



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 103033

(13) C2

(51) МПК

C12N 1/16 (2006.01)

C12P 7/46 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки:	а 2011 01388	(72) Винахідник(и):	Янсен Міхель Леонардус Аугуст (NL), Вервал Рене (NL)
(22) Дата подання заявки:	20.05.2009	(73) Власник(и):	ДСМ АйПі АСЕТС Б.В., Het Overloon 1, NL-6411 TE Heerlen, The Netherlands (NL)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	10.09.2013	(74) Представник:	Слободянюк Алла Василівна, реєстр. №25
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	08159891.4	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2009/011974 A, 22.01.2009. WO 2008/144626 A, 27.11.2008. Zelle R et al., Malic acid production by Saccharomyces cerevisiae: engineering of pyruvate carboxylation, oxaloacetate reduction, and malate export // APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. - 2008. - Vol. 74. - № 9. - P. 2766-2777. WO 2007/106524 A, 20.09.2007. WO 00/71738 A, 30.11.2000. Abbott D. A et al., Metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae for production of carboxylic acids: current status and challenges // FEMS YEAST RESEARCH. - 2009. - Vol. 9. - №8. - P. 1123-1136.
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	08.07.2008		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.03.2011, Бюл.№ 5		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	10.09.2013, Бюл.№ 17		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2009/056181, 20.05.2009		

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ДИКАРБОНОВИХ КИСЛОТ ЗА НИЗЬКИХ pH**(57) Реферат:**

Винахід належить до способу одержання дикарбонowych кислот, який включає ферментацію дріжджів у присутності вуглеводмісних субстратів і малих кількостей кисню при значенні pH нижче найнижчого рK_a дикарбоновой кислоти, при якому питома швидкість споживання кисню становить від 8 до 0,2 ммоль/г сухої біомаси/год.

UA 103033 C2

Галузь техніки, до якої належить винахід

Даний винахід належить до способу отримання дикарбонових кислот. Зокрема, винахід належить до отримання дикарбонових кислот за допомогою ферментації дріжджів.

Попередній рівень техніки

- 5 Дикарбонові кислоти, такі як фумарова кислота і бурштинова кислота, є важливими сполуками, які використовують в харчовій промисловості для приготування і зберігання їжі, в медичній промисловості для складання лікарських препаратів та інших промислових застосувань, таких як мономері і (біо)полімери. Для задоволення потреби, що зростає, в дикарбонових кислотах, розробляються ефективніші і економічніші способи виробництва.
- 10 Дикарбонові кислоти традиційно отримують ферментацією бактерій, яка може давати великі кількості дикарбонових кислот. Це описано, наприклад, в US 5573931, в якому описаний спосіб отримання бурштинової кислоти у високих концентраціях з використанням певного бактерійного штаму. Проте, одним дуже серйозним недоліком, пов'язаним з використанням бактерій для отримання дикарбонових кислот, є утворення солі дикарбонової кислоти. У разі використання
- 15 бактерій рН під час ферментації слід підтримувати в межах 6-7, що вище за значення pK_a всіх дикарбонових кислот. Внаслідок цього більша частина кислот утворюватиметься в їх сольовій формі, а солі необхідно перетворювати на кислоту. У процесах великомасштабного виробництва це практично не вигідно і неефективно та підвищує виробничі витрати. Для отримання органічних кислот використовуються також і мікроорганізми, що не є бактеріями. У
- 20 EP 0424384 розкривається аеробний спосіб отримання органічних кислот за допомогою гриба виду *Rhizopus* в середовищі, що містить карбонат кальцію. У EP 1183385 для отримання молочної кислоти розкриваються генетично змінені дріжджові клітини з негативним фенотипом *Craibtree* і що містять екзогенну молекулу нуклеїнової кислоти.

Детальний опис винаходу

- 25 Даний винахід належить до способу отримання дикарбонових кислот. Спосіб включає ферментацію дріжджів у присутності субстрату, що містить вуглеводи, і невеликих кількостей кисню при значенні рН нижче за pK_a дикарбонової кислоти. Спосіб даного винаходу забезпечує високі виходи дикарбонової кислоти як продукту, спрощує подальшу обробку і є економічнішим, ніж існуючі способи, в яких утворюється сіль, яку потім необхідно перетворювати на кислоту.
- 30 Оскільки дикарбонові кислоти мають більш за одне значення pK_a , рН повинне бути нижче найнижчого pK_a дикарбонової кислоти. Для більшості кислот рН повинне бути в межах від 1,0 до 5,5, переважно від 2,0 до 4,0. У одному з варіантів здійснення бурштинову кислоту отримують при значенні рН 3,0. Інша перевага полягає в тому, що завдяки низькому значенню рН знижується вірогідність забруднення.

- 35 Стадії виробництва кислоти переважно передують стадії утворення біомаси, метою якої є оптимальне отримання біомаси. На стадії утворення біомаси рН лежить в межах від 2 до 7, переважно в межах від 3 до 6 і, переважніше, в межах від 4 до 5.

Спосіб відповідно до даного винаходу більш економічний і може давати зниження витрат на 30%. Однією з причин цього є значне зниження витрат на титрант.

- 40 Спосіб може бути використаний для отримання будь-якої дикарбонової кислоти. Відповідні приклади включають адипінову кислоту, фумарову кислоту, ітаконову кислоту, бурштинову кислоту, малеїнову кислоту, щавлеву кислоту. Переважними дикарбоновими кислотами є бурштинова кислота, фумарова кислота і малеїнова кислота.

- 45 Дріжджі, що використовуються в способі, можуть бути будь-які відповідні дріжджі. Відповідні приклади дріжджів включають *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluveromyces*, *Candida*, *Pichia* і *Yarrowia*, такі як види *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluveromyces lactis*, *Candida sonorensis*, *Pichia stipidis* і *Yarrowia lipolytica*. У одному з варіантів здійснення використовуваним у способі мікроорганізмом є *Saccharomyces cerevisiae* - мікроорганізм, що є широко вживаним і таким, що представляє промисловий інтерес
- 50 мікроорганізмом.

- В одному з варіантів здійснення дріжджі відповідно до даного винаходу є генетично модифікованими дріжджами. Відповідно до представлення заявки, генетично модифіковані дріжджі в способі відповідно до даного винаходу визначаються як дріжджові клітини, які містять нуклеотидну послідовність або поліпептидну послідовність, яка не міститься природним чином в
- 55 дріжджовій клітині, або трансформовані або генетично модифіковані цією послідовністю, або ж містять додаткову копію або копії послідовності ендогенної нуклеїнової кислоти. Дикий тип дріжджової клітини визначається в заявці як клітина-пращур для рекомбінантної клітини.

Дріжджі в способі даного винаходу є переважно генетично модифікованими дріжджами, що містять нуклеотидну послідовність, що кодує гетерологічний фермент, вибраний з групи, що

складається з фосфоенолпіруват-карбоксикінази, фумарат-редуктази і фумарази. Переважні варіанти здійснення гетерологічних ферментів визначені нижче.

Вираз «гомологічний», коли він використовується для зазначення спорідненості між даною (рекомбінантною) нуклеїновою кислотою або поліпептидною молекулою і даним організмом-господарем або клітиною-господарем, слід розуміти як такий, що означає, що в природі нуклеїнова кислота або поліпептидна молекула продукуються клітиною-господарем або організмами одних і тих самих видів, переважно одного і того ж різновиду або штаму.

Вираз «гетерологічний», коли він використовується відносно якої-небудь нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК) або білка, відноситься до нуклеїнової кислоти або білка, які не зустрічаються природним чином як частина організму, клітина, геном або послідовність ДНК або РНК, в яких вони присутні, або які знаходяться в якій-небудь клітині або ділянці (ділянках) в геномі або послідовності ДНК або РНК, які відрізняються від структур, в яких вони знаходяться в природі. Гетерологічні нуклеїнові кислоти або білки не є ендегенними по відношенню до клітини, в яку їх вводять, але отримують з якої-небудь іншої клітини, отриманої синтетичним або рекомбінантним методом.

Генетично модифіковані дріжджі переважно містять нуклеотидну послідовність, що кодує фосфоенолпіруват (PEP) - карбоксикіназу. (PEP)-карбоксикіназа (ЄС 4.1.1.49) є переважно гетерологічним ферментом переважно бактерійного походження. Конкретніше, фермент, що володіє PEP-карбоксикіназною активністю, походить з *Escherichia coli*, *Mannheimia* sp., *Actinobacillus* sp. або *Anaerobiospirillum* sp., ще конкретніше з *Mannheimia succiniciproducens* або *Actinobacillus succinogenes*. У одному з варіантів здійснення PEP-карбоксикіназу отримують з *Actinobacillus succinogenes* (PCKa), де PCKa переважно заздалегідь модифікований шляхом заміни EGY в положенні 120-122 на амінокислотну послідовність DAF. Дріжджова клітина відповідно до даного винаходу переважно генетично модифікована PEP-карбоксикіназою, послідовність якій щонайменше на 80, 85, 90, 95, 99 або на 100% ідентична амінокислотна послідовність SEQ ID NO: 6.

У іншому переважному варіанті здійснення генетично модифіковані дріжджі в способі відповідно до даного винаходу містять нуклеотидну послідовність, що кодує фумарат-редуктазу. Фумарат-редуктаза є переважно гетерологічним ферментом, переважно NAD(H)-залежною фумарат-редуктазою будь-якого відповідного походження і може бути, наприклад, отримана з бактерій, грибів, найпростіших або рослин. Дріжджі в способі відповідно до даного винаходу переважно містять NAD(H)-залежну фумарат-редуктазу, переважно отриману з *Trypanosoma* sp., наприклад з *Trypanosoma brucei*. У одному з переважних варіантів здійснення нуклеотидна послідовність, кодує NAD(H)-залежна фумарат-редуктаза, експресується в цитозолі. У тому випадку, коли нуклеотидна послідовність, кодує NAD(H)-залежна фумарат-редуктаза, містить пероксисомальний або мітохондріальний націлюючий сигнал, щоб запобігти пероксисомальному або мітохондріальному націлюванню ферменту, може виявитися здатним модифікувати або видалити ряд амінокислот (і відповідних їм нуклеотидних послідовностей в кодуючій нуклеотидній послідовності). Присутність пероксисомального націлюючого сигналу може бути визначена за допомогою, наприклад, методу, розкритого Schluter et al, *Nucleic acid Research* 2007, 35, D815-D822. Переважно, щоб дріжджова клітина відповідно до даного винаходу була генетично модифікована NAD(H)-залежною фумарат-редуктазою, послідовність якої щонайменше на 80, 85, 90, 95, 99 або 100% ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 7.

У ще одному переважному варіанті здійснення генетично модифіковані дріжджі в способі відповідно до даного винаходу містять нуклеотидну послідовність, кодує фумаразу, яка може бути як гетерологічним, так і гомологічним ферментом. Нуклеотидна послідовність, що кодує гетерологічну фумаразу може бути будь-якого відповідного походження, переважно мікробного походження і переважно може бути отримана з дріжджів, зокрема з *Saccharomyces cerevisiae* або *filamentous fungus*, наприклад *Rhizopus oryzae*. Переважно, щоб дріжджі в способі відповідно до даного винаходу надекспресували нуклеотидну послідовність, кодує фумаразу, яка б на щонайменше 70, переважно на щонайменше 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, або 99% або на 100% була ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 8.

У ще одному переважному варіанті здійснення генетично модифіковані дріжджі в способі відповідно до даного винаходу містять додатково нуклеотидну послідовність, кодує малат-дегідрогеназу (MDH), яка проявляє активність в цитозолі при експресуванні нуклеотидної послідовності. У MDH переважно відсутній пероксисомальний або мітохондріальний націлюючий сигнал, щоб локалізувати фермент в цитозолі. Цитозольною MDH може бути будь-яка відповідна гомологічна або гетерологічна малат-дегідрогеназа. Переважно, щоб дріжджова клітина відповідно до даного винаходу містила нуклеотидну послідовність, кодує малат-

дегідрогеназу, яка б на щонайменше 70, переважно на щонайменше 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98 або 99% була ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 9.

У ще одному переважному варіанті здійснення генетично модифіковані дріжджі в способі відповідно до даного винаходу містять нуклеотидну послідовність, що кодує білок-носії дикарбонової кислоти, переважно білок-носії малеїнової кислоти (MAE). Білок-носії дикарбонової кислоти може бути гомологічним або гетерологічним білком. Переважно білок-носії дикарбонової кислоти є гетерологічним білком. Білок-носії дикарбонової кислоти може бути отриманий з будь-якого відповідного організму, переважно з *Schizosaccharomyces pombe*. Білком-носієм дикарбонової кислоти переважно є білок-носії малеїнової кислоти (MAE), послідовність якого на щонайменше 80, 85, 90, 95 або 99% або на 100% ідентична послідовності SEQ ID NO: 10.

Використовуваними в способі відповідно до даного винаходу дріжджами є генетично модифіковані дріжджі, що містять гетерологічну PEP-карбоксикіназу, гетерологічну NAD(P)H-залежну фумарат-редуктазу, гетерологічну фумаразу, гетерологічний білок-носії малеїнової кислоти і цитозольну малат-дегідрогеназу. Переважні варіанти здійснення цих ферментів є такими, як описано вище.

Ідентичність послідовності визначається в заявці як співвідношення між двома або більш амінокислотними (поліпептидними або білковими) послідовностями або двома або більш нуклеїновокислотними (полінуклеотидними) послідовностями, що визначається шляхом порівняння цих послідовностей. Зазвичай ідентичності послідовностей або подібності між послідовностями порівнюються по всій довжині порівнюваних послідовностей. У галузі, до якої належить винахід, «ідентичність» означає також, залежно від конкретного випадку, ступінь пов'язаності між амінокислотною і нуклеїновокислотною послідовностями, яка визначається відповідністю між ланцюжками цих послідовностей.

Переважні методи визначення ідентичності передбачають знаходження найбільшої відповідності між випробовуваними послідовностями. Методи визначення ідентичності і подібності кодифікують в наявних у вільному доступі комп'ютерних програмах. Переважні методи визначення ідентичності і подібності між двома послідовностями, закладені в комп'ютерних програмах, включають BLASTP і BLASTN, вільний доступ до яких надають NCBI та інші джерела (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894). Переважними параметрами для порівняння амінокислотних послідовностей з використанням BLASTP є gap open 11.0, gap extend 1, Blosum 62 matrix.

Використовуваний в заявці вираз «нуклеїнова кислота» включає дезоксирибонуклеотидний або рибонуклеотидний полімер, тобто полінуклеотид, або в одно-, або в двоспиральній формі, і, якщо не обумовлені обмеження, охоплює відомі аналоги, що володіють невід'ємною властивістю природних нуклеотидів, тобто здатні гібридизуватися з односпиральними нуклеїновими кислотами аналогічним чином, як це відбувається з природними нуклеотидами (наприклад, з пептидо-нуклеїновими кислотами). Полінуклеотид може бути повнорозмірним або підпослідовністю нативного або гетерологічного структурного або регуляторного гена. Якщо не обумовлене інше, вказаний вище вираз включає як вказану послідовність, так і комплементарну їй послідовність.

У одному з переважних варіантів здійснення дріжджі в способі відповідно до даного винаходу надекспресують нуклеотидні послідовності, що кодують який-небудь з названих вище ферментів. У техніці, що відноситься до винаходу, є різні засоби для надекспресії нуклеотидних послідовностей, що кодують ферменти в дріжджах в способі винаходу. Зокрема, нуклеотидна послідовність, що кодує який-небудь фермент, може бути надекспресована шляхом збільшення кількості копій гена, що кодує цей фермент в клітині, наприклад, шляхом інтеграції додаткових копій гена в геномі клітини, експресії гена з центромірного вектора, з епісомального мультікопійного вектора експресії або шляхом введення (епісомального) вектора експресії, який містить безліч копій гена. Надекспресія ферменту відповідно до винаходу переважно досягається за допомогою (сильного) конститутивного промотору.

Вуглеводмісним субстратом може бути будь-який вуглеводмісний субстрат, включаючи мелясу, сік цукрового очерету, пентози і гексози, такі як глюкоза, фруктоза, ксилоза, арабіноза. Переважним вуглеводмісним субстратом є субстрат, що містить глюкозу, такий як мальтоза, сахароза, глюкоза або глюкозний сироп. Вміст вуглеводу в вуглеводмісному субстраті переважно більше 50 ваг. %, переважніше більше 55, 60, 65, 70, 75, 80 ваг. % і, найпреважніше, більше 85, 90, 95 або 99 ваг. % з розрахунку на суху вагу.

Спосіб відповідно до даного винаходу переважно включає ферментацію дріжджів в обмежених по вуглецю (C) умовах. Обмежені по вуглецю умови визначаються в заявці як концентрація розчиненого вуглеводу нижча за 1 г/л, переважно нижче за 0,9 г/л або нижче за

0,5 г/л розчиненого вуглеводу. Було встановлено, що ферментація дріжджів в обмежених по вуглецю умовах дає підвищений вихід бурштинової кислоти в порівнянні з необмеженими по вуглецю умовами.

Необхідний для ферментації кисень може подаватися в будь-якій відповідній формі. У одному з варіантів здійснення кисень подається у вигляді повітря. Кисень слід подавати в невеликих кількостях. Це відбивається в швидкості споживання кисню (ШСК) і/або в питомій швидкості споживання кисню (qO_2) дріжджами. ШСК в даному винаході нижче приблизно 8,0 ммоль кисню/л/год, переважно нижче приблизно 5,0, 4,0, 3,0 або 2,0 ммоль кисню/л/год, переважніше нижче приблизно 0,1 або 0,5 ммоль кисню/л/год і при цьому переважно більше 0,01 ммоль кисню/л/год.

Питома швидкість споживання кисню (qO_2) в способі винаходу лежить в межах від 8 до 0,5 ммоль кисню/г сухої біомаси/год, переважно від 5, 4, 3 або 2 до приблизно 0,4, 0,3 або 0,2 ммоль кисню/г біомаси/год.

Спосіб відповідно до даного винаходу може здійснюватися в періодичному, поповнюваному періодичному або безперервному режимі. Ці режими ферментації відомі фахівцям в даній галузі. Залежно від режиму ферментації концентрація біомаси під час ферментації може більшою чи меншою мірою варіювати. При періодичному і поповнюваному періодичному режимі концентрація біомаси зазвичай підвищується. Внаслідок цього питома швидкість споживання кисню при періодичному і поповнюваному періодичному режимі зазвичай падає.

Температура способу звичайно складає від 10 до 40°C, переважно від 20 до 35°C і, переважніше, від 30 до 35°C.

В одному з варіантів здійснення способу відповідно до даного винаходу разом з вуглеводвмісним субстратом присутній додатковий донор електрона. Додатковим донором електрона переважно є органічний донор електрона. Відповідні приклади органічних донорів електрона включають гліцерин, форміат і поліюли такі як маніт, сорбіт і ксиліт.

Короткий опис фігур

Фіг.1 Вплив застосованої ШСК на продукцію бурштинової кислоти після 90 год при pH 3.

Приклади

Приклад 1. Отримання бурштинової кислоти за допомогою *Saccharomyces cerevisiae*

1.1. Конструювання дріжджового штаму

1.1.1. Конструювання експресуючих конструкцій

Експресуюча конструкція pGBS414PPK-3 була створена після рестрикції вектора експресії prs414 у *S. Cerevisiae* (Sirkoski R.s. and Hieter P, Genetics, 1989, 122(1):19-27) за допомогою BamHI/NotI і подальшого лігандування в цьому векторі фрагмента BamHI/NotI-рестрикції, який складається з синтетичної генної конструкції для фосфоенолпіруват-карбоксикінази (походження: *Actinobacillus succinogenes*) (SEQ ID NO: 1). Отримана в результаті лігандування суміш була використана для трансформації клітин *E.coli* TOP10 (Invitrogen) з утворенням дріжджової експресуючої конструкції pGBS414PPK-1. Далі pGBK414PPK-1 була піддана рестрикції за допомогою AscI і NotI. Щоб створити pGBS414PPK-3, фрагмент AscI/NotI-рестрикції, що складається з синтетичної генної конструкції (SEQ ID NO: 2) для глікосомальної фумарат-редуктази (з *T. brucei* (FRDg)), був лігандований з утворенням підданого рестрикції вектора pGBS414PPK-1. Отримана в результаті лігандування суміш була використана для трансформації клітин *E.coli* TOP10 (Invitrogen) з утворенням дріжджової експресуючої конструкції pGBS414PPK-3.

Експресуюча конструкція pGBS415FUM-3 була створена після рестрикції вектора експресії pRS415 у *S. Cerevisiae* (Sirkoski R.s. and Hieter P, Genetics, 1989, 122(1):19-27) за допомогою BamHI/NotI і подальшого лігандування в цьому векторі фрагмента BamHI/NotI-рестрикції, що складається з синтетичної генної конструкції для фумарази (походження: *Rhizopus oryzae*) (SEQ ID NO: 3). Отримана в результаті лігандування суміш була використана для трансформації клітин *E.coli* TOP10 (Invitrogen) з утворенням дріжджової експресуючої конструкції pGBS415FUM-1. Далі pGBK415FUM-1 була піддана рестрикції за допомогою AscI і NotI. Щоб створити pGBS415FUM-3, фрагмент AscI/NotI-рестрикції, що складається з синтетичної генної конструкції (SEQ ID NO: 4) для пероксисомальної малат-дегідрогенази з *S. cerevisiae* (MDH3), був лігандований з утворенням підданого рестрикції вектора pGBS415FUM-1. Отримана в результаті лігандування суміш була використана для трансформації клітин *E.coli* TOP10 (Invitrogen) з утворенням дріжджової експресуючої конструкції pGBS415FUM-3.

Експресуюча конструкція pGBS416MAE-1 була створена після рестрикції вектора експресії pRS416 у *S. Cerevisiae* (Sirkoski R.s. and Hieter P, Genetics, 1989, 122(1):19-27) за допомогою BamHI/NotI і подальшого лігандування в цьому векторі фрагмента BamHI/NotI-рестрикції, що складається з синтетичної генної конструкції (SEQ ID NO: 5) для носія малеїнової кислоти з

Schizosaccharomyces pombe.). Отримана в результаті лігандування суміш була використана для трансформації клітин E.coli TOP10 (Invitrogen) з утворенням дріжджової експресуючої конструкції pGBS416MAE-1.

1.1.2. Конструювання штаму S. cerevisiae

Плазміді pGBS414PPK-3, pGBS415FUM-3 та pGBS416MAE-1 (описані в пункті 1.1.) були трансформовані за допомогою електропорації в штамі RWB064 виду S. cerevisiae (MATA ura3-52 leu2-112 trp1-289 adh1::lox adh2::lox gpdl::Kanlox) з метою створення штаму SUC-200, надекспресуючого РСКa, MDH3, FUMR, FRDg і SpMAE1. Всі гени були оптимізовані по кодонових парах для експресії S. cerevisiae згідно WO2008/000632.

1.2. S. cerevisiae, що продукує бурштинову кислоту при низькому рН і обмежених по кисню умовах

Дріжджевий штам SUC-200 (MATA ura3-52 leu2-112 trp1-289 adh1::lox adh2::lox gpdl::Kanlox, надекспресуючий РСКa, MDH3, FUMR, FRDg і SpMAE1) культивували в струшуваній колбі (2 × 300 мл) протягом 3 діб при 30°C і 229 об/хв. Як базове середовище була використана Verduyn (Verduyn et. al., 1992, Yeast 8, 501-517), яку модифікували джерелами вуглецю і азоту, як показано в таблиці 1.

Таблиця 1

Склад середовища перед культивуванням в струшуваній колбі

Сполука	Концентрація (г/л)
$C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$	20,0
$(NH_2)_2CO$	2,3
KH_2PO_4	3,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5
	1
	1

^a Вітамінний розчин

Компонент	Формула	Концентрація (г/кг)
Біотин (D-)	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	0,05
Ca D(+) пантотенат	$C_{18}H_{32}CaN_2O_{10}$	1,00
Нікотинова кислота	$C_6H_5NO_2$	1,00
Міоїнозит	$C_6H_{12}O_6$	25,00
Тиамінхлорид-гідрохлорид	$C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS \cdot xH_2O$	1,00
Піридоксил гідрохлорид	$C_8H_{12}ClNO_3$	1,00
п-амінобензойна кислота	$C_7H_7NO_2$	0,20

^b Розчин мікроелементів

Формула	Концентрація (г/кг)
$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$ (EDTA)	15,00
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	4,50
$MnCl_2 \cdot 2H_2O$	0,84
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,30
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,30
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,40
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,50
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	3,00
H_3BO_3	1,00
KI	0,10

Вслід за цим вміст струшуваних колб був перенесений в 10-л ферментор (початкова вага 6 кг), в якому знаходилося наступне середовище:

Таблиця 2

Вихідний матеріал	Формула	Концентрація (г/л)
Сульфат амонію	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,5
Однозаміщений фосфат калію	KH_2PO_4	3,0
Сульфат магнію	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
Розчин мікроелементів		1
Вітамінний розчин		1

5 рН контролювали на рівні 3,0 додаванням б.н. КОН. Температуру контролювали на рівні 30 °С. Концентрацію глюкози обмежували (< 1 г/л) шляхом регулювання додавання сировини у ферментор. При ферментації застосовували різні швидкості споживання кисню (ШСК), що давало обмеження по кисню (Фіг.1). Застосовували загальну швидкість потоку 0,33 об/об середовища, включаючи 10% CO_2 , які забезпечують достатню кількість CO_2 для ефективної

10 продукції бурштинової кислоти.
Результати з різними ШСК, що застосовуються при виробництві бурштинової кислоти, показані на Фіг.1. Для підтримки стійкої продукції при рН 3 був необхідний мінімальний об'єм аерації. При ШСК вище 5 ммоль/л/год продукція бурштинової кислоти була нижчою.

15 При культивуванні протягом 90 год для типової концентрації біомаси мав місце приріст рівний 8 г сухої ваги на 1 л. Відповідним чином, в процесі ферментації безперервно знижувалася питома швидкість споживання кисню ($q\text{O}_2$). У одній з ферментацій застосовували ШСК рівну 10 ммоль/л/год, при якій $q\text{O}_2$ падала від 10 до 1,25 ммоль/г сухої біомаси/год, і ШСК рівну 1 ммоль/л/год, при якій $q\text{O}_2$ падала від 1 до 0,1 ммоль/г сухої біомаси/год.

20 ФОРМУЛА ВІНАХОДУ

1. Спосіб одержання дикарбонових кислот, який включає ферментацію дріжджів у присутності вуглеводмісних субстратів і малих кількостей кисню при значенні рН нижче найнижчого pK_a дикарбонової кислоти, в якому кисень подається при питомій швидкості споживання кисню від 8

25 до 0,2 ммоль/г сухої біомаси/год.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що дикарбоною кислотою є фумарова кислота, малеїнова кислота або бурштинова кислота.

3. Спосіб за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що рН лежить в межах від 1,0 до 5,5.

4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що включає ферментацію дріжджів в

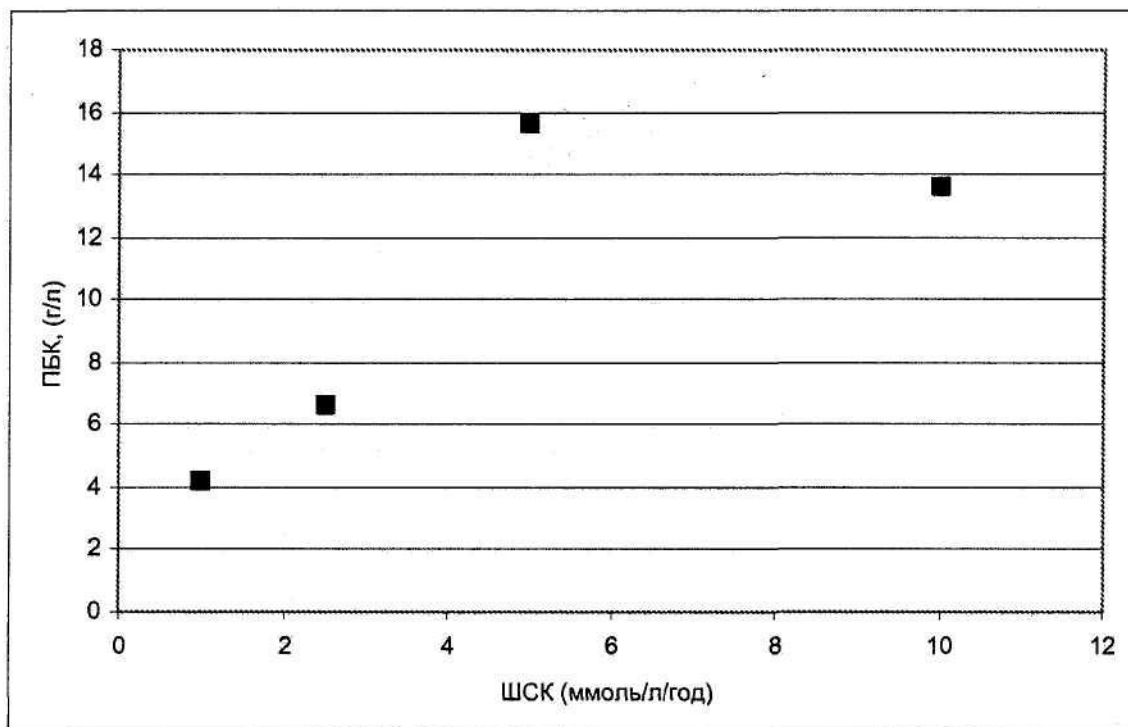
30 обмежених по вуглецю умовах.

5. Спосіб за будь-яким з пп. 1-4 який **відрізняється** тим, що він відбувається у присутності додаткового донора електрона.

6. Спосіб за будь-яким з пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що дріжджі належать до виду *Saccharomyces cerevisiae*.

35 7. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що дріжджами є генетично модифіковані дріжджі.

8. Спосіб за п. 7, який **відрізняється** тим, що генетично модифіковані дріжджі містять нуклеотидну послідовність, що кодує гетерологічний фермент, вибраний з групи, що складається з фосфоенолпіруваткарбоксикінази, фумаратредуктази і фумарази.



Фіг.1

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

- <110> ДСМ АйПі АСЕТС Б.В.
ЯНСЕН, Міхель,
ВЕРВАЛ, Рене
- <120> ОДЕРЖАННЯ ДИКАРБОНОВИХ КИСЛОТ ПРИ НИЗЬКИХ РН
- <130> 26725-WO-РСТ
- <160> 10
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 3148
<212> ДНК
<213> Штучна Послідовність
- <220>
<223> Синтетично сконструйований TDH1p-РСКa-TDH1t
для експресії у *S.cerevisiae*
- <400> 1
ggatcccttc ccttttacag tgcttcggaa aagcacagcg ttgtccaagg gaacaatttt 60
tcttcaagtt aatgcataag aaatatcttt ttttatgttt agctaagtaa aagcagottg 120
gagtaaaaaa aaaaatgagt aaatttctcg atggattagt ttctcacagg taacataaca 180
aaaaaccaaga aaagcccgct tctgaaaact acagttgact tgtatgctaa agggccagac 240
taatgggagg agaaaaagaa acgaatgtat atgctcattt aactctata tcaccatatg 300
gaggataagt tgggctgagc ttctgatcca atttattota tccattagtt gctgatatgt 360
cccaccagcc aacacttgat agtatctact cgccattcac ttccagcagc gccagtaggg 420
ttgttgagct tagtaaaaat gtgcgcacca caagcctaca tgactccacg tcacatgaaa 480
ccacaccgtg gggccttggt gcgctaggaa taggatatgc gacgaagacg cttctgctta 540
gtaaccacac cacattttca gggggtcgat ctgcttgctt cctttactgt cagagcggc 600
ccataatgcg gctttttttt taaaaggcgc gagacagcaa acaggaagct cgggtttcaa 660
ccttcggagt ggtcgagat ctggagactg gatctttaca atacagtaag gcaagccacc 720
atctgcttct taggtgcatg cgacggtatc cacgtgcaga acaacatagt ctgaagaagg 780
gggggaggag catgttcatt ctctgtagca gtaagagctt ggtgataatg accaaaaactg 840
gagtctcgaa atcatataaa tagacaatat attttcacac aatgagattt gtagtacagt 900
tctattctct ctcttgcata aataagaaat tcatcaagaa cttgggttga tatttcacca 960
acacacacaa aaaacagtac ttactaaat ttacacacaa aacaaaatga ccgatttgaa 1020

ccaattgact caagaattgg gtgctttggg tattcacgat gtccaagaag ttgtctacaa	1080
cccatottac gaattgttgt ttgctgaaga aaccaagcca ggtttggaag gttacgaaaa	1140
gggtactgtt accaaccaag gtgctgttgc tgtcaacacc ggatatctca cgggtcgttc	1200
tccaaaggac aaatacattg tcttgatga caagaccaag gacactgtct ggtggacttc	1260
tgaaaaggtc aagaacgaca acaaaccaat gtccaagac acttggaact ctttaaaggg	1320
tttagtcgct gaccaattgt ctggaagag attattcggt gtgatgctt tctgtggtgc	1380
caacaaggac accagattag ctgtcagagt tgtcactgaa gttgcttggc aagctcaact	1440
cgttaccaac atgttcacga gaccatctgc tgaagaattg aaaggtttca agccagattt	1500
cgttgtcatg aacggtgcca aatgtacca cccaaactgg aaggaacaag gtttgaactc	1560
tgaaaacttt gttgctttca acatcactga aggtgttcaa ttgattggtg gtacctggta	1620
cgggtggtgaa atgaagaagg gtatgttctc catgatgaac tacttcttgc cattgagagg	1680
tattgcttcc atgcaactgt ctgccaatgt cggtaaggac ggtgacactg ccatcttctt	1740
cggctctatcc ggtaccggta agaccacttt gtccactgac ccaaagagac aattgattgg	1800
tgatgacgaa cacggttggg atgaagaagg tgttttcaac tttgaagggt gttgttacgc	1860
caagaccatc aacttatctg ctgaaaatga accagatatc taagggtcca tcaagcgtga	1920
cgtctctattg gaaaacgttg ttgttttggc caatgggtgac gtgattatg ctgacggttc	1980
caagactgaa aacaccagag ttctttacc cactctacat attcaaaaaca ttgtcaagcc	2040
agtttccaag gctggtccag ctaccaaaat tatcttcttg totgctgatg ctttcgggtg	2100
tttgctctct gtttccaagt tgactccaga acaaaccaag tactacttct tgtctggttt	2160
cacgcgaag ttggttggtg ctgaaagagg tatcaactgaa ccaactcaa ctttctctgc	2220
ttgtttcggg gctgcctttt tgtctttgca cccaactcaa tacgctgaag ttttgggtcaa	2280
gagaatgcaa gaatctggtg ctgaagctta cttgggtcaac actgggttga acggtaccgg	2340
taagagaatc tccatcaaag ataccagagg tatcatogat gccatcttgg atggttccat	2400
tgacaaggct gaaatgggtt ctttgccaat tttcgatttc tccattcaa aggtcttgcc	2460
aggtgtcaac ccagccatct tagaccaag agacacctac gctgacaaaag ctcaatggga	2520
agaaaaggct caagacttgg ctggttagatt cgtcaagaac ttcgaaaaat aactggttac	2580
tgctgaaggc caagctttgg ttgctgctgg tccaaaggcc taaggcccg gcataaagca	2640
atcttgatga ggataatgat ttttttttga atatacataa atactaccgt ttttctgcta	2700

gattttgtga agacgtaaat aagtacatat tactttttaa gccaagacaa gattaagcat 2760
 taactttacc cttttctott ctaagtttca atactagtta tcaactgttta aaagttatgg 2820
 cgagaacgtc ggcggttaaa atatattacc ctgaacgtgg tgaattgaag ttctaggatg 2880
 gtttaaagat ttttcctttt tgggaaataa gtaaacataa tattgctgcc ttgcaaaac 2940
 gcacataccc acaatatgtg actattggca aagaacgcac tatcctttga agaggtggat 3000
 actgatacta agagagtctc tattccggct ccacttttag tccagagatt acttgtcttc 3060
 ttacgtatca gaacaagaaa gcatttccaa agtaattgca ttgcccctg agcagtatat 3120
 atatactaag aaggcgcgcc gcggccgc 3148

<210> 2
 <211> 4959
 <212> ДНК
 <213> Штучна Послідовність

 <220>
 <223> Синтетично сконструйований TDH1p-FRDg-TDH3t
 для експресії у *S.cerevisiae*

<400> 2
 ggatccggcg cgccctatctc tcgaggacct tgtcaccttg agcccaagag agccaagatt 60
 taaattttcc tatgaattga tgcaaattcc caaagctaata aacatgcaag acaogtacgg 120
 tcaagaagac atatttgacc tottaacagg ttcagacgcg actgcctcat cagtaagacc 180
 cgttgaaaag aacttacctg aaaaaaacga atatatacta gcgttgaatg tttagcgtcaa 240
 caacaagaag tttaatgacg cggaggccaa ggcaaaaaga ttccttgatt acgtaaggga 300
 gttagaatca ttttgaataa aaaacacgct ttttcagttc gagtttatca ttatcaatac 360
 tgccatttca aagaatacgt aaataattaa tagtagtgat tttcctaact ttatttagtc 420
 aaaaaattag ccttttaatt ctgctgtaac ccgtacatgc ccaaaatagg gggcggtta 480
 cacagaatat ataacatcgt aggtgtctgg gtgaacagtt tattcctggc atccactaaa 540
 tataatggag ccgcgttttt aagctggcat ccagaaaaaa aaagaatccc agcaccaaaa 600
 tattgttttc ttcaccaacc atcagttcat aggtccatc tcttagcgca actacagaga 660
 acaggggcac aaacaggcaa aaaacgggca caacctcaat ggagtgatgc aacctgcctg 720
 gagtaaatga tgacacaagg caattgaccc acgcatgtat ctatctcatt ttcttacacc 780
 ttctattacc ttctgctctc tctgatttgg aaaaagctga aaaaaagggt tgaaaccagt 840
 tccctgaaat tattcccta cttgactaat aagtatataa agacggtagg tattgattgt 900

aattctgtaa atctatttct taaacttctt aaattctact tttatagtta gtcttttttt	960
tagtttttaa acaccaagaa cttagtctcg aataaacaca cataaacaaa caaaatgggt	1020
gatggtagat cttctgcttc cattgttgcc gttgaccag aaagagctgc cagagaaaga	1080
gatgctgctg ccagagcttt gttgcaagac tctccattgc acaccacat gcaatacgt	1140
acctctgggt tgggaattgac tgttcatac gctttgaagg ttgttgcttc tgotgacact	1200
ttcgacagag ccaaggaagt tgctgatgaa gtcttgagat gtgcctggca attggctgac	1260
accgttttga actctttcaa cccaaactct gaagtctctt tagtcggtag attaccagtc	1320
ggcmetaagc atcaaatgtc tgctccattg aaactgtgca tggcttggtg tcaaagagtc	1380
tacaactcct ctgctgggtg tttcgaccca tccactgctc cagttgcaa ggctttgaga	1440
gaaattgctt tgggtaagga aagaaacaat gcttggttg aagctttgac tcaagcttgt	1500
accttgcaa actctttcgt cattgatttc gaagctggta ctatctccag aaagcacgaa	1560
cacgtctctt tggatttggg tgggtgttcc aagggttaca tcgtcgatta cgtcattgac	1620
aacatcaatg ctgctgggtt ccaaaactgt ttctttgact ggggtgggta ctgctgctgc	1680
tccggtatga acgccagaaa cactccatgg gttgtcggta tccactagacc tcttctcttg	1740
gacatgttgc caaacctcc aaaggaagct tcttacatct cgtcatctc tttggacaat	1800
gaagcttttg ctacctctgg tgattacgaa aacttgatct aactgctga cgataaacca	1860
ttgacctgta cctacgattg gaaaggtaag gaattgatga agccatctca atccaatato	1920
gctcaagttt ccgtcaagtg ttactctgcc atgtacgctg acgttttggc tacogcttgt	1980
ttcatcaagc gtgaccagc caaggctaga caattgttg atggttgag atacgttaga	2040
gacacgtgca gagattaccg tgtctacgtc agagaaaacg aaagagttgc caagatgttc	2100
gaaattgcca ctgaagatgc tgaatgaga aagagaagaa tttccaacac tttaccagct	2160
cgtgctattg ttgttggtgg tgggttggtt ggtttgtccg ctgccattga agctgctgg	2220
tgtggtgctc aagttgtttt gatggaaaag gaagccaagt tgggtggtaa ctctgccaag	2280
gctacctctg gtatcaacgg ttgggtact agagctcaag ctaaggcttc cattgtcgat	2340
ggtggtaagt acttcgaaag agatacctac aagtctggta tcggtggtaa caccgatcca	2400
gctttgggta agactttgtc catgaaatct gctgacgcta tcggttggtt gacttctcta	2460
ggtgttccat tgactgtttt gtcccaatta ggtggtcact ccagaaagag aactcacaga	2520
gctccagaca agaaggatgg tactccattg ccaattgggt tcaccatcat gaaaacttta	2580
gaagatcatg ttagaggtaa cttgtcgggt agaataccca tcatggaaaa ctgttcggtt	2640

acctctttgt tgtctgaaac caaggaaaga ccagacggta ccaagcaaat cagagttacc	2700
gggtgtgaat tcaactcaagc tggttctggg aagaccacca ttttggctga tgctgttacc	2760
ttggccaccg gtggtttctc caacgacaag actgctgatt ctttgttgag agaacatgcc	2820
ccacacttgg ttaacttccc aaccaccaac ggtccatggg ctactggtga tgggtgtcaag	2880
ttggctcaaa gattaggtgc tcaattgggc gatatggaca aggttcaatt gcacccaact	2940
ggtttgatca acccaaagga ccagccaac ccaaccaaat tcttgggtcc agaagctcta	3000
agaggttctg gtggtgtttt gttgaacaaa caaggtaaga gatttgtcaa cgaattggat	3060
ttgagatctg ttgtttccaa ggccatcatg gaacaagggt ctgaataccc aggttctggg	3120
ggttccatgt ttgcttactg tgtcttgaac gctgctgctc aaaaattggt tgggtgtttcc	3180
tctcacgaat tctactggaa gaagatgggt ttgttcgtca aggtgacac catgagagac	3240
ttggctgctt tgattgggtg tccagttgaa tccgttcaac aaactttaga agaatacgaa	3300
agattatcca tctctcaaag atcttgtcca attaccagaa aatctgttta cccatgtgtt	3360
ttgggtacca aagggtccata ctatgtcgcc tttgtcactc catctatcca ctacaccatg	3420
gggtggttgt ttgatttctc atctgtgaa atccaaatga agaacacttc ttccagagct	3480
ccattgtccc actccaaccc aatcttgggt ttattcgggt ctggtgaagt caccgggtgt	3540
gtccacgggt gtaacagatt aggtggtaac tctttgttgg aatgtgttgt ttccggtaga	3600
attgccgggt acagagcttc taccattttg caaagaaagt cctctgcttt gtctttcaag	3660
gtctggacca ctgttgtttt gagagaagtc agagaagggt gtgtctacgg tgcgtgttcc	3720
cgtgtcttga gattcaactt accaggtgct ctacaaagat ctggtctatc cttgggtcaa	3780
ttcattgcca tcagaggtga ctgggaagggt caacaattga ttggttacta ctctccaatc	3840
actttgccag acgatttggg tatgattgac attttggcca gatctgacaa gggacttta	3900
cgtgaatgga tctctgcttt ggaaccagggt gacgctgtcg aaatgaaggc ttgtgggtgt	3960
ttggtcatcg aaagaagatt atctgacaag cacttcgttt tcatgggtca cattatcaac	4020
aagctatggt tgattgctgg tggtagcggg gttgctcaa tggtgcaaat catcaaggcc	4080
gctttcatga agccattcat cgacactttg gaatccgtcc acttgatcta cgctgctgaa	4140
gatgtcactg aattgactta cagagaaggt ttggaagaac gtcgtctgta atccagaggt	4200
aaattcaaga aaactttcgt tttgaacaga cctctccat tatggactga cgggtgtcgg	4260
ttcatcgacc gtggtatctt gaccaaccac gttcaaccac catctgacaa cttattgggt	4320

```

gccatctgtg gtccaccagt tatgcaaaga attgtcaagg ccactttaaa gacttttaggt 4380
tacaacatga acttggtcag aaccgttgac gaaactgaac catctggaag ttaaggcccg 4440
ggcgtgaatt tactttaaat ctgtcattta aataaatttt ctttttatag ctttatgact 4500
tagtttcaat ttatatacta ttttaatgac attttcgatt cattgattga aagctttgtg 4560
ttttttcttg atgcgctatt gcattgttct tgtctttttc gccacatgta atatctgtag 4620
tagatacctg atacattgtg gatgctgagt gaaatttttag ttaataatgg aggcgctctt 4680
aataattttg gggatattgg cttttttttt taaagtttac aaatgaattt ttccgccag 4740
gataacgatt ctgaagttac tottagcggt cctatcggt cagccatcaa atcatgccta 4800
taaatacatgc ctatatttgc gtgcagtcag tatcatctac atgaaaaaaa ctcccgcaat 4860
ttcttataga atacgttgaa aattaaatgt acgcgccaag ataagataac atatatctag 4920
atgcagtaat atacacagat tccggccggc cgcggccgc 4959

```

```

<210> 3
<211> 2950
<212> ДНК
<213> Штучна Послідовність

```

```

<220>
<223> Синтетично сконструйований TDH1p-FUMR-TDH1t
      для експресії у S.cerevisiae

```

```

<400> 3
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 atgotcattt aactctata tcaccatatg 300
gaggataagt tgggctgagc ttctgatoca atttattcta tccattagtt gctgatatgt 360
cccaccagcc aacacttgat agtatctact cgccattcac ttccagcagc gccagtaggg 420
ttgttgagct tagtaaaaat gtgcgcacca caagcctaca tgactccacg tcacatgaaa 480
ccacaccgtg gggccttggt gcgctaggaa taggatatgc gacgaagacg cttctgctta 540
gtaaccacac cacattttca gggggtcgat ctgcttgett cctttactgt cagcagcggc 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 gtaagagott ggtgataatg accaaaaactg	840
gagtctcgaa atcatataaa tagacaatat attttcacac aatgagattt gtagtacagt	900
tctattctct ctcttgcata aataagaaat tcatcaagaa cttggtttga tatttcacca	960
acacacacaa aaaacagtac ttcaactaaat ttacacacaa aacaaaatgt cctctgcttc	1020
tgctgctttg caaaaattca gagctgaaag agataccttc ggtgacttgc aagttccagc	1080
tgacggttac tggggtgctc aaactcaaag atctttgcaa aactttgaca ttggtgggtcc	1140
aactgaaaga atgccagaac cattaatcag agctttoggt gttttgaaga aggctgctgc	1200
cacgtcaac atgacctacg gtttggaacc aaaggttggt gaagccatcc aaaagggtgc	1260
tgacgaagtt atcgatggtt ctttgattga ccatttocca ttggttgtct ggcaaacggg	1320
ttctgggtact caaaccaaga tgaacgtcaa tgaagtcac tccaacagag ccattgaatt	1380
gttgggtggt gaattaggtt ccaaggctcc agtccacca aacgatcatg tcaacatgtc	1440
tcaatcttcc aacgacactt tcccaactgc catgcaagtt gctgccgttg ttgaaattca	1500
cggtagattg attccagctt tgaccacttt gagagatgct ttgcaagcca aatctgctga	1560
attcgaacac atcatcaaga ttggtagaac ccacttgcaa gatgctacc cattgacttt	1620
aggtaagaa ttctcgggtt aactcaaca attgacctac ggtattgctc gtgttcaagg	1680
tactttggaa agattataca acttggtcga aggtgggtact gctgtcggta ctggtttgaa	1740
caccagaaaag ggtttcgatg ccaagggtgc tgaagccatt gcttccatca ctggtttacc	1800
attcaagacc gctccaaaca aattcgaagc tttggctgct cactgacgtt tgggtgaagc	1860
tcacggtgct ttgaacaccg ttgcttgctc tttgatgaag attgccaacg atatccgtta	1920
cttgggttct ggtccaagat gtggtttagg tgaattgtct ctaccagaaa acgaaccagg	1980
ttcttccatc atgccaggta aggtcaaccc aactcaatgt gaagctatga ccatgggttg	2040
tgctcaagtc atgggtaaca aactgccat ctctgttgct ggttccaacg gtcaattcga	2100
attgaatgtc tttaaaccag tcatgatcaa gaacttgatc caatccatca gattaatctc	2160
tgacgcttcc atctctttca ccaagaactg tgttgcgggt attgaagcta acgaaaagaa	2220
gatctectcc atcatgaacg aatctttgat gttgggtcact gctttgaacc ctacatttg	2280
ttacgacaag gctgccaagt gtgccaagaa ggctcacaag gaaggtaacca ctttgaaaga	2340
agctgctcta tctttgggtt acttgacctc tgaagaattc gaccaatggg ttagacctga	2400
ggacatgatt tctgccaagg atttaaggcc ggcataaag caatcttgat gaggataatg	2460

atTTTTTTTT gaatatacat aaatactacc gTTTTtctgc tagatTTTgt gaagaCGtaa 2520
 ataagtacat attactTTTT aagccaagac aagattaagc attaactTTa cCCTTTtctc 2580
 ttctaagTTt caatactagt tatcactgTT taaaagTTat ggCGagaacg tCGGCGgTTa 2640
 aaatatatta cCctgaacgt ggtgaattga agTTctagga tggTTtaaag atTTTTcctt 2700
 tttgggaaat aagtaaacaA tatattgctg cCtttgcaaa acgcacatac ccacaatatg 2760
 tgactattgg caaagaacgc attatccttt gaagaggtgg atactgatac taagagagtc 2820
 totattcgg ctccactttt agtccagaga ttacttgtct tcttacgtat cagaacaaga 2880
 aagcatttcc aaagtaattg catttgccct tgagcagtat atatatacta agaaggCGcg 2940
 cCGCGGCGcg 2950

<210> 4
 <211> 1966
 <212> ДНК
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <223> Синтетично сконструйований TDH3p-MDH3-TDH3t
 для експресії у *S.cerevisiae*

<400> 4
 ggatCGggcg CGccacgCgt ggCGggcCtt agtcaaaaaa ttagcCtttt aattctgctg 60
 taaccCGtac atGCCcaaaa tagggggCGg gttacacaga atatataaca tCGtaggtgt 120
 ctgggtgaac agttttattcc tggcatCcac taaatataat ggagccCGct ttttaagctg 180
 gcatccagaa aaaaaaagaa tccCagcacc aaaatattgt tttcttcacc aaccatcagt 240
 tcataggTcc attctcttag CGcaactaca gagaacaggg gcacaaacag gcaaaaaacg 300
 ggcaaacct caatggagtg atgcaacctg cctggagtaa atgatgacac aaggcaattg 360
 acccagcat gtatctatct cattttotta cacttctat taCttctgc tctctctgat 420
 ttgaaaaag ctgaaaaaaa aggttgaaac cagttccctg aaattattcc cctacttgac 480
 taataagtat ataaagacgg taggtattga ttgtaattct gtaaattctat ttcttaaact 540
 tcttaaattc tacttttata gttagtcttt tttttagttt taaaacacca agaacttagt 600
 ttCGaataaa cacacataaa caaacaAaat ggttaaggTT gccatcttag gtgcttctgg 660
 tgggtgctgg caaccattat ctctattatt gaaattgtct ccatacgttt ctgaattggc 720
 tttgtacgat atcagagctg ctgaaggTat tggtaaggat ttgtccaca tcaacaccaa 780
 ctctcttTgt gttggttacg acaaggattc catCGaaaac actttgtcca atgctcaagt 840

```

tgtcttgatt ccagctggtg ttccaagaaa gccaggtttg accagagatg atttgttcaa      900
gatgaacgct ggtatcgta agtctttggt tactgctgtc ggtaaatttg ccccaaacgc      960
tcgtatctta gtcactctca accctgttaa ctctttggtt ccaattgccg ttgaaacttt    1020
gaagaagatg ggtaagttca agccaggtaa cgttatgggt gtcaccaact tggatttggt    1080
cagagctgaa actttcttgg ttgactactt gatgttgaag aacccaaaga tcgggtcaaga    1140
acaagacaag accaccatgc acagaaagggt caccgtcatc ggtggtcact ctggtgaaac    1200
catcattcca atcatcactg acaaatcctt ggttttccaa ttggacaago aatacgaaca    1260
tttcatccac agagtccaat tcggtggtga cgaaattgtc aaggccaago aagggtgccg    1320
ttctgctacc ttgtccatgg ctttcgctgg tgccaaattt gctgaagaag tcttacgttc    1380
tttcacaac gaaaagccag aaactgaatc tttgtctgct ttcgtctact tgccaggttt    1440
gaagaacggt aagaaggctc aacaattagt cggtgacaac tcattgaat acttctcttt    1500
gccaattggt ttgagaaacg gttccgttgt ttccattgac acttctgttt tggaaaaatt    1560
gtctccaaga gaagaacaat tggtaacac tgctgtcaag gaattgagaa agaacattga    1620
aaagggtgag tctttcatct tggacagtta aggtgaattt actttaaatc ttgcatttaa    1680
ataaattttc tttttatagc tttatgactt agtttcaatt tatatactat tttaatgaca    1740
ttttcgatcc attgattgaa agctttgtgt tttttcttga tgcgctattg cattgttctt    1800
gtctttttcg ccacatgtaa tatctgtagt agatacctga tacattgtgg atgctgagtg    1860
aaatttttagt taataatgga ggcgctctta ataattttgg ggatattggc tttttttttt    1920
aaagtttaca aatgaatttt ttccgccagg atgggcccgc ggccgc                    1966

```

<210> 5
 <211> 2240
 <212> ДНК
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <223> Синтетично сконструйований Enolp-SpMAE1-ENOt
 для експресії у *S.cerevisiae*

```

<400> 5
ggatccggcg cgccccgcgg aaccgccaga tattcattac ttgacgcaaa agcgtttgaa      60
ataatgacga aaaagaagga agaaaaaaaa agaaaaatac cgcttctagg cgggttatct    120
actgatccga gcttccacta ggatagcacc caaacacctg cataatttga cgacctttac    180
ttacaccacc aaaaaccact ttgcctctc cgcacctga taacgtcac taattgagcg      240

```

attacctgag cggtcctctt ttgtttgcag catgagactt gcatactgca aatcgtaagt	300
agcaacgtct caagggtcaaa actgtatgga aacctttgtca cctcacttaa ttctagctag	360
cctacocctgc aagtcaagag gtctccgtga ttcttagcca cctcaaggta tgcctctccc	420
cggaaaactgt ggoccttttct ggcacacatg atotccaoga ttccaacata taaatagctt	480
ttgataatgg caatattaat caaatttatt ttacttcttt cttgtaacat ctctcttgta	540
atcccttatt ccttctagct atttttcata aaaaaccaag caactgctta tcaacacaca	600
aacactaaaa caaaatgggt gaattgaagg aaatcttgaa gcaacgttac catgaattgt	660
tggactggaa cgtcaagggt ccacacgttc cattgtctca aagattgaag catttcaoct	720
ggctctgggt tgcttgacc atggccactg gtgggtgcgg ttgatcatt ggttctttcc	780
cattcagatt ctacggtttg aacaccattg gtaagattgt ctacatctta caaatcttct	840
tattctcttt gtttggttct tgtatgttgt toagattcat caaatacca tctaccatca	900
aggactcctg gaaccaccac ttggaaaaat tattcattgc tacctgtttg ctatccatct	960
ccactttcat tgacatgttg gccatctacg cttaccaga cactggtgaa tggatggtct	1020
gggttatcag aatcttatac tacatctacg ttgctgtctc ttcatctac tgtgtcatgg	1080
ctttcttcac cattttcaac aaccacgttt acaccattga aactgcttct ccagcttgga	1140
tcttaccaat ttcccacca atgatctgtg gtgtcattgc tgggtgctgc aactccactc	1200
aaccagctca ccaattgaag aacatgggtta tcttcgggtat cttattccaa ggtttgggtt	1260
tctgggttta cttgttggtg tttgctgtca acgttttgag attcttcacc gttggtttgg	1320
ccaagcctca agacagacca ggtatgttca tgtttgttg tccaccagct ttctccggtt	1380
tggctttgat caacattgcc cgtggtgcta tgggttocag accatacatt ttctgcggtg	1440
ccaattcttc tgaatacttg ggtttcggtt ccactttcat ggocattttc atctgggggtt	1500
tggctgcttg gtgttactgt ttggccatgg tttctttctt ggctgggttc ttcaccagag	1560
ctccattgaa atttgcttgt ggttggtttg ctttcatctt cccaaacgtc ggtttcggtta	1620
actgtaccat tgaaattgggt aagatgattg actccaaggc cttccaaatg ttcggtcaca	1680
tcatcgggtg catcctatgt atccaatgga tcttggtgat gtacttgatg gtcagagctt	1740
tcttggtcaa cgatttggtg taccaggtta aggatgaaga tgctcaccca cctccaaagc	1800
caaacactgg tgttttgaac ccaactttcc caccagaaaa ggctccagct tctttggaaa	1860
aggttgacac ccacgttact tccactgggt gtgaatctga tctccatct tctgaacacg	1920

```

aaagcggtta agagcttttg attaagcctt ctagtccaaa aaacacgttt ttttgcatt 1980
tatttcattt tcttagaata gtttagttta ttcattttat agtcacgaat gttttatgat 2040
tctatatagg gttgcaaaca agcatttttc attttatggt aaaacaattt cagggttacc 2100
ttttattctg cttgtggtga cgcgggtatc cgcgcgtctt tttggtcacc catgtattta 2160
attgcataaa taattcttaa aagtggagct agtctatttc tatttacata cctctcattt 2220
ctcatttctt ccgcggccgc 2240

```

```

<210> 6
<211> 538
<212> ПРТ
<213> Штучна Послідовність

```

```

<220>
<223> Actinobacillus succinogenes phosphoenolpyruvate carboxykinase
      amino acid sequence, with EGY to DAF modification at pos 120 -
      122.

```

```

<400> 6

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

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

355	360	365
Val Ser Lys Leu Thr Pro	Glu Gln Thr Glu Tyr Tyr Phe Leu Ser Gly	
370	375	380
Phe Thr Ala Lys Leu Ala Gly Thr Glu Arg Gly Val Thr Glu Pro Thr		
385	390	395 400
Pro Thr Phe Ser Ala Cys Phe Gly Ala Ala Phe Leu Ser Leu His Pro		
405	410	415
Ile Gln Tyr Ala Asp Val Leu Val Glu Arg Met Lys Ala Ser Gly Ala		
420	425	430
Glu Ala Tyr Leu Val Asn Thr Gly Trp Asn Gly Thr Gly Lys Arg Ile		
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> 7

<211> 1139

<212> ПРТ

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Glycosomal Trypanosoma brucei fumarate reductase (FRDg) amino acid sequence lacking 3 aa C-terminal targeting signal.

<400> 7

```

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

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

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		
	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
 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> 8
<211> 472
<212> ПРТ
<213> Штучна Послідовність

<220>
<223> Rhizopus oryzae fumarase amino acid sequence, lacking the first 23 N-terminal amino acids.

<400> 8

Met Ser Ser Ala Ser Ala Ala Leu Gln Lys Phe Arg Ala Glu Arg Asp
1 5 10 15

Thr Phe Gly Asp Leu Gln Val Pro Ala Asp Arg Tyr Trp Gly Ala Gln
20 25 30

Thr Gln Arg Ser Leu Gln Asn Phe Asp Ile Gly Gly Pro Thr Glu Arg
35 40 45

Met Pro Glu Pro Leu Ile Arg Ala Phe Gly Val Leu Lys Lys Ala Ala
50 55 60

Ala Thr Val Asn Met Thr Tyr Gly Leu Asp Pro Lys Val Gly Glu Ala
65 70 75 80

Ile Gln Lys Ala Ala Asp Glu Val Ile Asp Gly Ser Leu Ile Asp His
85 90 95

Phe Pro Leu Val Val Trp Gln Thr Gly Ser Gly Thr Gln Thr Lys Met
100 105 110

Asn Val Asn Glu Val Ile Ser Asn Arg Ala Ile Glu Leu Leu Gly Gly
115 120 125

Glu Leu Gly Ser Lys Ala Pro Val His Pro Asn Asp His Val Asn Met
130 135 140

Ser Gln Ser Ser Asn Asp Thr Phe Pro Thr Ala Met His Val Ala Ala
145 150 155 160

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

Asp	Ala	Leu	Gln	Ala	Lys	Ser	Ala	Glu	Phe	Glu	His	Ile	Ile	Lys	Ile	180	185	190	
Gly	Arg	Thr	His	Leu	Gln	Asp	Ala	Thr	Pro	Leu	Thr	Leu	Gly	Gln	Glu	195	200	205	
Phe	Ser	Gly	Tyr	Thr	Gln	Gln	Leu	Thr	Tyr	Gly	Ile	Ala	Arg	Val	Gln	210	215	220	
Gly	Thr	Leu	Glu	Arg	Leu	Tyr	Asn	Leu	Ala	Gln	Gly	Gly	Thr	Ala	Val	225	230	235	240
Gly	Thr	Gly	Leu	Asn	Thr	Arg	Lys	Gly	Phe	Asp	Ala	Lys	Val	Ala	Glu	245	250	255	
Ala	Ile	Ala	Ser	Ile	Thr	Gly	Leu	Pro	Phe	Lys	Thr	Ala	Pro	Asn	Lys	260	265	270	
Phe	Glu	Ala	Leu	Ala	Ala	His	Asp	Ala	Leu	Val	Glu	Ala	His	Gly	Ala	275	280	285	
Leu	Asn	Thr	Val	Ala	Cys	Ser	Leu	Met	Lys	Ile	Ala	Asn	Asp	Ile	Arg	290	295	300	
Tyr	Leu	Gly	Ser	Gly	Pro	Arg	Cys	Gly	Leu	Gly	Glu	Leu	Ser	Leu	Pro	305	310	315	320
Glu	Asn	Glu	Pro	Gly	Ser	Ser	Ile	Met	Pro	Gly	Lys	Val	Asn	Pro	Thr	325	330	335	
Gln	Cys	Glu	Ala	Met	Thr	Met	Val	Cys	Ala	Gln	Val	Met	Gly	Asn	Asn	340	345	350	
Thr	Ala	Ile	Ser	Val	Ala	Gly	Ser	Asn	Gly	Gln	Phe	Glu	Leu	Asn	Val	355	360	365	
Phe	Lys	Pro	Val	Met	Ile	Lys	Asn	Leu	Ile	Gln	Ser	Ile	Arg	Leu	Ile	370	375	380	
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> 9

<211> 340

<212> ПРТ

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Saccharomyces cerevisiae peroxisomal malate dehydrogenase (Mdh3)
amino acid sequence, lacking the 3 C-terminal peroxisomal
targeting sequence (SKL).

<400> 9

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

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> 10
<211> 438
<212> PPT
<213> Schizosaccharomyces pombe malate permease amino acid sequence.

<400> 10

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
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

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601