0,7	0,75
40	3,8	0	0	3,8
64	7,1	0	0,2	6,7
112	10	0	0	10,11

En estas condiciones, se producen 10 g/l de ácido ferúlico a partir de 10 g/l de eugenol (rendimiento molar = 85 %).

Ejemplo 3: Escisión del marcador de selección del genoma de las levaduras transformadas.

- 25 1/ Construcción del vector pFL44s-NAT1-CRE para la escisión del marcador de selección.

El vector de escisión tiene como vector original, en este ejemplo, el vector pFL44s (referencia Genbank X70266). Este vector de un tamaño de 4319 pb posee:

- 30
- la secuencia del gen URA3
 - la secuencia del gen de resistencia AmpR
 - un sitio de clonación múltiple
 - la secuencia del origen de replicación de 2 micras.

- 35 En este vector pFL44s se insertan un inserto que comprende un marcador de selección y un inserto que comprende la secuencia de la enzima CRE.

- 40 El inserto que comprende el marcador de selección, en este caso el gen de resistencia a la nourseotricina NAT1, se obtiene a partir del vector que codifica nourseotricina (referencia Genbank X73149). Dicho vector y el vector pFL44s son digeridos por las enzimas de restricción BglII y EcoRI. El inserto NAT1 que comprende el promotor del gen TEF, la secuencia del gen NAT1 y el terminador del gen TEF, se inserta mediante simple ligamiento en el vector pFL44s. El vector obtenido de este modo es el vector pFL44s-NAT1.

- 45 El inserto que comprende la secuencia de la enzima CRE se obtiene a partir del vector psh47 (referencia Genbank AF298782). El vector psh47 y el vector pFL44s-NAT1 son digeridos por la enzima de restricción PvuII. El inserto CRE que comprende el promotor del gen GAL1, la secuencia del gen CRE y el terminador del gen CYC1, se inserta a continuación mediante simple ligamiento en el vector pFL44s-NAT1. El vector obtenido de este modo es el vector pFL44s-NAT1-CRE que tiene como secuencia la secuencia SEC. ID. N.º 11 (figura 3).

- 50 2/ Transformación de las levaduras con el vector de escisión para eliminar el marcador de selección presente en el genoma de las levaduras.

- 55 Las levaduras que comprenden el sistema de expresión que contiene vanillil alcohol oxidasa, por ejemplo la cepa 93334, se transforman con el vector de escisión pFL44s-NAT1-CRE. Las levaduras transformadas se seleccionan en medio rico (YPD) adicionado con clonNAT (100 mg/ml).

Las levaduras seleccionadas positivamente se cultivan a continuación en un medio YPGalactosa. Siendo el promotor

del gen CRE inducible en presencia de Galactosa, esta condición de cultivo permite la inducción de la expresión de la enzima CRE en las levaduras.

Los resultados de este experimento muestran que el 80 % de los clones han perdido el marcador KanR.

El procedimiento de conversión de eugenol en alcohol coniferílico tal como se ha descrito en 1/ se realiza con una cepa 93334 que ha perdido el marcador de selección. Después de 18 h de conversión, se obtienen los mismos resultados, lo que sugiere que la pérdida del marcador de selección no afecta a la capacidad de bioconversión de la cepa.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MANE, Jean

<120> Sistema de producción de moléculas aromáticas por bioconversión

<130> BFF060094

<160> 15

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 1734

<212> ADN

<213> *P. simplicissimum*

<400> 1

ES 2 560 430 T3

atgagcggcc gctcaaagac tcaagagttc agaccattga ctttgccacc aaagttgtct 60
 ttgtcagact tcaacgagtt cattcaagac attattagaa ttgttggttc agagaacgtt 120
 gaggttattt catctaagga ccaaattggt gacggttctt atatgaagcc aactcact 180
 catgaccac atcatgttat ggaccaagac ttttcttg cttctgctat tgttgctcca 240
 agaaacgttg ctgacgttca atctattggt ggtttggtca acaagttctc tttcccattg 300
 tggccaattt caattggtag aaactctggt tatggtggtg ctgctccccg ggtttcaggt 360
 tctgttgttt tggacatggg taagaacatg aacagagttt tggaggttaa cgttgaaggt 420
 gcttattgtg ttgttgaacc aggtgttact tatcatgact tgcataacta tttggaggct 480
 aacaacttga gagacaaatt gtggttagac gttccagatc taggtggtgg ttctgttttg 540
 ggtaacgctg ttgaaagagg tgttggttat actccatacg gtgatcattg gatgatgcat 600
 tctggtatgg aggttgtttt ggctaacggt gagttgttaa gaactggtat ggggtcttta 660
 ccagacccaa aaagaccaga gactatgggt ttgaagccag aagatcaacc atggtctaag 720
 attgctcatt tgttcccata cggtttcggt ccatatattg atggtttggt ctctcaatct 780
 aacatgggta ttgttactaa gattggtatt tggttaatgc caaaccagg tggttatcaa 840
 tcttatttga ttactttacc aaaggatggt gacttgaagc aagctgttga cattattaga 900
 ccattgagat taggtatggc tttgcaaac gttccaacta ttagacatat tttattggat 960
 gctgctgttt tgggtgacaa gagatcatat tcttcaaaa ctgagccatt gtctgacgag 1020
 gagttggaca agattgctaa gcaattgaac ttgggtagat ggaactttta tgggtctttg 1080
 tatggtccag aaccaattag aagagttttg tgggagacta ttaaagatgc tttctctgct 1140
 attccagggtg ttaagttcta tttccagaa gatactccag agaactctgt tttgagagtt 1200
 agagacaaga ctatgcaagg tattccaact tatgacgagt taaaatggat tgactggttg 1260
 ccaaacggtg ctcatattgtt cttctctcca attgctaagg tttctggtga agacgctatg 1320
 atgcaatatg ctgttactaa aaagagatgt caagaggctg gtttgactt cattggtact 1380
 tttactgttg gcatgctga gatgcatcat attgtttga ttgttttcaa caagaaggac 1440
 ttgattcaaa agagaaaggt tcaatggttg atgagaactt tgattgatga ctgtgctgct 1500

 aatggttggg gtgagtatag aactcatttg gctttcatgg accaaatrat ggagacttat 1560
 aactggaaca actcttcatt cttgagattc aacgaggttt tgaagaacgc tgttgatcca 1620
 aacggtatta ttgctccagg taagtcaggt gtttgccat ctcaatattc tcatgttact 1680
 tggagctcg agcagctcc cggggggggt tctcatcatc atcatcatca ttaa 1734

<210> 2
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> sitio de clonación múltiple

10

<400> 2
 gcggccgag atcccaattg cgactcgag

29

ES 2 560 430 T3

	<210> 3		
	<211> 34		
	<212> ADN		
	<213> bacteriófago P1		
5	<400> 3		
	ataacttcgt ataattgatg ctatacgaag ttat	34	
	<210> 4		
10	<211> 149		
	<212> ADN		
	<213> <i>S. cerevisiae</i>		
	<400> 4		
15	ctgtgcttcg gttacttcta aggaagtcca cacaaatcaa gatccgttag acgtttcagc	60	
	ttccaaaaca gaagaatgag agaaggcttc cactaaggct aactctcaac agacaacaac	120	
	acctgcttca tctgctgttc cagagaacc	149	
	<210> 5		
	<211> 153		
20	<212> ADN		
	<213> <i>S. cerevisiae</i>		
	<400> 5		
	acctgataca agaacttaac aagaaaccaa ttattaaagg cttacttact gatagtagat	60	
	caacgatcag tataattaag tctacaaatg aagagaaatt tagaaacaga ttttttggca	120	
25	caaaggcaat gagacttaga gatgaagtat cag	153	
	<210> 6		
	<211> 596		
30	<212> ADN		
	<213> <i>S. cerevisiae</i>		
	<400> 6		
	tcaaaaaact agtcttttaa ttctgctgta acccgtagat gcccaaaata gggggcgggt	60	
	tacacagaat atataacatc gtaggtgtct ggggtaacag tttattcctg gcatccacta	120	
	aatataatgg agcccgttt ttaagctggc atccagaaaa aaaagaatc ccagcaccaa	180	
	aatattgttt tcttcaccaa ccatcagttc ataggtccat tctcttagcg caactacaga	240	
	gaacaggggc acaaacaggc aaaaaacggg cacaacctca atggagtgat gcaacctgcc	300	
	tggagtaaat gatgacacaa ggcaattcac ccacgcatgt atctatctca ttttcttaca	360	
	ccttctatta ccttctgctc tctctgattt ggaaaaagct gaaaaaaaaag gttgaaacca	420	
	gttccctgaa attattcccc tacttgacta ataagtatat aaagacggta ggtattgatt	480	
	gtaattctgt aaatctattt cttaaacttc ttaaattcta cttttatagt tagtcttttt	540	
35	tttagtttta aaacaccaag aacttagttt cgaataaaca cacataaaca aacaaa	596	
	<210> 7		
	<211> 204		
40	<212> ADN		
	<213> <i>S. cerevisiae</i>		

ES 2 560 430 T3

<400> 7

acaggccccct tttcctttgt cgatctcatg taattagtta tgtcacgctt acattcacgc 60
cctcctccca catccgctct aaccgaaaag gaaggagtta gacaacctga agtctaggtc 120
cctatattatt ttttttaata gttatgttag tattaagaac gttatttata tttcaaattt 180
ttcttttttt tctgtacaaa cgcg 204

5 <210> 8
 <211> 383
 <212> ADN
 <213> *A. gossypii*

10 <400> 8

gttttagcttg cctcgtcccc gccgggtcac ccggccagcg acatggaggc ccagaatacc 60
ctccttgaca gtcttgacgt ggcagctca ggggcatgat gtgactgtcg cccgtacatt 120
tagcccatac atccccatgt ataatcattt gcatccatac attttgatgg ccgcacggcg 180
cgaagcaaaa attacggctc ctcgctgcag acctgcgagc agggaaacgc tcccctcaca 240
gacgcgttga attgtcccca cgccgcgccc ctgtagagaa atataaaagg ttaggatttg 300
ccactgaggt tcttctttca tatacttcct tttaaaatct tgctaggata cagttctcac 360
atcacatccg aacataaaca acc 383

15 <210> 9
 <211> 244
 <212> ADN
 <213> *A. gossypii*

20 <400> 9

tcagtactga caataaaaag attcttgttt tcaagaactt gtcatttgta tagttttttt 60
atattgtagt tgttctattt taatcaaatg ttagcgtgat ttatattttt tttcgcctcg 120
acatcatctg cccagatgcg aagttaagtg cgcagaaagt aatatcatgc gtcaatcgta 180
tgtgaatgct ggtcgctata ctgctgtcga ttcgatacta acgccgcat ccagtgtcga 240
aaac 244

25 <210> 10
 <211> 810
 <212> ADN
 <213> *E. coli*

<400> 10

ES 2 560 430 T3

atgggtaagg aaaagactca cgtttcgagg cgcgattaa attccaacat ggatgctgat 60
 ttatatgggt ataaatgggc tcgcgataat gtcgggcaat caggtgacac aatctatcga 120
 ttgtatggga agcccgatgc gccagagttg tttctgaaac atggcaaagg tagcgttgcc 180
 aatgatgtta cagatgagat ggtcagacta aactggctga cggaaatttat gcctcttccg 240
 accatcaagc attttatccg tactcctgat gatgcatggg tactcaccac tgcgatcccc 300
 ggcaaaacag cattccaggt attagaagaa taccctgatt caggtgaaaa tattgttgat 360
 gcgctggcag tgttcctgcg ccggttgcac tcgattcctg tttgtaattg tccttttaac 420
 agcgatcgcg tatttcgtct cgctcaggcg caatcacgaa tgaataacgg tttggttgat 480
 gcgagtgatt ttgatgacga gcgtaatggc tggcctgttg aacaagtctg gaaagaaatg 540
 cataagcttt tgccattctc accggattca gtcgctactc atggtgattt ctcacttgat 600
 aaccttattt ttgacgaggg gaaattaata ggttgattg atggtggacg agtcggaatc 660
 gcagaccgat accaggatct tgccatccta tggaaactgcc tcggtgagtt ttctccttca 720
 ttacagaaac ggctttttca aaaatatggt attgataatc ctgatatgaa taaattgcag 780
 tttcatttga tgctcgatga gtttttctaa 810

<210> 11
 <211> 3745
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> sistema de expresión que contiene el gen de la VAO (vanillil alcohol oxidasa)

10

<400> 11

gaattccagc tgtgcttcgg ttacttctaa ggaagtcac acaaatcaag atccgtaga 60
 cgtttcagct tccaaaacag aagaatgtga gaaggcttcc actaaggcta actctcaaca 120
 gacaacaaca cctgcttcat ctgctgttcc agagaaccga taacttcgta taatgtatgc 180
 tatacgaagt tatatgggta aggaaaagac tcacgtttcg aggccgcat taaattccaa 240
 catggatgct gatttatatg ggtataaatg ggctcgcgat aatgtcgggc aatcaggtgc 300
 gacaatctat cgattgtatg ggaagcccga tgcgccagag ttgtttctga aacatggcaa 360
 aggtagcgtt gccaatgatg ttacagatga gatggtcaga ctaaactggc tgacggaatt 420
 tatgcctctt ccgaccatca agcattttat ccgtactcct gatgatgcat ggttactcac 480
 cactgcatc cccggcaaaa cagcattcca ggtattagaa gaatatcctg attcaggtga 540
 aatattgtt gatgctgctg cagtgttctt gcgccggtt cattcgattc ctgtttgtaa 600
 ttgtcctttt aacagcgatc gcgtatttcg tctcgctcag gcgcaatcac gaatgaataa 660
 cggtttgggt gatgctgagtg attttgatga cgagcgtaat ggctggcctg ttgaacaagt 720

ctggaaagaa atgcataagc ttttgccatt ctcaccggat tcagtcgtca ctcatgggtga 780
 tttctcactt gataaccta ttttgacga ggggaaatta ataggttgta ttgatgttgg 840
 acgagtcgga atcgagacc gataccagga tcttgccatc ctatggaact gcctcgggtga 900
 gttttctcct tcattacaga aacggctttt tcaaaaatat ggtattgata atcctgatat 960
 gaataaattg cagtttcatt tgatgctcga tgagtttttc taacaaccct taatataact 1020
 tcgtataatg tatgctatac gaagttatta ggtcaaaaaa ctagtctttt aattctgctg 1080
 taaccctgac atgcccmeta tagggggcgg gttacacaga atatataaca tcgtaggtgt 1140
 ctgggtgaac agtttattcc tggcatccac taaatataat ggagcccgtc ttttaagctg 1200
 gcatccagaa aaaaaagaa tcccagcacc aaaatattgt tttcttcacc aaccatcagt 1260
 tcataggtcc attctcttag cgcaactaca gagaacaggg gcacaaacag gcaaaaaacg 1320
 ggcacaacct caatggagtg atgcaacctg cctggagtaa atgatgacac aaggcaattc 1380
 acccagcat gtatctatct cattttctta caccttctat taccttctgc tctctctgat 1440
 ttggaaaaag ctgaaaaaaa aggttgaaac cagttccctg aaattattcc cctacttgac 1500
 taataagtat ataaagacgg taggtattga ttgtaattct gtaaacttat ttcttaaact 1560
 tcttaaatc tacttttata gttagtcttt ttttagttt taaaacacca agaacttagt 1620
 ttcgaataaa cacacataaa caacaaaat gagcggccgc tcaaagactc aagagttcag 1680
 accattgact ttgccaccaa agttgtcttt gtcagacttc aacgagttca ttcaagacat 1740
 tattagaatt gttggttcag agaacgttga ggttatttca tctaaggacc aaattgttga 1800
 cggttcttat atgaagccaa ctcatactca tgaccacat catgttatgg accaagacta 1860
 tttcttggtc tctgctattg ttgctccaag aaacgttgct gacgttcaat ctattggtgg 1920
 tttggctaac aagttctctt tcccattgtg gccaatctca attggtagaa actctggtta 1980
 tgggtggtgct gctccccggg tttcaggttc tgttgtttg gacatgggta agaacatgaa 2040
 cagagttttg gaggttaacg ttgaaggtgc ttattgtgtt gttgaaccag gtgttactta 2100
 tcatgacttg cataactatt tggaggctaa caacttgaga gacaaattgt ggttagacgt 2160
 tccagatcta ggtggtggtt ctgttttggg taacgctgtt gaaagaggtg ttggttatac 2220
 tccatacggg gatcattgga tgatgcattc tggatggag gttgttttgg ctaacgggtga 2280
 gttgttaaga actggtatgg gtgctttacc agaccmetaa agaccagaga ctatgggttt 2340
 gaagccagaa gatcaaccat ggtctaagat tgctcatttg tccccatagc gtttcgggtcc 2400
 atatattgat ggtttgttct ctcaatctaa catgggtatt gttactaaga ttggtatttg 2460
 gttaatgcca aaccaggtg gttatcaatc ttatttgatt actttacca aggatgggtga 2520
 cttgaagcaa gctgttgaca ttattagacc attgagatta ggtatggctt tgcaaacgt 2580
 tccaactatt agacatattt tattggatgc tgctgttttg ggtgacaaga gatcatattc 2640
 ttcaaaaact gagccattgt ctgacgagga gttggacaag attgctaagc aattgaactt 2700
 gggtagatgg aacttttatg gtgctttgta tggccagaa ccaattagaa gagttttgtg 2760

ggagactatt aaagatgctt tctctgctat tccaggtggt aagttctatt ttccagaaga 2820
 tactccagag aactctgttt tgagagttag agacaagact atgcaaggta ttccaactta 2880
 tgacgagtta aaatggattg actggttgcc aaacgggtgct catttgttct tctctccaat 2940
 tgctaagggtt tctggtgaag acgctatgat gcaatatgct gttactaaaa agagatgtca 3000
 agaggctggt ttggacttca ttggtacttt tactgttggc atgctgtgaga tgcacatcat 3060
 tgrttgratt gttttcaaca agaaggactt gattcaaaag agaaagggtc aatggttgat 3120
 gagaactttg attgatgact gtgctgctaa tgggtggggg gagtatagaa ctcatrtggc 3180
 tttcatggac caaattatgg agacttataa ctggaacaac tcttcattct tgagattcaa 3240
 cgaggttttg aagaacgctg ttgatccaaa cggattattt gctccaggta agtcagggtg 3300
 ttggccatct caatattctc atgttacttg gaagctcgag catcatcatc atcatcatga 3360
 attgctgactc gagtaataaa caggccccct ttcctttgct gatctcatgt aattagttat 3420
 gtcacgctta cattcacgcc ctctcccac atccgctcta accgaaaagg aaggagttag 3480
 acaacctgaa gtctaggtcc ctatttattt tttttaatag ttatgttagt attaagaacg 3540
 ttatttatat ttcaaatttt tctttttttt ctgtacaaac gcgacctgat acaagaactt 3600
 aacaagaaac caattattaa aggcttactt actgatagta gatcaacgat cagtataatt 3660
 aagtctacaa atgaagagaa atttagaaac agattttttg gcacaaaggc aatgagactt 3720
 agagatgaag taccagctgc tgcag 3745

<210> 12
 <211> 3833
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> secuencia NAT1-CRE

10

<400> 12

ggatctgttt agcttgccctc gtccccgccg ggtcaccggt ccagcgcacat ggaggcccag 60
 aataccctcc ttgacagtct tgacgtgctc agctcagggg catgatgtga ctgtcgccccg 120
 tacatttagc ccatacatcc ccatgtataa tcatttgcac ccatacattt tgatggccgc 180
 acggcgcgaa gcaaaaatta cggctcctcg ctgcagacct gcgagcaggg aaacgctccc 240
 ctcacagacg cgttgaattg tccccacgcc gcgccccctgt agagaaatat aaaaggttag 300
 gatttgccac tgaggttctt ctttcatata cttcctttta aaatcttgct aggatacagt 360
 tctcacatca catccgaaca taaacaacca tgaccactct tgacgacacg gcttaccggt 420
 accgcaccag tgtccccggg gacgcccagg ccatcgaggc actggatggg tccttcacca 480
 ccgacaccgt cttccgctc accgccaccg gggacggctt caccctgcgg gaggtgccgg 540
 tggacccgcc cctgaccaag gtgttccccg acgacgaatc ggacgacgaa tcggacgccg 600
 gggaggacgg cgacccggac tcccggacgt tcgtcgcgta cggggacgac ggcgacctgg 660
 cgggcttcgt ggtcgtctcg tactccggct ggaaccgccg gctgaccgct gaggacatcg 720

aggtcgcccc	ggagcaccgg	gggcacgggg	tcgggcgcgc	gttgatgggg	ctcgcgacgg	780
agttcgcccc	cgagcggggc	gccgggcacc	tctggctgga	ggtcaccaac	gtcaacgcac	840
cggcgatcca	cgcgtagcgg	cggatggggg	tcaccctctg	cggcctggac	accgcctgt	900
acgacggcac	cgctcggac	ggcgagcagg	cgctctacat	gagcatgccc	tgccccta	960
cagtactgac	aataaaaaga	ttcttgTTTT	caagaacttg	tcatttgtat	agttttttta	1020
tattgtagtt	gttctatTTT	aatcaaagt	tagcgtgatt	tatatttttt	ttcgccctga	1080
catcatctgc	ccagatgcga	agttaagtgc	gcagaaagta	atatcatgcg	tcaatcgtat	1140
gtgaatgctg	gtcgtatac	tgctgtcgat	tcgatactaa	cgccgccatc	cagtgtcgaa	1200
aacgagctcg	aattcactgg	ccgtcgtttt	acaacgtcgt	gactgggaaa	accctggcgt	1260
taccaactt	aatcgcttg	cagcacatcc	ccctttcgcc	agctggcacg	acaggtttcc	1320
cgactggaaa	gcgggcagtg	agcgcaacgc	aattaatgtg	agttacctca	ctcattaggc	1380
accccaggct	ttacactfta	tgcttccggc	tcctatgttg	tgtggaattg	tgagcggata	1440
acaatttcac	acaggaaaca	gctatgacca	tgattacgcc	aagcgcgcaa	ttaaccctca	1500
ctaaagggaa	caaaagctgg	agctctagta	cggattagaa	gccgccgagc	gggtgacagc	1560
cctccgaagg	aagactctcc	tccgtgcgtc	ctcgtcttca	ccggtcgcgt	tcctgaaacg	1620
cagatgtgcc	tcgcgccgca	ctgctccgaa	caataaagat	tctacaatac	tagcttttat	1680
ggttatgaag	aggaaaaatt	ggcagtaacc	tggccccaca	aaccttcaaa	tgaacgaatc	1740
aaattaacaa	ccataggatg	ataatgcgat	tagtttttta	gccttatTtc	tggggtaatt	1800
aatcagcgaa	gcgatgattt	ttgatctatt	aacagatata	taaagcaaaa	aactgcataa	1860
ccactttaac	taatactttc	aacattttcg	gtttgtatta	cttcttattc	aatgtaata	1920
aaagtatcaa	caaaaaattg	ttaatatacc	tctatacttt	aacgtcaagg	agaaaaaacc	1980
ccggattcta	gaactagtg	atccccggg	ctgcaggaat	tcgatatcaa	gcttatcgat	2040
accgtcgagg	ggcagagccg	atcctgtaca	ctttacttaa	aaccattatc	tgagtgttaa	2100
atgtccaatt	tactgaccgt	acacaaaat	ttgcctgcat	taccggtcga	tgcaacgagt	2160
gatgaggttc	gcaagaacct	gatggacatg	ttcagggatc	gccaggcgtt	ttctgagcat	2220
acctggaaaa	tgcttctgtc	cgtttgccgg	tcgtggggcg	catggtgcaa	gttgaataac	2280
cggaaatggg	ttcccgcaga	acctgaagat	gttcgcgatt	atcttctata	tcttcaggcg	2340
cgcggtctgg	cagtaaaaac	tatccagcaa	catttgggcc	agctaaacat	gcttcatcgt	2400
cggctccggc	tgccacgacc	aagtgcagc	aatgctgttt	cactggttat	gcggcggatc	2460
cgaaaagaaa	acgttgatgc	cgggtaacgt	gcaaaacagg	ctctagcgtt	cgaaacgact	2520
gatttcgacc	aggttcgttc	actcatggaa	aatagcgatc	gctgccagga	tatacgtaat	2580
ctggcatttc	tggggattgc	ttataacacc	ctgttacgta	tagccgaaat	tgccaggatc	2640
agggttaaag	atatctcacg	tactgacggt	gggagaatgt	taatccatat	tggcagaacg	2700
aaaacgctgg	ttagcaccgc	aggtgtagag	aaggcactta	gcctgggggt	aactaaactg	2760

gtcgagcgat ggatttccgt ctctggtgta gctgatgatc cgaataacta cctgttttgc 2820
 cgggtcagaa aaaatggtgt tgccgcgcca tctgccacca gccagctatc aactcgcgcc 2880
 ctggaagggg tttttgaagc aactcatcga ttgatttacg gcgctaagga tgactctggt 2940
 cagagatacc tggcctggtc tggacacagt gcccgtgtcg gagccgcgcg agatatggcc 3000
 cgcgctggag tttcaatacc ggagatcatg caagctggtg gctggaccaa tgtaaataatt 3060
 gtcatgaact atatccgtac cctggatagt gaaacagggg caatggtgcg cctgctggaa 3120
 gatggcgatt agccattaac gcgtaaataa ttgctataat tatttgatat ttatggtgac 3180
 atatgagaaa ggatttcaac atcgacggaa aatatgtagt gctgtctgta agcactaata 3240
 ttcagtcgcc agccgtcatt gtcactgtaa agctgagcga tagaatgcct gatattgact 3300
 caatatccgt tgcgtttctt gtcaaaagta tgcgtagtgc tgaacatttc gtgatgaatg 3360
 ccaccgagga agaagcacgg cgcggttttg ctaaagtgat gtctgagttt ggcgaactct 3420
 tgggtaaggt tggaattgtc gacctcgagt catgtaatta gttatgtcac gcttacattc 3480
 acgccctccc cccacatccg ctctaaccga aaaggaagga gttagacaac ctgaagtcta 3540
 ggtccctatt tattttttta tagttatggt agtattaaga acgttattta tatttcaaat 3600
 ttttcttttt tttctgtaca gacgcgtgta cgcagtgaac attatactga aaaccttgct 3660
 tgagaaggtt ttgggacgct cgaaggcttt aatttgcggc cggtacccaa ttcgccctat 3720
 agtgagtcgt attacgcgcg ctcaactggc gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac 3780
 cctggcggtta cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag ctg 3833

5 <210> 13
 <211> 2715
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> sistema de expresión
 <400> 13

ES 2 560 430 T3

gaattccagc	tgtgcttcgg	ttacttctaa	ggaagtccac	acaaatcaag	atccgttaga	60
cgtttcagct	tccaaaacag	aagaatgtga	gaaggcttcc	actaaggcta	actctcaaca	120
gacaacaaca	cctgcttcat	ctgctgttcc	agagaaccgt	cgacaaccct	taatataact	180
tcgtataatg	tatgctatac	gaagttatta	ggctctagaga	tctgtttagc	ttgcctcgtc	240
cccgccgggt	cacccggcca	gcgacatgga	ggcccagaat	accctccttg	acagtcttga	300
cgtgcgcagc	tcaggggcat	gatgtgactg	tcgcccgtac	atttagccca	tacatcccca	360
tgtataatca	tttgcattca	tacattttga	tggccgcacg	gcgcgaagca	aaaattacgg	420
ctcctcgctg	cagacctgcg	agcagggaaa	cgctcccctc	acagacgcgt	tgaattgtcc	480
ccacgccgcg	cccctgtaga	gaaatataaa	aggttaggat	ttgccactga	ggttcttctt	540
tcatataactt	ccttttaaaa	tcttgctagg	atacagttct	cacatcacat	ccgaacataa	600
acaaccatgg	gtaaggaaaa	gactcacggt	tcgaggccgc	gattaaattc	caacatggat	660

gctgatttat atgggtataa atgggctcgc gataatgctg ggcaatcagg tgcgacaatc 720
tarcgattgt atgggaagcc cgatgcgcca gagttgtttc tgaacatgg caaaggtagc 780
gtrgccaatg atgttacaga tgagatggtc agactaaact ggctgacgga atttatgcct 840
cttccgacca tcaagcattt tatccgtact cctgatgatg catggttact caccactgcg 900
atccccggca aaacagcatt ccaggtatta gaagaatata ctgattcagg tgaaaatatt 960
gttgatgctg tggcagtgtt cctgcgccgg ttgcattcga ttctgtttg taattgtcct 1020
tttaacagcg atcgcgtatt tcgtctcgtc caggcgcaat cacgaatgaa taacggtttg 1080
gtrgatgctg gtgattttga tgacgagcgt aatggctggc ctgttgaaca agtctgaaa 1140
gaaatgcata agcttttgcc attctcaccg gattcagctg tcactcatgg tgattttctca 1200
cttgataacc ttatttttga cgaggggaaa ttaatagggt gtattgatgt tggacgagtc 1260
ggaatcgcag accgatacca ggatcttgcc atcctatgga actgcctcgg tgagttttct 1320
ccttcattac agaaacggct ttttcaaaa tatggtattg ataatcctga tatgaataaa 1380
ttgcagtttc atttgatgct cgatgagttt ttctaatacag tactgacaat aaaaagattc 1440
ttgttttcaa gaacttgca tttgtatagt tttttatat tgtagttgtt ctattttaat 1500
caaatgttag cgtgatttat atttttttc gcctcgacat catctgcca gatgcgaagt 1560
taagtgcgca gaaagtaata tcatgctgca atcgtatgtg aatgctggc gctatactgc 1620
tgtcgattcg atactaacgc cgccatccag tgcgaaaac gagctcaacc cttaatataa 1680
cttcgtataa tgtatgctat acgaagtat taggtcaaaa aactagtctt ttaattctgc 1740
tgtaaccctg acatgcccac aatagggggc gggttacaca gaatatataa catcgtaggt 1800
gtctgggtga acagtttatt cctggcatcc actaaatata atggagcccg ctttttaagc 1860
tggcatccag aaaaaaaaaa aatcccagca ccaaaatatt gttttcttca ccaaccatca 1920
gttcataggt ccattctctt agcgcacta cagagaacag gggcacaac aggcaaaaaa 1980
cgggcacaac ctcaatggag tgatgcaacc tgcctggagt aatgatgac acaaggcaat 2040
tcaccacgc atgtatctat ctcatcttct tacaccttct attaccttct gctctctctg 2100
atitggaaaa agctgaaaaa aaagggtgaa accagttccc tgaaattatt cccctacttg 2160
actaataagt atataaagac ggtaggtatt gattgtaatt ctgtaaatct atttcttaaa 2220
cttcttaaat tctactttta tagttagtct ttttttagt tttaaacac caagaactta 2280
gtttcgaata aacacacata aacaacaaa atgagcggcc gcggatcca attgcgactc 2340
gagtaataaa caggccccctt ttcctttgct gatctcatgt aattagttat gtcacgctta 2400
cattcacgcc ctctcccac atccgctcta accgaaaagg aaggagttag acaacctgaa 2460
gtctagggtc ctatttattt tttttaatag ttatgtagt attaagaacg ttatttatat 2520
ttcaaatttt tctttttttt ctgtacaaac gcgacctgat acaagaactt aacaagaaac 2580
caattattaa aggcttactt actgatagta gatcaacgat cagtataatt aagtctacaa 2640
atgaagagaa atttagaaac agattttttg gcacaaaggc aatgagactt agagatgaag 2700
tarcagctgc tgcag 2715

ES 2 560 430 T3

<210> 14
 <211> 1225
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> secuencia sintética-sistema de expresión

<400> 14

10

```

gaattccagc tgtgcttcgg ttacttctaa ggaagtccac acaaatcaag atccgtaga 60
cgtttcagct tccaaaacag aagaatgtga gaaggcttcc actaaggcta actctcaaca 120
gacaacaaca cctgcttcac ctgctgttcc agagaaccgt cgacgatatc gagctcaacc 180
cttaatataa cttcgtataa tgtatgctat acgaagttat taggtcaaaa aactagtctt 240
ttaattctgc tgtaaccctg acatgcccaa aatagggggc gggttacaca gaatatataa 300
catcgtaggt gtctgggtga acagtttatt cctggcatcc actaaatata atggagcccg 360
ctttttaagc tggcatccag aaaaaaaaaa aatcccagca ccaaaatatt gttttcttca 420
ccaaccatca gttcataggt ccattctctt agcgcaacta cagagaacag gggcacaaac 480
aggcaaaaaa cgggcacaac ctcaatggag tgatgcaacc tgcctggagt aatgatgac 540
acaaggcaat tcaccacgc atgtatctat ctcattttct tacaccttct attaccttct 600
gctctctctg atttggaaaa agctgaaaaa aaaggttgaa accagttccc tgaatattatt 660
cccctacttg actaataagt atataaagac ggtaggtatt gattgtaatt ctgtaaactt 720
atctcttaaa cttcttaaat tctactttta tagttagtct ttttttagt tttaaaacac 780
caagaactta gtttcgaata aacacacata aacaacaaa atgagcggcc gcggatccca 840
attgcgactc gagtaataaa caggcccctt ttcctttgtc gatctcatgt aattagttat 900
gtcagctta cattcacgcc ctcctcccac atccgctcta accgaaaagg aaggagttag 960
acaacctgaa gtctaggtcc ctatttattt tttttaatag ttatgttagt attaagaacg 1020
ttatttatat ttcaaatttt tctttttttt ctgtacaaac gcgacctgat acaagaactt 1080
aacaagaaac caattattaa aggcttactt actgatagta gatcaacgat cagtataatt 1140
aagtctacaa atgaagagaa atttagaaac agatTTTTTg gcacaaaggc aatgagactt 1200
agagatgaag tatcagctgc tgcag 1225
    
```

<210> 15
 <211> 1508
 <212> ADN
 <213> artificial

15

<220>
 <223> inserto de selección-sistema de expresión

20

<400> 15

gtcgacaacc cttaatataa cttcgtataa tgtatgctat acgaagttat taggtctaga 6
 gatctgttta gcttgccctg tccccgccgg gtcacccggc cagcgacatg gaggcccaga 12

 ataccctcct tgacagtctt gacgtgcgca gctcaggggc atgatgtgac tgtcgcccgt 180
 acatttagcc catacatccc catgtataat catttgcac catacatttt gatggccgca 240
 cggcgcggaag caaaaattac ggctcctcgc tgcagacctg cgagcagggga aacgctcccc 300
 tcacagacgc gttgaattgt cccacgccc cgcccctgta gagaaatata aaaggttagg 360
 atttgccact gaggttcttc tttcatatac ttccttttaa aatcttgcta ggatacagtt 420
 ctcacatcac atccgaacat aaacaacat gggttaaggaa aagactcac tttcgaggcc 480
 gcgattaaat tccaacatgg atgctgattt atatgggtat aaatgggctc gcgataatgt 540
 cgggcaatca ggtgcgacaa tctatcgatt gtatgggaag cccgatgccc cagagttggt 600
 tctgaaacat ggcaaaggta gcgttgccaa tgatgttaca gatgagatgg tcagactaaa 660
 ctggctgacg gaatttatgc ctctccgac catcaagcat tttatccgta ctctgatga 720
 tgcattggtta ctcaccactg cgatccccgg caaacagca ttccaggat tagaagaata 780
 tcctgattca ggtgaaaata ttgttgatgc gctggcagtg ttctgccc gggtgcattc 840
 gattcctggt tgtaattgtc cttttaacag cgatcgcgta tttcgtctcg ctcaggcgca 900
 atcacgaatg aataacgggt tggttgatgc gagtgatttt gatgacgagc gtaatggctg 960
 gcctgttgaa caagtctgga aagaaatgca taagcttttg ccattctcac cggattcagt 1020
 cgtcactcat ggtgatttct cacttgataa cttattttt gacgagggga aattaatagg 1080
 ttgtattgat gttggacgag tcggaatcgc agaccgatac caggatcttg ccatcctatg 1140
 gaactgcctc ggtgagtttt ctcttcatt acagaaacgg ctttttcaa aatatggat 1200
 tgataatcct gatatgaata aattgcagtt tcatttgatg ctcgatgagt ttttctaadc 1260
 agtactgaca ataaaaagat tcttgttttc aagaacttgt catttgtata gtttttttat 1320
 attgtagttg ttctatttta atcaaatgtt agcgtgattt atatttttt tgcctcgac 1380
 atcatctgcc cagatgcgaa gttaagtgcg cagaaagtaa tatcatgct caatcgtatg 1440
 tgaatgctgg tcgctatact gctgctgatt cgatactaac gccccatcc agtgtcgaaa 1500
 acgagctc 1508

REIVINDICACIONES

1. Levadura que pertenece a la especie *Saccharomyces cerevisiae* transformada por el gen que codifica la vanillil alcohol oxidasa que tiene como secuencia la secuencia SEC. ID. N.º 1 o cualquier secuencia idéntica en al menos el 70 %, preferentemente el 80 %, muy preferentemente el 90 % a la secuencia SEC. ID. N.º 1.
2. Levadura de acuerdo con la reivindicación **1**, **caracterizada por que** el gen que codifica la vanillil alcohol oxidasa está contenido en un sistema de expresión, comprendiendo dicho sistema:
- (1) medios para la integración de dicho sistema en el genoma de dicha levadura, que comprenden dos secuencias nucleotídicas,
- (2) medios para la selección de dicha levadura que tiene integrado dicho sistema, que comprenden un inserto de selección que comprende dos secuencias LoxP que corresponden a la secuencia SEC. ID. N.º 3 que enmarca un promotor, un marcador de selección del tipo gen de resistencia a los antibióticos y un terminador,
- (3) una casete de expresión del gen que codifica la vanillil alcohol oxidasa, que comprende un promotor que permite la expresión de dicho gen, al menos un sitio de clonación que permite la integración del gen, y un terminador.
3. Levadura de acuerdo con la reivindicación **2**, **caracterizada por que** las secuencias nucleotídicas de integración de dicho sistema de expresión en el genoma de la levadura son las secuencias TY1A que corresponde a la secuencia SEC. ID. N.º 4 y TY1B que corresponde a la secuencia SEC. ID. N.º 5 de *Saccharomyces cerevisiae* o cualesquiera secuencias que son idénticas a éstas en al menos el 70 %, preferentemente el 80 %, muy preferentemente el 90 %.
4. Levadura de acuerdo con una de las reivindicaciones **2 a 3**, **caracterizada por que** el promotor que permite la expresión de vanillil alcohol oxidasa es el promotor del gen TDH3 (SEC. ID. N.º 6) de *Saccharomyces cerevisiae*, y el terminador asociado es el terminador del gen CYC1 que corresponde a la secuencia SEC. ID. N.º 7 de *Saccharomyces cerevisiae* o cualesquiera secuencias que sean idénticas a éstas en al menos el 70 %, preferentemente el 80 %, muy preferentemente el 90 %.
5. Levadura de acuerdo con una de las reivindicaciones **2 a 4**, **caracterizada por que** el promotor y el terminador que permiten la expresión del marcador de selección son el promotor que corresponde a la secuencia SEC. ID. N.º 8 y el terminador que corresponde a la secuencia SEC. ID. N.º 9 del gen TEF1 de *Ashbya gossypii* o cualesquiera secuencias que sean idénticas a éstas en al menos el 70 %, preferentemente el 80 %, muy preferentemente el 90 %.
6. Levadura de acuerdo con una de las reivindicaciones **2 a 5**, **caracterizada por que** el marcador de selección es un gen de resistencia a los antibióticos seleccionado entre el grupo que comprende los genes de resistencia a geneticina, nourseotricina, fleomicina, zeocina o cualquier otro gen de resistencia a un antibiótico dominante para el que la levadura silvestre sea sensible y es preferentemente el gen de resistencia a geneticina que corresponde a la secuencia SEC. ID. N.º 10 o cualquier secuencia que sea idéntica a ésta en al menos el 70 %, preferentemente el 80 %, muy preferentemente el 90 %.
7. Levadura de acuerdo con una de las reivindicaciones **2 a 6**, en la que el sistema de expresión que contiene la vanillil alcohol oxidasa tiene como secuencia la secuencia nucleotídica SEC. ID. N.º 11 o cualquier secuencia que sea idéntica a ésta en al menos el 70 %, preferentemente el 80 %, muy preferentemente el 90 %.
8. Procedimiento de producción de alcohol coniferílico y/o de ácido ferúlico naturales, que comprende las siguientes etapas:
- a) clonación de la secuencia nucleotídica del gen que codifica vanillil alcohol oxidasa tal como ha definido en la reivindicación 1, en el sistema de expresión tal como se ha definido en una de las reivindicaciones **2 a 7**,
- b) transformación de una levadura que pertenece a la especie *Saccharomyces cerevisiae* con el sistema de expresión obtenido de este modo,
- c) cultivo de la levadura en condiciones que permitan la expresión de la vanillil alcohol oxidasa,
- d) puesta en contacto de la levadura con eugenol.
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación **8**, **caracterizado por que** permite la producción de ácido ferúlico.
10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones **8 a 9**, que comprende, después de la etapa b) y antes de las etapas c) y d), las etapas b1), b2) y b3) siguientes:
- b1) transformación de la levadura con un vector de escisión seleccionado entre los vectores multicopia, preferentemente pFL44s, que comprenden la secuencia SEC. ID. N.º 12 o cualquier secuencia idéntica en al menos el 70 %, preferentemente el 80 %, muy preferentemente el 90 %, a la secuencia SEC. ID. N.º 12,
- b2) cultivo de la levadura en las condiciones que permiten la expresión de la enzima CRE,
- b3) aislamiento de las levaduras que han perdido el marcador de selección.

11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación **10**, en el que las etapas b), b1), b2) y b3) se repiten tantas veces como copias del sistema de expresión se deseen.
- 5 12. Procedimiento de producción de vanillina que comprende las etapas a), b), c) y d) tal como se han descrito en una cualquiera de las reivindicaciones **8 a 11** y una etapa posterior de conversión del ácido ferúlico y/o del alcohol coniferílico producidos en la etapa d) en vanillina.
- 10 13. Procedimiento de producción de vanillina de acuerdo con la reivindicación **12**, en el que la etapa de conversión del ácido ferúlico y/o del alcohol coniferílico producidos en la etapa d) en vanillina se efectúa en una levadura o por vía bioquímica o vía enzimática.

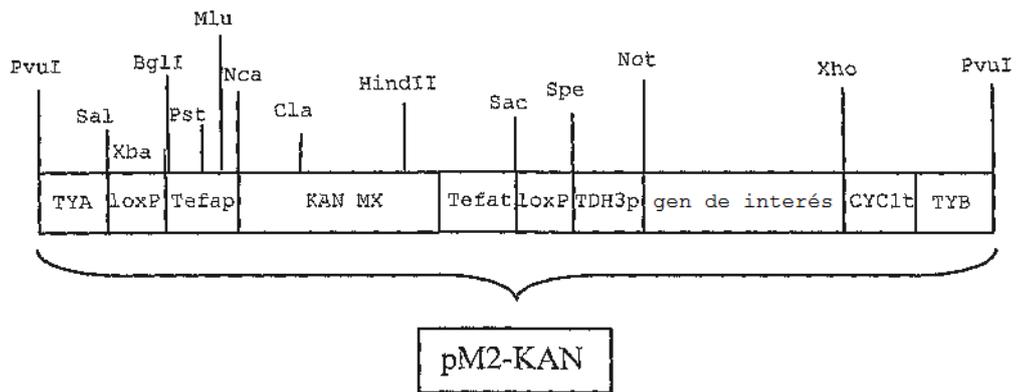


Figura 1



M: Marcador de tamaño molecular

S: Fracción soluble después de centrifugado

FT: Fracción no retenida sobre Ni-NTA

E: Fracción de elución de la resina Ni-NTA

Figura 2

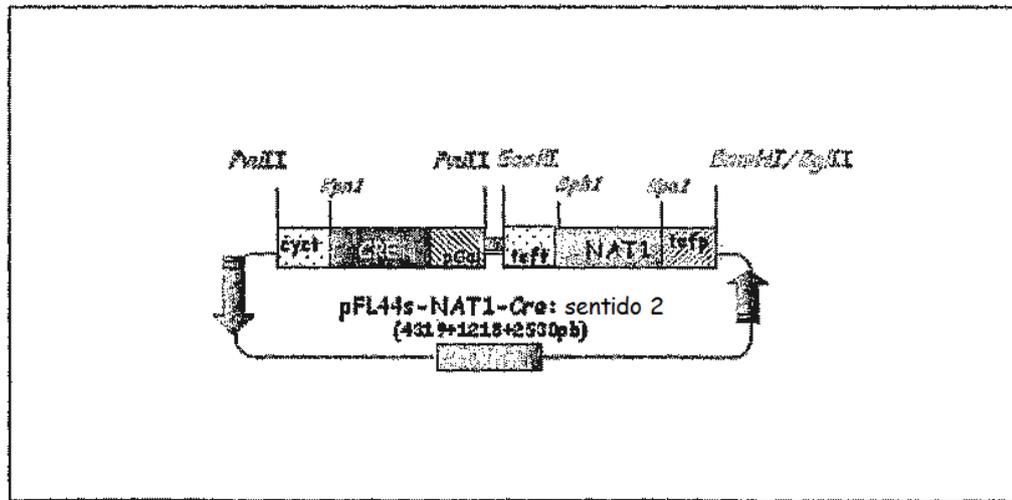
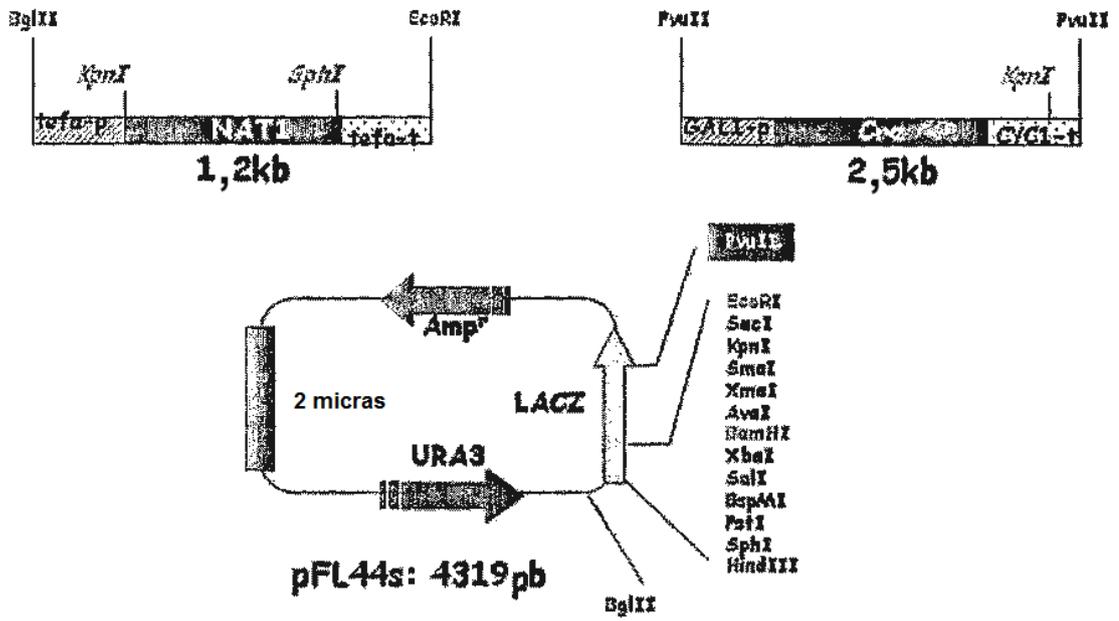


Figura 3