

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 749**

51 Int. Cl.:

C07K 14/32 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2009 E 09165828 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **19.01.2011 EP 2275436**

54 Título: **Fermentación de bacilos moderadamente termofílicos en sacarosa**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.02.2013

73 Titular/es:

**PURAC BIOCHEM BV (100.0%)
Arkelsedijk 46
4206 AC Gorinchem, NL**

72 Inventor/es:

**VAN KRANENBURG, RICHARD y
VAN HARTSKAMP, MARISKA**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 394 749 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

Fermentación de bacilos moderadamente termofílicos en sacarosa

- 5 [0001] La presente invención se refiere a la modificación genética de cepas de *Bacillus* moderadamente termofílicas para proporcionar la capacidad de utilizar sacarosa para cepas de *Bacillus* que originalmente no poseían esta capacidad.
- 10 [0002] Especies de *Bacillus* moderadamente termofílicas, preferiblemente aquellas especies que son facultativas anaeróbicas y homolácticas, son organismos ideales para la producción industrial de ácido láctico.
- 15 [0003] En el contexto de esta invención, especies de *Bacillus* moderadamente termofílicas pueden crecer entre 37 y 65°C y permiten fermentación industrial a temperaturas de más de 50°C. Esta alta temperatura de fermentación tiene diferentes ventajas cuando se fermenta a escala industrial: menos riesgo de infecciones y mayor pureza de producto, reacciones más rápidas, etcétera. Además, los requisitos de nutrientes de estas bacterias son menos exigentes que los de las bacterias del ácido láctico tales como las especies de *Lactobacillus*, que también permiten procesos industriales relativamente poco costosos.
- 20 [0004] Especies de *Bacillus* moderadamente termofílicas incluyen especies aeróbicas y especies facultativas anaeróbicas. El uso de especies facultativas anaeróbicas es preferido, dado que estas especies permiten la fermentación bajo condiciones anaeróbicas, o al menos bajo una baja presión parcial de oxígeno, que es deseable para escala industrial. Tales condiciones evitan la necesidad de aireación costosa y permiten el uso de medios de bajo coste, mientras se minimizan riesgos de contaminación o incluso permitiendo procedimientos de producción no estéril.
- 25 [0005] También se prefiere usar especies de *Bacillus* moderadamente termofílicas que son homolácticas. La naturaleza homoláctica permite la producción de ácido láctico de fuentes de hidrocarburo (incluidos azúcares de hexosa y de pentosa; véase WO 04/063382) sin la formación superior a 15 % en peso de productos laterales tales como ácido fórmico y ácido acético. La modificación genética del fenotipo homoláctico se puede aplicar para convertir cepas homolácticas en cepas de producción homofermentadora para otros productos industriales derivables de piruvato.
- 30 Ejemplos de estos compuestos son piruvato, acetolactato, diacetilo, acetoína, 2,3-butanodiol, 1,2-propanodiol, acetato, formiato, acetaldéido, etanol, L-alanina, oxaloacetato, S-malato, succinato, fumarato, 2-oxoglutarato, oxalosuccinato, isocitrato, citrato, glioxilato.
- 35 [0006] Preferiblemente estas cepas de producción son de esporulación deficiente.
- [0007] Ejemplos de especies de *Bacillus* facultativas anaeróbicas y moderadamente termofílicas son *Bacillus coagulans*, *Bacillus smithii*, *Bacillus termoamylovorans* y *Bacillus thermocloacae*, al menos las primeras dos especies también son homolácticas. Una de las especies preferidas es *Bacillus coagulans*.
- 40 [0008] Es deseable en fermentaciones industriales usar materias primas económicas en los medios de fermentación. Por ejemplo, sacarosa o sustratos con sacarosa son frecuentemente usados como fuentes de carbono de bajo coste para fermentaciones industriales. No obstante, se descubrió que no todas las cepas de *Bacillus* moderadamente termofílicas usadas para fermentaciones industriales poseen la capacidad para utilizar sacarosa como una fuente de carbono. Esta es una desventaja, especialmente si tales cepas han sufrido adaptaciones para mejorar su capacidad de fermentación o potencial producción en una escala industrial. Por ejemplo, cepa de *Bacillus coagulans* DSM 1 resultó ser una fermentadora muy pobre de sacarosa. Crecimiento sólo escaso y formación ácida es observada usando la sacarosa como fuente de carbono única, lo que es probablemente debido a actividad no específica de sistemas para utilización de otros azúcares.
- 45 [0009] En la bibliografía, *B. coagulans* se menciona por ser variable en la capacidad de utilización de sacarosa (De Clerck, E., M. Rodríguez-Díaz, G. Forsyth, L. Lebbe, N. Logan, 2004: Polyphasic characterization of *Bacillus coagulans* strains. Syst. Appl. Microbiol. 27:50-60). No obstante no hay información disponible de genes implicados en el catabolismo de sacarosa y no hay genes anotados para catabolismo de sacarosa en la secuencia de genoma del *B. coagulans* 36D1 (http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/bacco/bacco.home.html).
- 50 [0010] Así, un objeto de la presente invención es modificar genéticamente una cepa de *Bacillus* moderadamente termofílica originalmente incapaz de utilizar sacarosa como una fuente de carbono para proporcionar a la cepa la capacidad para utilizar sacarosa como una fuente de carbono. Otro objeto de la invención es aprovechar un método para producir un compuesto de interés que comprenda el cultivo de una cepa de *Bacillus* moderadamente termofílica en una fuente de carbono conteniendo sacarosa.
- 55 [0011] La presente invención ahora divulga genes y polipéptidos nuevos implicados en el catabolismo de sacarosa y obtenibles de especies de *Bacillus* moderadamente termofílicas, preferiblemente de especies de *Bacillus* anaeróbicas facultativas y moderadamente termofílicas, de la forma más preferible de especies de *Bacillus* anaeróbicas facultativas y moderadamente termofílicas que son homolácticas.
- 60
- 65

5 [0012] Los polipéptidos nuevos sorprendentemente muestran una homología más bien baja para polipéptidos correspondientes de otras especies de *Bacillus*, mientras que una homología más alta se observa con polipéptidos correspondientes a especies de *Lactobacillus*. Los genes y polipéptidos nuevos permiten la introducción de la capacidad de utilización de sacarosa en las cepas de *Bacillus* moderadamente termofílicas que no utilizan sacarosa de las mismas especies (o cercanamente relacionadas) como las especies donde los genes y polipéptidos nuevos son obtenibles. En particular, los genes nuevos permiten la introducción de material genético mediante autoclonación, es decir usando material genético de especies específicas.

10 [0013] Así, en un aspecto de esta invención, se provee un método para la construcción de una cepa de *Bacillus* moderadamente termofílica capaz de utilizar sacarosa como fuente de carbono de una cepa de *Bacillus* progenitora moderadamente termofílica incapaz de utilizar sacarosa como una fuente de carbono.

15 [0014] En particular, la cepa de *Bacillus* moderadamente termofílica capaz de utilizar sacarosa como una fuente de carbono es derivada de una cepa de *Bacillus* progenitora moderadamente termofílica incapaz de utilizar sacarosa como fuente de carbono por transformación de dicha cepa progenitora con un polinucleótido (gen) necesario para conseguir utilizar la sacarosa. Como se describe aquí, este polinucleótido necesario comprende una secuencia de ADN que codifica un polipéptido con actividad de fosfotransferasa específica de sacarosa y teniendo i) una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1 o ii) una secuencia de aminoácidos con una identidad de como mínimo 70%, preferiblemente de como mínimo 75, 80, 85, 90, 95%, de la SEC ID nº 1 y/o con una secuencia de ADN que codifica un polipéptido con actividad de hidrolasa de sacarosa-6-fosfato y teniendo iii) una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2 o iv) una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 70%, preferiblemente de al menos 75, 80, 85, 90, 95%, a la secuencia de SEC ID nº 2.

25 [0015] La introducción del polinucleótido para conseguir utilizar sacarosa en la cepa de *Bacillus* moderadamente termofílica de interés puede hacerse usando cualquier procedimiento de transformación adecuado conocido por el experto en la técnica, incluida la transformación de protoplasto o fusión de protoplasto, electroporación, transformación biolística, conjugación o transformación de células naturales competentes. Por ejemplo, un procedimiento de transformación como se describe en WO 2007/085443, que es incorporado aquí por referencia, puede ser utilizado.

30 [0016] El polinucleótido para alcanzar la utilización de sacarosa puede ser introducido usando un plásmido que se replica de manera autónoma o por integración cromosómica. Éste se prefiere para aplicación industrial, dado que la integración cromosómica es generalmente considerada como más estable y garantiza una distribución estable del polinucleótido sobre las células descendientes. La fermentación de la misma sacarosa puede ser una presión de selección para el mantenimiento del polinucleótido para alcanzar la utilización de sacarosa. La introducción del polinucleótido en el cromosoma puede realizarse por recombinación no homóloga al igual que por homóloga.

40 [0017] La recombinación homóloga es preferida, dado que abre la oportunidad de introducir, eliminar o simultáneamente introducir y eliminar una funcionalidad en/desde el cromosoma bacteriano. Cuando se pretende la recombinación homóloga, el polinucleótido transformante además contiene una secuencia de ADN que es homóloga a una secuencia genómica diana del *Bacillus* específico que va a ser creado genéticamente. Cualquier secuencia genómica diana adecuada se puede seleccionar para este propósito. Secuencias genómicas diana adecuadas están por ejemplo localizadas en una región no codificante del genoma. El experto en la materia entenderá que no se requiere 100% de identidad para obtener recombinación homóloga. Una identidad de un porcentaje de aproximadamente 90% también basta. Generalmente, la secuencia de ADN de interés para ser insertada en el cromosoma por recombinación homóloga se flanquea por secuencias homólogas con una longitud suficiente para permitir recombinación homóloga. Dicha longitud puede ser de al menos aproximadamente 100 pares de bases, por ejemplo entre aproximadamente 200 y aproximadamente 1.500 pares de bases, preferiblemente entre aproximadamente 200 y aproximadamente 1.000 pares de bases.

50 [0018] Para conseguir la expresión del polinucleótido para alcanzar la utilización de sacarosa, la secuencia codificante del polinucleótido está provista de las secuencias reguladoras necesarias. Estas secuencias reguladoras pueden ser las secuencias reguladoras nativas o pueden ser heterólogas a la secuencia codificante en cuestión.

55 [0019] En otro aspecto, se proporcionan polipéptidos nuevos, es decir un polipéptido que tiene actividad de fosfotransferasa específica de sacarosa y un polipéptido que tiene actividad de hidrolasa de sacarosa-6-fosfato. El polipéptido con actividad de fosfotransferasa específica de sacarosa tiene i) una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1 o ii) una secuencia de aminoácidos con una identidad de como mínimo 70%, preferiblemente como mínimo 75%, más preferiblemente como mínimo 80%, incluso más preferiblemente como mínimo 85%, incluso más preferiblemente como mínimo 90%, lo más preferiblemente como mínimo 95%, a la secuencia de SEC ID nº 1. El polipéptido con actividad de sacarosa-6-fosfato hidrolasa tiene i) una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 2 o ii) una secuencia de aminoácidos con una identidad de como mínimo 70%, preferiblemente como mínimo 75%, más preferiblemente como mínimo 80%, incluso más preferiblemente como mínimo 85%, incluso más preferiblemente como mínimo 90%, lo más preferiblemente como mínimo 95%, a la secuencia de SEC ID nº 2.

65 [0020] El polipéptido de fosfotransferasa específica de sacarosa con una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1 comparte homología significativa con componentes de EIIBCA de sistema PTS específico de sacarosa de *Pediococcus*

pentosaceus y *Lactobacillus plantarum* (ambos 62% de identidad a nivel de proteína) y otras bacterias del ácido láctico. Sorprendentemente, la homología con otras especies de *Bacillus* es muy inferior, teniendo máxima identidad con el homólogo *Bacillus clausii* (44% de identidad a nivel de proteína).

5 [0021] El polipéptido de sacarosa-6-fosfato hidrolasa con una secuencia de aminoácidos de SEC ID n° 2 comparte homología significativa con sacarosa-6-fosfato hidrolasas de *Lactobacillus sakei* (50% de identidad a nivel de proteína) y otras bacterias del ácido láctico. También para este polipéptido fue sorprendente ver que la homología a otros homólogos de *Bacillus* fue inferior a la de las bacterias del ácido láctico. El homólogo de *Bacillus* más cercano fue de *Bacillus clausii* (41% de identidad a nivel de proteína).

10 [0022] Con motivo de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se refiere al porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las dos secuencias. El grado de identidad es determinado usando el algoritmo de BLAST, que es descrito en Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). El software para realizar análisis BLAST está públicamente disponible a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los parámetros de algoritmo BLAST W, T, y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTP usa como valores predeterminados: Tamaño de palabra: 3 Valor esperado: 10; Tamaño de lista de aciertos 100; Coste de gap: 11,1 Matriz: BLOSUM62.

15 [0023] En otro aspecto más, hay polinucleótidos proporcionados que codifican los polipéptidos del aspecto precedente, por ejemplo de un polinucleótido con una secuencia según la SEC ID n° 3 o SEC ID n° 4.

[0024] Los polipéptidos y polinucleótidos de los aspectos anteriores son utilizables para construir una cepa de *Bacillus* moderadamente termofílica capaz de utilizar sacarosa como una fuente de carbono, como se describe en este caso.

25 [0025] En otro aspecto más, un método está provisto para la producción de un compuesto de interés que comprende el cultivo de una cepa de *Bacillus* moderadamente termofílica en una fuente de carbono con sacarosa. El método se caracteriza por el hecho de que la cepa de *Bacillus* moderadamente termofílica para ser cultivada se deriva de una cepa de *Bacillus* progenitora moderadamente termofílica incapaz de utilizar sacarosa como una fuente de carbono proporcionando a la cepa progenitora la capacidad de utilizar sacarosa como una fuente de carbono.

30 [0026] La cepa de *Bacillus* progenitora moderadamente termofílica que no es capaz de utilizar sacarosa como una fuente de carbono está provista con la capacidad de utilizar sacarosa como una fuente de carbono usando el método y polinucleótido(s) como se describe en los aspectos precedentes. Usando estos métodos y polinucleótido(s), la presente invención permite ventajosamente cultivar en una fuente de carbono conteniendo sacarosa cepas de *Bacillus* moderadamente termofílicas que se adaptan a condiciones de cultivo industrial y/o son seleccionadas por poseer un alto potencial de producción y que originalmente no poseen la capacidad de utilizar sacarosa.

35 [0027] La fuente de carbono que se usa para cultivo de la cepa de *Bacillus* moderadamente termofílica puede contener sacarosa en un nivel de al menos 0,5% (p/p), basado en el peso total de la fuente de carbono. Es también posible usar sacarosa como la fuente de carbono sola.

40 [0028] El cultivo además puede ser realizado bajo condiciones convencionales comúnmente conocidas por el experto en la técnica.

45 [0029] Después del cultivo, el compuesto formado de interés es opcionalmente aislado del medio de fermentación y purificado cuando es necesario. Métodos de purificación/aislamiento convencional, por ejemplo para ácido láctico, son destilación, extracción, electrodiálisis, adsorción, intercambio de iones, cristalización y similares, y combinaciones de los métodos de purificación/aislamiento arriba mencionados.

50 [0030] El compuesto de interés puede ser ácido láctico. El término "ácido láctico" significa ácido 2-hidroxi-propiónico en su ácido libre o forma de sal. El ácido láctico contiene un átomo de carbono quiral, y por esta razón pueden existir como enantiómero (R) y (S). El término "ácido láctico" como se usa en esta solicitud incluye los isómeros puros (R) y (S), y sus mezclas derivadas, incluyendo la mezcla racémica. Para la producción de R-lactato, una cepa de producción genéticamente modificada se puede usar como se describe en WO 2007/085443, que se incorpora aquí por referencia.

55 [0031] El compuesto de interés puede ser además piruvato, usando una cepa donde la conversión de piruvato en lactato es bloqueada. El compuesto de interés puede ser además un compuesto derivable de piruvato, usando una cepa donde piruvato se redirige hacia producción de tal compuesto, incluyendo acetolactato, diacetilo, acetoína, 2,3-butanodiol, 1,2-propanodiol, acetato, formiato, acetaldehído, etanol, L-alanina, oxaloacetato, S-malato, succinato, fumarato, 2-oxoglutarato, oxalosuccinato, isocitrato, citrato, glioxilato.

60 Descripción de las figuras

[0032]

65

La Figura 1 muestra el mapa genómico del operón de sacarosa de *Bacillus coagulans*, describiendo el gen de la enzima II de PTS sacarosa (scrA) y el gen de sacarosa-6-fosfato hidrolasa (scrB).

La Figura 2 muestra un mapa plásmido de pMH84. Los genes de replicación (repA y repB), el gen de resistencia al cloranfenicol (cat), el gen de la enzima II de sacarosa PTS (scrA) y el gen de sacarosa-6-fosfato hidrolasa (scrB) se representan por flechas. Las regiones de homología aguas arriba (us) y aguas abajo (ds) para recombinación de cruce doble (gris), región promotora de *Bacillus coagulans* (Bco; blanco), y sitios lox (lox 71 y lox66; negro) están encuadrados. Para BgIII y NcoI sólo sitios pertinentes para la construcción son incluidos.

EJEMPLOS

Cepas y condiciones de cultivo

[0033] *B. coagulans* DSM 1 se obtuvo de DSMZ, Braunschweig, Alemania. *B. coagulans* fue rutinariamente cultivado a 50°C bajo condiciones aeróbicas (120 r.p.m.) en caldo de BC (WO 2007/085443) con 50 g/l de glucosa. Si fuese apropiado, el medio fue suplementado con cloranfenicol a 7 mg/l. Placas de BC fueron preparadas con Gelrite como se ha descrito antes (WO 2007/085443). Para evaluación de uso de carbono *B. coagulans* fue cultivado en un medio químicamente definido (CDM) conteniendo por litro 2,0 g (NH₄)₂ HPO₄, 3,5 g (NH₄)₂ SO₄, 10 g tampón Bis-Tris (bis[2-hidroximetil]iminotris[hidroximetil]-metano), 0,5 g KCl, 0,234 g L-arginina, 0,304 g ácido L-aspártico, 0,026 g L-cistina, 0,470 g ácido glutámico, 0,093 g L-histidina, 0,360 g L-isoleucina, 0,581 g L-leucina, 0,111 g L-metionina, 0,197 g L-prolina, 0,308 g L-serina, 0,350 g L-treonina, 0,345 g L-valina, 0,2 g MgCl₂ · 6 H₂O, 50 mg CaCl₂ · 2 H₂O, 16 mg MnCl₂ · 7 H₂O, 0,1 mg tiamina, 0,5 mg de ácido nicotínico, 0,1 mg de ácido pantoténico, 0,5 mg piridoxamina, 0,5 mg piridoxal, 0,1 mg D-biotina, 0,1 mg de ácido fólico, 0,1 mg de ácido p-aminobenzoico, 0,1 mg cobalamina. Si fuese apropiado, el CDM fue suplementado con 5 g de glucosa o 5 g de sacarosa por litro. *Lactococcus lactis* MG1363 fue descrito por Gasson (Gasson, M. J., 1983: Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing, J. Bacteriol. 154:1-9). *L. lactis* fue rutinariamente cultivado a 30°C en caldo M17 (Difco) con 5 g/l glucosa. Las bacterias fueron almacenadas en soluciones stock de glicerol, usando 15% (v/v) de glicerol, a -80°C.

Técnicas de manipulación de ADN

[0034] Técnicas de manipulación de ADN estándar fueron realizadas como se describe por Sambrook y Russell (J. Sambrook y D. W. Russell. 2001: Molecular Cloning, a laboratory manual. 3ª edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).

[0035] Aislamiento de ADN plásmido a gran escala de 100 mL de cultivo fue realizado usando Jetstar 2.0 Plasmid Maxiprep Kit® (Genomed) siguiendo las instrucciones del fabricante. Aislamiento de ADN plásmido a escala pequeña de cultivo de 1 mL fue realizado usando el kit Nucleospin Plasmid Quick Pure® (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante.

[0036] *L. lactis* sirvió como huésped intermedio durante la construcción del plásmido de integración pMH84 (Figura 2). Preparación de células competentes de *L. lactis* y electroporación fueron realizadas como se describe por Holo y Nes (Holo, H. y I. F. Nes, 1989: High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. cremoris grown with glycine in osmotically stabilized media, Appl. Environ. Microbiol. 55:3119-3123).

[0037] *B. coagulans* fue transformado por electroporación como se describe en WO 2007/085443.

[0038] Reacciones de PCR para fines de clonación fueron realizadas con la polimerasa Pwo de alta fidelidad (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante.

[0039] Análisis PCR de colonias fue usado para demostrar la presencia de pNW33N en las colonias resistentes al cloranfenicol como se describe en WO 2007/085443.

Fermentaciones

[0040] Fermentaciones por lotes de *B. coagulans* fueron realizadas en los tubos con tapa a rosca (13 mL) con 10 ml de caldo de BC o CDM a 50°C.

[0041] Muestras fueron retiradas al final de fermentación para medición de la turbidez a 600 nm, pH, y contenido de ácido orgánico en el caldo de fermentación. Para ello, muestras fueron centrifugadas y el detrito restante en el sobrenadante fue quitado por filtración usando un filtro Millex GP 0.22 µm® (Millipore). El filtrado fue congelado hasta posteriores análisis.

[0042] Ácidos orgánicos (ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, etanol, ácido butírico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido 2-hidroxi butírico, ácido glicólico, ácido oxálico, ácido sórbico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido

benzoico, ácido maleico, ácido málico, ácido cítrico) fueron medidos usando una derivación y GLC. R- y S-lactatos fueron metilados a lactato de metilo y medidos por análisis de espacio de cabecera en una columna quiral.

EJEMPLO 1. Construcción de un plásmido de integración de utilización de sacarosa de *B. coagulans*

5 [0043] Análisis de secuencia aleatorio de una sacarosa seleccionada fermentando cepa de *B. coagulans* reveló una
 10 región de dos genes con homología secuencial a genes de enzima II de PTS sacarosa y de sacarosa-6-fosfato hidrolasa
 (scrA y scrB respectivamente). Un mapa genético de la región se muestra en la Figura 1. Un fragmento de ADN con
 15 agrupamiento de genes *scrAB* y sus promotores (representados en la SEC ID nº 5) fue generado con PCR de alta
 fidelidad usando los cebadores 5'-AGTACTGCATGCTTAAAGAGTAGCTTTTCGGTGTAAAGTG-3' (introduciendo un
 sitio SphI, SEC ID nº 6) y 5'-AGTACTGAGCTCCTATTTATTAATAGAATGAAGACTCCAGTAGTTCCC-3' introduciendo
 un sitio SacI, SEC ID nº 7) en combinación con ADN genómico de una cepa de *B. coagulans* fermentando en sacarosa
 como ADN molde. Alternativamente el agrupamiento de genes *scrAB* se puede generar como ADN sintético con la
 20 secuencia representada en la SEC ID nº 5. Un plásmido de integración de *B. coagulans* fue modificado para permitir la
 integración del agrupamiento de genes *scrAB* en el cromosoma DSM 1 de *B. coagulans*. Fragmentos de 1,0 kb aguas
 arriba y aguas abajo del sitio de integración cromosómica fueron usados para recombinación. El vector de integración,
 pMH84 (Figura 2), se basa en el vector de clonación de *Lactococcus* pMH3 (WO 2007/085443) y tiene un replicón
 termosensible en *B. coagulans*. Primero el promotor *cat* fue sustituido por un promotor de *B. coagulans*. Con este fin el
 25 fragmento pMH3 de BgIII-Sall conteniendo el gen *cat* fue sustituido por un producto PCR de fusión de un promotor de *B.*
coagulans constitutivo traduccionalmente fusionado al gen *cat* introduciendo simultáneamente un sitio NcoI
 superponiendo el codón de inicio *cat* (SEC ID nº 18). La parte del promotor fue generada usando combinación de
 cebadores (hacia adelante) 5'-CGCGTCTGACTGTGGATAAGACAACAGGATTTCGTATG-3' (introduciendo un sitio Sall,
 SEC ID nº 8) y (hacia atrás) 5'-CTAAATCAATTTTATTAAGTCCATGGTCCACCCCGTTCTTTTCTTTTGTG-3'
 (introduciendo un sitio NcoI, SEC ID nº 9) con ADN genómico de una cepa de *B. coagulans* de fermentación de
 30 sacarosa como ADN molde. El gen *cat* fue generado usando combinación de cebadores (hacia adelante) 5'-
 CACAAAAGAAAAGAACGGGGTGGACCCATGGACTTTAATAAAATTGATTTAG-3' (introduciendo un sitio NcoI, SEC
 ID nº 10) y (hacia atrás) 5'-CGCAGATCTCCTTCTTCAACTAACGGG-3' (introduciendo un sitio BgIII, SEC ID nº 11)
 usando pMH3 como molde. Ambos productos *cat* usados como molde en una nueva reacción de PCR usando el
 promotor hacia adelante y cebadores hacia atrás *cat*. Este fragmento puede también ser generado como ADN sintético
 con la secuencia representada en la SEC ID nº 18. El plásmido resultante fue designado pMH71. Para permitir uso
 múltiple del sistema Cre-lox, los sitios lox66 y lox71 (Langer, S. J., A. P. Ghafoori, M. Byrd, and L. Leinwand, 2002: A
 genetic screen identifies novel non-compatible loxP sites, *Nucleic Acids Res.* 30:3067-3077., Lambert, J. M., R. S.
 Bongers, and M. Kleere-bezem, 2007: Cre-lox-based system for multiple gene deletions and selectable-marker removal
 in *Lactobacillus plantarum*, *Appl. Environ. Microbiol.* 73:1126-1135.) que flanquean la región de promotor CAT fueron
 35 introducidos por PCR usando cebadores 5'-
 CCCGTCGACGCTAGCTACCGTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGTGGATAAGACAACAGGATTTCG-3'
 (introduciendo los sitios lox66, Sall y NheI, SEC ID nº 12) y 5'-
 CGCAGATCTTACCGTTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTATCCTTCTTCAACTAACGGGGCA GGTTAG -3'
 (introduciendo los sitios lox71 y BgIII, SEC ID nº 13) y pMH71 como molde. El producto PCR resultante fue digerido con
 40 BgIII-Sall y usado para intercambiar con la región de promotor CAT BgIII Sall de pMH71, dando como resultado el
 plásmido pMH77. El fragmento aguas arriba del sitio de integración fue generado por PCR usando cebadores 5'-
 CGCCTCGAGAGATCTGGCCGGGCTTTATGGGAGG-3' (introduciendo los sitios XhoI y BgIII, SEC ID nº 14) y 5'-
 GCCGAGCTCGCATGCCCTGATCAACCGGGTCAAGTGC (introduciendo los sitios SacI y SphI, SEC ID nº 15) y ADN
 cromosómico de DSM 1 de *B. coagulans* como molde. El producto PCR fue clonado en pMH77 usando SacI y XhoI.
 45 Esto dio como resultado pMH82. El fragmento aguas abajo del sitio de integración fue generado por PCR usando
 cebadores 5'-CCCGTAGCCGTTTCAATCACATAGTCGTATTG (introduciendo un sitio NheI, SEC ID nº 16) y 5'-
 CCGGTCGACGGCCTTCATGTGCTTTGCGCAAATTC (introduciendo un sitio Sall, SEC ID nº 17) y ADN
 cromosómico de DSM 1 de *B. coagulans* como molde. El producto PCR fue clonado en pMH82 como fragmento de
 Sall-NheI, dando como resultado pMH83. El fragmento de ADN con los genes *scrAB* fue clonado como fragmento de
 50 SphI y SacI en pMH83 digerido con las mismas enzimas, lo que dio como resultado el vector de integración pMH84
 (Figura 2). El plásmido pMH84 fue aislado y la integridad del agrupamiento de genes *scrAB*, las regiones aguas arriba y
 aguas abajo, y los sitios *lox* fueron confirmados por análisis de secuencias de ADN.

EJEMPLO 2. Integración genómica de *scrAB* en DSM 1 de *B. coagulans*

55 [0044] Para integración genómica de los genes *scrAB* en DSM 1 de *B. coagulans*, el plásmido pMH84 fue transformado
 a esta cepa por electroporación y colocado en placas de BC suplementadas con cloranfenicol. Transformantes fueron
 seleccionados por la presencia del plásmido por PCR de colonias. Las colonias positivas fueron cultivadas para
 60 aislamiento de plásmido y la integridad del plásmido fue confirmada por análisis de restricción. Un transformante fue
 seleccionado para experimentos posteriores. La integración de los genes de sacarosa por intercambio de cruce doble
 fue establecido después de cultivo a 60°C y selección para colonias resistentes al cloranfenicol. Un integrante fue
 seleccionado para posteriores estudios y almacenado como solución stock de glicerol. La integración correcta fue
 confirmada por análisis de PCR y análisis de secuencias de los sitios de fusión. Esta cepa fue designada *B. coagulans*
 DSM 1::scrAB.

EJEMPLO 3. Fermentación de sacarosa con *B. coagulans*

[0045] En este experimento los inventores demuestran cómo cepas de *B. coagulans* que no son capaces de fermentación de sacarosa eficaz se pueden modificar para hacerse fermentadoras de sacarosa. Las cepas de *B. coagulans* DSM 1 y DSM 1::*scrAB* fueron inoculadas de soluciones stock de glicerol en 10 ml de caldo de BC sin azúcar e incubadas a 50°C a 120 r.p.m. Durante la noche, los cultivos fueron transferidos (2% v/v) a 10 ml CDM suplementados con glucosa. Después de la incubación durante toda la noche los cultivos fueron granulados y los gránulos fueron resuspendidos en 10 ml CDM sin azúcar. Para cada cepa tres partes triplicadas de 10 ml CDM suplementadas con bien 5 g de glucosa por litro, 5 g de sacarosa por litro, o ningún azúcar fueron inoculados (2% v/v) de los cultivos resuspendidos. Después de 50 h de incubación estática en los tubos de tapa a rosca la turbidez a 600 nm, el pH, y el contenido de ácido orgánico del sobrenadante del caldo fueron determinados (tabla 1). Los resultados demuestran que se requiere azúcar para crecimiento anaeróbico apropiado y que *B. coagulans* DSM 1::*scrAB* es capaz de fermentar sacarosa a ácido láctico, mientras *B. coagulans* DSM 1 no lo es. La ausencia de azúcar dio como resultado ningún crecimiento y ninguna acidificación para ambas cepas de *B. coagulans*. En presencia de sacarosa DSM 1 no mostró ningún crecimiento y ninguna acidificación, mientras que *B. coagulans* DSM 1::*scrAB* tuvo buen crecimiento y acidificación. El ácido láctico fue el único ácido orgánico que fue detectado en los sobrenadantes de cultivo. Esto demuestra que introducir el cassette de genes *scrAB* de *B. coagulans* es suficiente para la fermentación de sacarosa eficaz con *B. coagulans*.

Tabla 1. Características de fermentación después de 50h de incubación^a

Cepa	<i>B. coagulans</i> DSM 1:: <i>scrAB</i>			<i>B. coagulans</i> DSM 1		
Carbono añadido	Glucosa	Sacarosa	Ninguno	Glucosa	Sacarosa	Ninguno
Turbidez a 600nm	0,6	0,8	0,0	0,7	0,1	0,0
pH	4,4	4,5	6,5	4,4	6,5	6,5
Ácido láctico	0,41	0,36	N.D.	0,40	N.D.	N.D.

^aDatos son medidos de 3 fermentaciones. Concentraciones de ácido orgánico se dan en % (p/p). N.D., no determinado. Ácido fórmico (<0,02 %), ácido acético (<0,02%), ácido propiónico (<0,02%), ácido butírico (<0,01%), ácido pirúvico (<0,02%), ácido 2-hidroxi-butírico (<0,01%), ácido glicólico (<0,20%), ácido oxálico (<0,02%), ácido sórbico (<0,01%), ácido fumárico (<0,02%), ácido succínico (<0,02%), ácido benzoico (<0,03%) y ácido maleico (<0,02%) estaban por debajo de los límites de detección.

Listado de secuencias

[0046]

<110> Purac Biochem B.V.

<120> Fermentación de bacilos moderadamente termofílicos en sacarosa

<130> EP11371-He/vw

<160> 18

<170> Versión de patentIn 3.3

<210> 1

<211> 656

<212> PRT

<213> Bacillus coagulans

<400> 1

ES 2 394 749 T3

Met Asn His Ala Lys Val Ala Lys Asp Val Leu Asn Ala Leu Asn Gly
 1 5 10 15
 Lys Asp Asn Ile Lys Ala Ala Ala His Cys Ala Thr Arg Leu Arg Leu
 20 25 30
 Val Ile Asn Asp Glu Ser Lys Ile Asp Gln Lys Ala Leu Asp Ala His
 35 40 45
 Pro Asp Val Lys Gly Thr Phe Lys Thr Asn Gly Gln Tyr Gln Ile Ile
 50 55 60
 Ile Gly Pro Gly Asp Val Asp Lys Val Tyr Ala Glu Leu Ile Lys Leu
 65 70 75 80
 Thr Gly Leu Pro Asp Met Thr Thr Glu Asp Val Lys Lys Thr Ser Asn
 85 90 95
 Glu Lys Gln Gly Asn Val Leu Leu Arg Leu Ile Lys Val Leu Ser Asp
 100 105 110
 Ile Phe Val Pro Ile Ile Pro Ala Leu Val Ala Gly Gly Leu Leu Met
 115 120 125
 Ala Leu Asn Asn Val Leu Thr Ala Glu His Leu Phe Thr Lys Lys Ala
 130 135 140
 Ile Val Glu Leu Tyr Pro Gly Leu Lys Asp Ile Ala Ser Phe Ile Asn
 145 150 155 160
 Thr Met Ser Ala Ala Pro Phe Thr Phe Leu Pro Val Leu Ile Gly Tyr
 165 170 175
 Ser Ala Thr Lys Arg Phe Gly Gly Asn Pro Tyr Leu Gly Ala Ala Met
 180 185 190
 Gly Met Ile Met Val Ser Pro Ala Leu Thr Ser Gly Tyr Asp Val Val

ES 2 394 749 T3

Tyr Pro Met Gly Pro Val His Gly Leu Lys Cys Trp Tyr His Leu Ser
 65 70 75 80
 Ser Lys Asp Leu Ile His Trp Lys Gly Lys Gly Leu Ala Ile Leu Pro
 85 90 95
 Asp Thr Glu Tyr Asp Ser His Gly Cys Tyr Ser Gly Ser Ala Ile Pro
 100 105 110
 Val Glu Asp Arg Leu Phe Ile Met Tyr Thr Gly Asn Val Arg Asp Lys
 115 120 125
 Asn Trp Asn Arg Phe Ser Tyr Gln Leu Gly Ala Trp Met Asp Lys Lys
 130 135 140
 Gly Arg Ile Ser Lys Leu Lys Thr Pro Leu Ile Ala Lys Gln Pro Glu
 145 150 155 160
 Asn Tyr Thr Asp His Phe Arg Asp Pro Gln Ile Ile Arg Tyr His Asn
 165 170 175
 Ser Tyr Tyr Ala Leu Ile Gly Ala Gln Thr Lys Gln Lys Glu Gly Asn
 180 185 190
 Ile Leu Val Tyr Gln Ser Lys Asp Leu Lys Asn Trp Glu Phe Asn Gly
 195 200 205
 Pro Leu Glu Leu Pro Leu Lys Asn Leu Gly Tyr Met Ile Glu Cys Pro
 210 215 220
 Asn Ile Val Trp Val Asp Gln Lys Pro Val Leu Ile Phe Cys Pro Gln
 225 230 235 240
 Gly Leu Asp Gln Asn Ile Leu His Tyr Gln Asn Ile Tyr Pro Asn Thr
 245 250 255
 Tyr Leu Ile Gly Asp Thr Phe Asp Pro Glu Lys Asn Arg Phe Glu Ser
 260 265 270
 Lys Tyr Leu Leu His Asn Leu Asp Glu Gly Phe Asp Ile Tyr Ala Thr
 275 280 285
 Gln Ala Phe Asn Ala Pro Asp Gly Arg Thr Leu Ala Val Ser Trp Ile
 290 295 300
 Gly Leu Pro Glu Ile Asp Tyr Pro Thr Asp Gln Tyr Gly Trp Ala His
 305 310 315 320
 Cys Leu Ser Leu Ile Lys Glu Leu Lys Ile Gln Asp Gly His Leu Tyr
 325 330 335

ES 2 394 749 T3

Gln Phe Pro Val Lys Glu Thr Glu Ser Leu Arg Gly Arg Lys Ile Glu
 340 345 350

Leu Asp Gly Val Leu Thr Glu Gln Thr Gln Leu Ile Leu Asn Gln Asn
 355 360 365

Glu Thr Ala Tyr Glu Leu Glu Ile Ile Leu Lys Gly Asn Gly Glu Gly
 370 375 380

Lys Leu Gln Leu Ala Ser Asp Gly His Gln Ala Leu Asn Leu Ile Phe
 385 390 395 400

Asn Phe Ala Asp Gly Thr Leu Val Leu Asp Arg Ser His Ala Gly Ile
 405 410 415

Pro Phe Ala Gln Gln Tyr Gly Thr Ser Arg Thr Val Gln Ile Pro Lys
 420 425 430

Asn Thr Pro Leu Asn Leu His Ile Phe Met Asp Ala Ser Val Val Glu
 435 440 445

Ile Phe Leu Asn His Gly His Asp Val Leu Thr Ser Arg Leu Phe Pro
 450 455 460

Ser Lys Lys Gln Thr Lys Ile Phe Leu Glu Thr Asn His His Leu Ala
 465 470 475 480

Tyr Asn Gly Asn Tyr Trp Ser Leu His Ser Ile Asn Lys
 485 490

<210> 3

<211> 1971

<212> ADN

5 <213> Bacillus coagulans

<400> 3

atgaaccatg caaagggttg aaaagacgtg ttaaacgctt taaatggcaa agataatata 60

aaagctgcag cccactgccc gacaaggctg cgcttagtta tcaatgatga atcaaaaata 120

gacaaaaaag cattggatgc gcatccggat gtaaaaggta catttzaaac aaacggccag 180

taccaaatta ttataggacc gggggatgtc gataaagttt atgctgaatt gatcaaatta 240

accggccttc cggatatgac aacggaggat gtgaaaaaaa cttcgaatga aaagcagggg 300

aatgtattat taagattaat caaggtatta tctgatattt ttgttccaat tattcctgca 360

cttgttgccg gcggtttgct gatggcttta aacaatgtat tgacagcggg acacctattc 420

acaaagaagg caatagtggg attgtaccgg ggactgaaag atatagcgtc atttatcaat 480

accatgtcgg ctgccccatt tactttcttg ccggttttaa tccgatattc cgcaacccaa 540

cggtttggtg ggaatccgta tttaggagct gctatgggga tgatcatggt atctcctgca 600

```

ttgacaagcg ggtatgatgt tgttagcgca aaagcatcag gggagtggc ttattggcat 660
atTTTTggat taaaagtcgc gcagggccgt taccaaggct ctgtcttgcc ggtattggta 720
gtttcatgga ttttagctaa attagagaaa tttttcata aatatatttc aaatgcattt 780
gattttacgt tcacaccgat gcttgccatt atcattacag gattttctaac gtttacattt 840
gttgggcctg ttatgcgtga tgtgagtgat gggttaacca atggaattat gtggttatat 900
aatgcaacag gcgcggttgg aactgcaatc tttggactgt tttattcacc gattgtcatt 960
accggtctgc atcaaagttt tcttgcaatt gaaaccacac ttttggctga tattgcaaaa 1020
accggcggat cgtttgattt accaategcc tctatggcta atattgcgca aggtgctgct 1080
tgtcttgccg tattctttat tacaaaaagt aaaaaacaaa aaagcttatt ttcttcagca 1140
agtatttcag ctcttttggg gattacagaa ccggctatft tggggattaa cttgaaatta 1200
aggtatccgt tcttttgtgc aatgggtgct tccggatttg ctctatatt tattggcatg 1260
ttccatggtt tatcagtttc aatgggacct gcaagtgtaa ttggttttat ttgcattcgc 1320
tcacaatcta tcttgccctt tgtcatgagt ggcgcaataa gttttgttat cgccttcaca 1380
acaacgtata tatatggaag acgggcggcg gcaaaggaac aaaatcagat tacgaatgaa 1440
cgggtatctg gaaaagaaca aataggagaa acggctgctt cggctacggc cctgctggt 1500
aatatcatca tttttgcccc ggttgaagggt gaaacaatga gcttaaaaaa tgtgaaggat 1560
aaattatftt catctgaatt aatgggtaaa ggggcagcca tcatgccgaa aaacggcgat 1620
gtctatgctc cttgtgacgg aattttgacc acggtatftg atacacatca tgcatacggc 1680
attaaaacgg aagatggagc agaaatttta attcacattg gtattgacac ggtaaatctg 1740
aaaggcgaat attttacaag ttacgtagaa aaaggtcaga cggtaaacca aggcgacaaa 1800
ctatgcagtt ttgatctgga gaaaattaaa gaacttgggt atgatccaac cgtgatcacc 1860
gtcgtgacca acacagcaga ttatgcggct gttgaaggat ttaatcatga tcatgataag 1920
gtaaaacagg ggagccagtt catracttta acaccgaaag ctactcttta a 1971

```

<210> 4
 <211> 1482
 <212> ADN
 <213> Bacillus coagulans

5

<400> 4

ES 2 394 749 T3

atggaatgga atcgagcatt acgttataaa aatctaaatg agtgggtctga ggaagaaaaa 60
 aagcatttac ttcttcaaat agaaaattct cegtggcggc tgcattacca tattcaacct 120
 gaaagcggat tgttgaatga tccaaacgga ttttcttttt ttaatgatga atggcatcta 180
 ttttatcaaa attatccgat ggggcctgtc catggtttaa aatgctggta tcatcttagt 240
 tcaaaagatc ttatccattg gaaagggaag gggctggcca tattgccgga tacagagtat 300
 gacagtcacg gctgctactc cggatctgca atcccggttg aagaccgttt atttatcatg 360
 tatacaggaa acgtccgaga taaaaactgg aacagattct cttaccagct tggagcgtgg 420
 atggataaaa aaggtcggat ttccaaatta aaaactccat taattgcaaa acagccagaa 480
 aattacacgg accatttcag ggatccgcaa attatcctgtt atcataattc ttactatgct 540
 ttgatcggtg cccagacgaa acaaaaagag gggaatatct tggtttacca atccaaagac 600
 ctgaaaaact gggaaattcaa cggaccgctt gaattaccgt taaagaattt gggatatatg 660
 attgaatgcc cgaatatcgt atgggtggat caaagccgg tccttatatt ctgcccgcaa 720
 ggctctgacc aaaatatttt acactatcaa aatatttatc ccaacactta ctttaattggg 780
 gatacgttcg accctgagaa aaaccgtttt gaatctaaat atctcctgca taatttggat 840
 gaaggattcg atatttacgc tacgcaggcc ttaacgcac cggacgggcg cacacttgca 900
 gtcagctgga tcggccttcc tgaaatcgat tatecgacag atcagtacgg ttgggcgcat 960
 tgcttgagtt taatcaaaga attgaaaata caggacggcc atctttatca atttcctgta 1020
 aaagaaacag agagccttcg cggaaaggaaa attgaattgg acggggtctt aacagaacag 1080
 acccagctga tattgaatca aatgagaca gcttatgaat tggaaatcat tctgaaaggg 1140
 aacgggggaag gtaaattaca attggcttcg gacgggcac aagcgttaa tcttattttc 1200
 aactttgctg atggaacatt ggtcctggac cgcagccatg cgggtatccc ttttgcacag 1260
 caatacggaa cttccagaac cgtccaaatt ccaaaaaata ccccgctgaa cctgcatatt 1320
 tttatggatg cttctgtcgt tgaaattttt ttaaaccatg gacacgatgt gttaacatct 1380
 cgtctctttc caagcaaaaa acaaacaaag atcttcttgg aaacaaacca tcatttagct 1440
 tataatggga actactggag tcttcattct attaataaat ag 1482

5 <210> 5
 <211> 3678
 <212> ADN
 <213> Bacchus coagulans

10 <400> 5

ES 2 394 749 T3

gagctcctat	ttattaatag	aatgaagact	ccagtagttc	ccattataag	ctaaatgatg	60
gtttgtttcc	aagaagatct	ttgtttggtt	tttgcttggg	aagagacgag	atgttaacac	120
atcgtgtcca	tggtttaaaa	aaatttcaac	gacagaagca	tccataaaaa	tatgcaggtt	180
cagcggggta	ttttttggaa	tttggacggt	tctggaagtt	ccgtattgct	gtgcaaaagg	240
gatacccgca	tggctgagg	ccaggaccaa	tgttccatca	gcaaagttga	aaataagatt	300
taacgcttga	tgcccgtccg	aagccaattg	taatttacct	tccccgttcc	ctttcagaat	360
gatttccaat	tcataagctg	tctcattttg	attcaatatc	agctgggtct	gttctgttaa	420
gaccccgctc	aattcaattt	tccttccgcg	aaggctctct	gtttctttta	caggaaattg	480
ataaagatgg	ccgtcctgta	ttttcaattc	tttgattaaa	ctcaagcaat	gcgcccacc	540
gtactgatct	gtcggataat	cgatttcagg	aaggccgata	cagctgactg	caagtgtgcg	600
cccgtccggt	gcgttaaagg	cctgcgtagc	gtaaataatc	aatccttcat	ccaaattatg	660
caggagatat	ttagattcaa	aacggttttt	ctcagggtcg	aacgtatccc	caattaagta	720
agtgttggga	taaatatttt	gatagtgtaa	aatattttgg	tcgaggcctt	gcgggcagaa	780

tataaggacc	ggcttttgat	ccacccatac	gatattcggg	cattcaatca	tatatcccaa	840
attctttaac	ggtaattcaa	gcggtcggtt	gaattcccag	tttttcaggt	ctttggattg	900
gtaaaccaag	atattccccc	ctttttggtt	cgtctgggca	ccgatcaaag	catagtaaga	960
attatgataa	cggataaatt	gcggatcccc	gaaatgggtc	gtgtaatttt	ctggctgttt	1020
tgcaattaat	ggagttttta	atttggaaat	ccgacctttt	ttatccatcc	acgctccaag	1080
ctggtaagag	aatctgttcc	agtttttate	tgggacgttt	cctgtataca	tgataaataa	1140
acggctttca	accgggattg	cagatccgga	gtagcagccg	tgactgtcat	actctgtatc	1200
cggcaatatg	gccagcccc	tccctttcca	atggataaga	tcttttgaac	taagatgata	1260
ccagcatttt	aaaccatgga	caggccccat	cggataaatt	tgataaaata	gatgccattc	1320
atcattaata	aaagaaaatc	cgtttggatc	attcaacaat	ccgctttcag	gttgaatatg	1380
gtaatgcagc	cgccacggag	aattttctat	ttgaagaagt	aatgcttttt	tttcttctct	1440
agaccactca	tttagatttt	tataacgtaa	tgctcgattc	cattccatat	atataaaacc	1500
tccccaaatt	caaggaaagc	gttctcctgg	atttaatgta	ctgtaaacia	agtgatatgt	1560
caaccgtata	acatacaaaa	tatcttaaat	gatggtaaaa	cataaaaaaa	taataaaaaa	1620
tatgataaac	gcttgacata	taataaaaaag	atagtatatt	agtatgtgaa	acgattacia	1680
aaatatgaaa	gggtgtacac	gatgaaccat	gcaaagggtg	caaaagacgt	gttaaaccgt	1740
ttaaatggca	aagataatat	aaaagctgca	gcccactgcg	cgacaaggct	gcgcttagtt	1800
atcaatgatg	aatcaaaaa	agaccaaaaa	gcattggatg	cgcatccgga	tgtaaaaggt	1860
acatttaaaa	caaaccggcca	gtaccaaatt	attataggac	cgggggatgt	cgataaagtt	1920
tatgctgaat	tgatcaaatt	aaccggcctt	ccggatatga	caaccggagga	tgtgaaaaaa	1980
acttcgaatg	aaaagcaggg	aaatgtatta	ttaagattaa	tcaaggattt	atctgatatt	2040
tttgttccaa	ttattcctgc	acttgttccc	ggcggtttgc	tgatggcttt	aaacaatgta	2100
ttgacagcgg	aacacctatt	cacaaagaag	gcaatagtgg	aattgtacct	gggactgaaa	2160
gatatagcgt	catttatcaa	taccatgtcg	gctgccccat	ttactttctt	gccggtttta	2220
atcggatatt	ccgcaaccaa	acggtttgg	gggaatccgt	atttaggagc	tgctatgggg	2280
atgatcatgg	tatctcctgc	attgacaagc	gggtatgatg	ttgttagcgc	aaaagcatca	2340
ggggagttgg	cttattggca	tatttttgg	ttaaaagtgc	cgcaggccgg	ttaccaaggc	2400
tctgtcttgc	cggtattgg	agtttcatgg	atttttagcta	aattagagaa	atttttccat	2460
aaatatattt	caaatgcatt	tgattttacg	ttcacaccga	tgcttgccat	tatcattaca	2520
ggatttctaa	cgtttacatt	tgttgggccc	gttatgcgtg	atgtgagtga	tgggttaacc	2580
aatggaatta	tgtggttata	taatgcaaca	ggcgcgggtg	gaactgcaat	ctttggactg	2640
ttttattcac	cgattgtcat	taccggctcg	catcaaagtt	ttctgcaat	tgaaaccaca	2700
cttttggctg	atattgcaaa	aaccggcgg	tcgtttgtat	taccaatcgc	ctctatggct	2760
aatattgcgc	aaggtgctgc	ttgtcttggc	gtattcttta	ttacaaaaag	taaaaaacia	2820

ES 2 394 749 T3

aaaagcttat cttcttcagc aagtatttca gctcttttgg ggattacaga accggctatt 2880
 ttcgggatta acttgaaatt aagggtatccg ttcttttgtg caatggttgc ttccgggtatt 2940
 gcttctatat ttattggcat gttccatgtg ttatcagttt caatgggacc tgcaagtgta 3000
 attggtttta tttgcattcg ctcaaatct atcttgcctt ttgtcatgag tggcgcaata 3060
 agttttgtta tcgccttcac aacaacgtat atatatggaa gacgggcggc ggcaaaggaa 3120
 caaaatacga ttacgaatga acgggtatct ggaaaagaac aaataggaga aacggctgct 3180
 tcggctacgg cccctgctgg taatatcatc atttttgccc cggttgaagg tgaacaatg 3240
 agcttaaaaa atgtgaagga taaattatct tcatctgaat taatgggtaa aggggcagcc 3300
 atcatgccga aaaacggcga tgtctatgct ccttgtgacg gaattttgac cacgggtatct 3360
 gatacacatc atgcatacgg cattaaaacg gaagatggag cagaaatttt aattcacatt 3420
 ggtattgaca cggttaatct gaaaggcgaa tattttacaa gttacgtaga aaaaggctag 3480
 acggtaaac accggcgaca actatgcagt tttgatctgg agaaaattaa agaacttgg 3540
 tatgatccaa ccgtgatcac cgtcgtgacc aacacagcag attatgcggc tgttgaagga 3600
 tttaatcatg atcatgataa ggtaaacag gggagccagt tcatcacttt aacaccgaaa 3660
 gctactcttt aagcatgc 3678

- 5 <210> 6
- <211> 40
- <212> ADN
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> cebador sintético

- <400> 6
- agtactgcat gcttaaagag tagctttcgg tgttaaagtg 40

- 15 <210> 7
- <211> 48
- <212> ADN
- <213> Artificial

- 20 <220>
- <223> cebador sintético

- <400> 7
- agtactgagc tcctattat taatagaatg aagactccag tagttccc 48

- 25 <210> 8
- <211> 36
- <212> ADN
- <213> Artificial

- 30 <220>
- <223> Cebador sintético

- <400> 8
- cgctgcgact gtggataaga caacaggatt cgtatg 36

- 35 <210> 9
- <211> 53
- <212> ADN
- <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador sintético

5 <400> 9
 ctaaataat ttattaaag tccatgggtc caccccggtc tttctttt gtg 53

<210> 10
 <211> 53
 10 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador sintético

15 <400> 10
 cacaaaaaga aaagaacggg gggacccat ggactttaat aaaattgatt marca 53

<210> 11
 <211> 27
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador sintético

25 <400> 11
 cgcagatctc ctcttcaac taacggg 27

<210> 12
 <211> 71
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador sintético

35 <400> 12
cccgtegaag ctagctaccg ttcgtataat gtatgctata cgaagttatg tggataagac 60

40 **aacaggattc g 71**

<210> 13
 <211> 70
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador sintético

50 <400>
 13
cgcagatctt accgttcgta tagcatacat tatacgaagt tatecttctt caactaacgg 60

ggcaggttag 70

<210> 14
 <211> 34
 55 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador sintético

60

ES 2 394 749 T3

<400> 14
 cgctcgaga gatctggccg ggctttatgg gagg 34

5 <210> 15
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cebador sintético

<400> 15
 gccgagctcg catgccctg atcaaccggg tcagtgc 37

15 <210> 16
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador sintético

<400> 16
 cccgctagcc catagtcgta de gtttcaatca ttg 33

25 <210> 17
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> cebador sintético

<400> 17
 ccggtcgacg gccttcatgt gctttgccc caaatc 37

<210> 18
 <211> 1146
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Constructo CAT

45 <400> 18

gtcgcactgtg gataagacaa caggattcgt atgccctttt ttgtataaag caggcaaaac 60
agagcattaa atgcaggaaa atcgcagaag atcataccta aaaatgaaaa tgtggtaaata 120
ttttagagta aatTTTTTTA atctaatacta gaaaatcagt acatcgcaaa aagctcgggt 180
tttaagtatg ttttgcttca ggcggtaaaa cttcgtataa taagggagag gcctatccta 240
ttataaaagc cgctttcggc attttgcctt gggagccggc cccggtttag acgggacgta 300
cagccgtttc accggctaac caggcccctt tttggaagcg aagatccgga aatcaagatc 360
agctgtatag atatcaattt ttggaacaca aaaagaaaag aacggggtgg acccatggac 420
tttaataaaa ttgatttaga caattggaag agaaaagaga tatttaataca ttatttgaac 480

ES 2 394 749 T3

caacaaacga	cttttagtat	aaccacagaa	attgatatta	gtgttttata	ccgaaacata	540
aaacaagaag	gatataaatt	ttaccctgea	ttatttttct	tagtgacaag	ggtgataaac	600
tcaaatacag	cttttagaac	tggttacaat	agcgacggag	agttaggtta	ttgggataag	660
ttagagccac	ttataacaat	ttttgatggt	gtatctaaaa	cattctctgg	tatttggact	720
cctgtaaaga	atgacttcaa	agagttttat	gatttatacc	ttctgatgt	agagaaatat	780
aatggttcgg	ggaaattggt	tcccaaaaca	cctatacctg	aaaatgcttt	ttctctttct	840
attattccgt	ggacttcatt	tactgggttt	aacttaaata	tcaataataa	tagtaattac	900
cttctaccca	ttattacagc	aggaaaattc	attaataaag	gtaattcaat	atatttaccg	960
ctatctttac	aggtacatca	ttctgtttgt	gatggttatc	atgcaggatt	gtttatgaac	1020
tctattcagg	aattgtcaga	taggcctaat	gactggcttt	tataatatga	gataatgccg	1080
actgtacttt	ttacagtcgg	ttttctaattg	tcactaacct	gccccgttag	ttgaagaagg	1140
agatct						1146

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la producción de un compuesto de interés que incluye el cultivo de una cepa de *Bacillus* moderadamente termofílica en una fuente de carbono que contiene sacarosa, caracterizado por que la cepa de *Bacillus* moderadamente termofílica se deriva de una cepa progenitora de *Bacillus* moderadamente termofílica que no es capaz de utilizar la sacarosa como una fuente de carbono por transformación de dicha cepa progenitora con un polinucleótido que incluye una secuencia de ADN que codifica un polipéptido con actividad de fosfotransferasa específica de sacarosa y teniendo i) una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1 o ii) una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 70% a la secuencia de SEC ID nº 1 y/o que incluye una secuencia de ADN que codifica un polipéptido con actividad de sacarosa-6-fosfato hidrolasa y teniendo iii) una secuencia de aminoácido de SEC ID nº 2 ó 4) una secuencia de aminoácido con una identidad de al menos 70% de la secuencia de SEC ID nº 2.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, donde el compuesto de interés es ácido láctico.
- 15 3. Método para la construcción de una cepa de *Bacillus* moderadamente termofílica capaz de utilizar sacarosa como fuente de carbono que incluye la transformación de una cepa de *Bacillus* progenitora moderadamente termofílica incapaz de utilizar sacarosa como fuente de carbono con un polinucleótido que incluye una secuencia de ADN que codifica un polipéptido con actividad de fosfotransferasa específica de sacarosa y teniendo i) una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 1 o ii) una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 70% de la secuencia de SEC ID nº 1 y/o que incluye una secuencia de ADN que codifica un polipéptido con actividad de sacarosa-6-fosfato hidrolasa y teniendo iii) una secuencia de aminoácido de SEC ID nº 2 o iv) una secuencia de aminoácido con una identidad de al menos 70% de la secuencia de SEC ID nº 2.
- 20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la cepa de *Bacillus* moderadamente termofílica es anaeróbica facultativa.
- 25 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la cepa de *Bacillus* moderadamente termofílica es homoláctica.
- 30 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde la cepa de *Bacillus* moderadamente termofílica es *Bacillus coagulans*.
- 35 7. Polipéptido con actividad de fosfotransferasa específica de sacarosa y con una secuencia de aminoácido de SEC ID nº 1 o una secuencia de aminoácido con una identidad de al menos 70% a la secuencia de SEC ID nº 1.
8. Polipéptido con actividad de sacarosa-6-fosfato hidrolasa y con una secuencia de aminoácido de SEC ID nº 2 o una secuencia de aminoácido con una identidad de al menos 70% a la secuencia de SEC ID nº 2.
- 40 9. Polinucleótido que codifica el polipéptido de las reivindicaciones 7 u 8.
10. Polinucleótido de la reivindicación 9 teniendo una secuencia de SEC ID nº 3 o SEC ID nº 4.

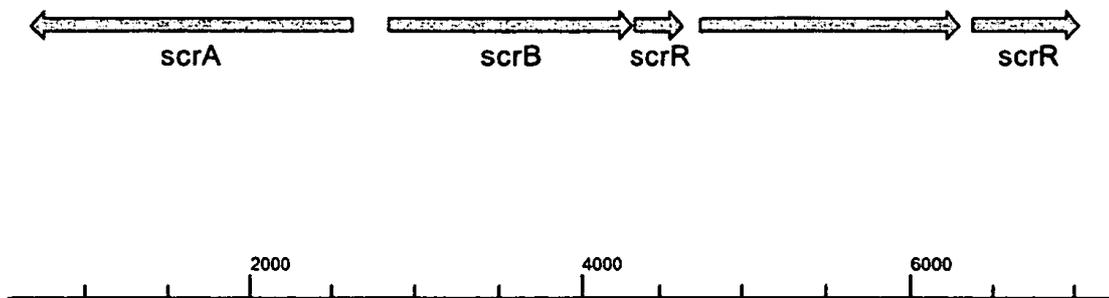


Figura 1

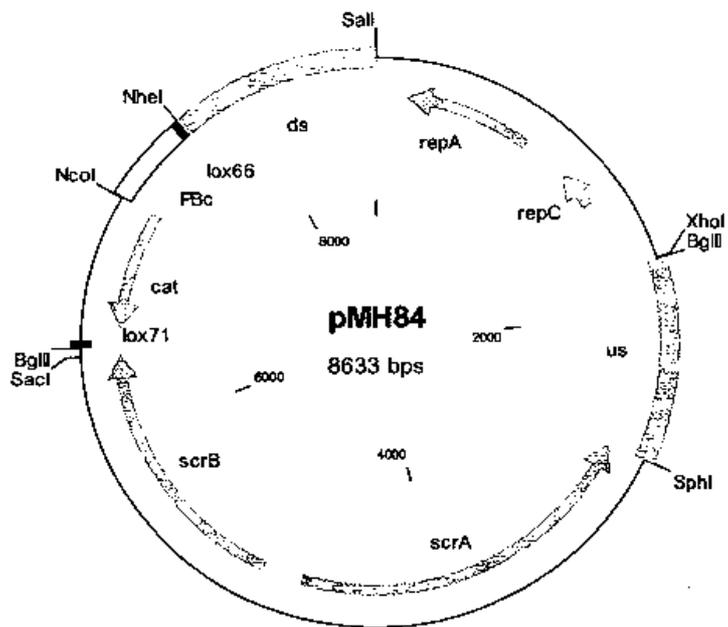


Figura 2