

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 240**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 9/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2008 E 08862527 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013 EP 2227541**

54 Título: **Microorganismo recombinante con capacidad de utilizar sacarosa como fuente de carbono**

30 Prioridad:

18.12.2007 KR 20070133239

28.10.2008 KR 20080106113

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

30.09.2013

73 Titular/es:

**KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE
AND TECHNOLOGY (100.0%)
373-1, GUSEONG-DONG YUSEONG-GU
DAEJEON 305-701, KR**

72 Inventor/es:

**LEE, SANG YUP;
LEE, JEONG WOOK;
SONG, HYOHAK;
KIM, JI MAHN;
CHOI, SOL y
PARK, JIN HWAN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 424 240 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

Microorganismo recombinante con capacidad de utilizar sacarosa como fuente de carbono

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un microorganismo recombinante capaz de metabolizar sacarosa y, más particularmente, a un microorganismo recombinante capaz de metabolizar sacarosa en el cual se introduce un gen que codifica sacarosa fosfotransferasa y/o un gen que codifica sacarosa-6-fosfato hidrolasa, o a un microorganismo recombinante capaz de metabolizar sacarosa en el cual se introduce un gen que codifica β -fructofuranosidasa, en donde el gen ptsG tiene la SEQ ID NO. 2 y la sacarosa-6-fosfato hidrolasa es un gen sacC.

TÉCNICA DE ANTECEDENTES

15 Para el desarrollo sostenible del género humano, se están realizando activamente estudios para el desarrollo de la biotecnología industrial para la producción de compuestos útiles a partir de bio-fuentes renovables, junto con un gran interés en los mismos. La producción de sustancias químicas mediante fermentación microbiana se ha realizado hasta la fecha utilizando glucosa como materia prima principal. Sin embargo, la preparación de productos químicos mediante fermentación microbiana es difícil de comercializar, ya que la glucosa es cara y, por lo tanto, el precio de los compuestos químicos producidos por la fermentación microbiana es mayor que el de compuestos químicos producidos por métodos de síntesis química que utilizan aceite crudo como materia prima principal. Así, con el fin de desarrollar como una alternativa al método que utiliza glucosa cara como fuente de carbono, se están realizando activamente estudios sobre el descubrimiento de una diversidad de fuentes de carbono económicas que puedan ser fácilmente obtenidas a partir de bio-fuentes abundantes. Por ejemplo, estudios sobre la producción de diversos metabolitos primarios utilizando materias primas relativamente económicas tales como hidrolizados lignocelulósicos, glicerol, suero lácteo, líquidos de maceración de maíz o similares han sido realizado por muchos investigadores, incluidos los inventores de esta solicitud (Samuelov *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:2260, 1999; Lec *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54:23, 2000; Lee *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 72:41, 2001; Lee *et al.*, *Biotechnol. Lett.*, 25:111, 2003; Lee *et al.*, *Bioproc. Biosystems Eng.*, 26:63, 2003). Sin embargo, de acuerdo con los resultados de los estudios reseñados hasta la fecha, en los casos en los que las materias primas fueron utilizadas como fuentes de carbono en lugar de glucosa, la productividad o el rendimiento productivo de metabolitos deseados era significativamente menor que cuando se utilizaba glucosa como una fuente de carbono. Así, para superar este inconveniente se requieren urgentemente una investigación y un desarrollo.

35 La sacarosa (comúnmente conocida como azúcar) es un disacárido que consiste en glucosa y fructosa, y es una fuente de carbono que es muy abundante en la naturaleza y se produce a partir de todas las plantas con capacidad de fotosíntesis. En particular, la caña de azúcar y la remolacha azucarera contienen grandes cantidades de sacarosa, y más del 60% de la sacarosa del mundo está siendo actualmente producida a partir de la caña de azúcar. Particularmente, la sacarosa se produce a un coste muy bajo, ya que se puede producir industrialmente a través de un simple proceso de evaporar/concentrar extractos obtenidos mediante prensado mecánico de cañas de azúcar. Koutinas *et al.* calcularon los precios de diversas materias primas utilizables para la producción microbiana de sustancias químicas sobre la base de los contenidos en glucosa en el año 2004 y, como resultado, el precio de sacarosa, basado en 1 kg del contenido en glucosa, era de 26,1 centavos (0,19 céntimos de €) que es un precio muy bajo, correspondiente al 77% del precio del trigo, al 50% del precio de la melaza y al 28,9% del precio de sacarosa (Koutinas *et al.*, *Ind. Crops and Products*, 20:75, 2004).

50 Un informe sobre el precio diario del International Sugar Agreement (ISA) indica que el precio de la sacarosa se encuentra en una tendencia descendente estable después de alcanzar un pico en 1994-1995 debido a una excedencia de suministro, y que se espera que continúe la tendencia descendente. Por consiguiente, la sacarosa está recibiendo atención como la más potente fuente de carbono que sustituirá a la costosa glucosa que está siendo actualmente utilizada para producir diversos compuestos químicos a través de fermentación microbiana. Particularmente, es bien conocido para los expertos en la técnica que es muy difícil reducir el coste de producción de glucosa al nivel de la sacarosa, ya que la glucosa, la cual se produce principalmente a partir de almidón de maíz, se produce a través de procesos muy complicados que incluyen la extracción de almidón a partir de maíz, tratamiento previo térmico/químico de maíz, conversión de maíz en glucosa mediante reacciones enzimáticas y purificación de glucosa, y debido a que el precio del maíz está en continuo ascenso. Por estos motivos, la producción de bioetanol basada en maíz en los EE.UU. está disminuyendo gradualmente (Mae-Wan Ho, *Science in Society*, 33:40, 2007), pero la producción de bioetanol basada en la caña de azúcar (es decir, sacarosa) en Brasil

está creciendo rápidamente.

5 Hasta la fecha, se han realizado estudios sobre la producción de compuestos útiles utilizando sacarosa como una fuente de carbono con respecto a la producción de polímeros biodegradables (Lee *et al.*, *Biotechnol. Lett.*, 15:971, 1993; Lee *et al.*, *Biotechnol. Techniques*, 1:59, 1997), ácido cítrico (Forster *et al.*, *App. Microbiol. Biotechnol.*, 75:1409, 2007), acetona, butanol, etanol e isopropanol (George *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 45:1160, 1983; Durre, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49:639, 1998), ácido itacónico (Kautola *et al.*, *Biotechnol. Lett.*, 11:313, 1989), goma xantano (Letisse *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55:417, 2001), etc., mediante cultivo celular a alta concentración. Particularmente, el informe (2006) de la Agencia Internacional de la Energía (IEA) Bioenergy Task 10 40, que analiza la bioenergía internacional y el comercio de biocombustible evaluaron que la producción de bioetanol a partir de caña de azúcar (incluida sacarosa) en Brasil es un modelo excelente de producción de biocombustible no contaminante y sostenible.

15 La sacarosa, como una materia prima para producir compuestos químicos a través de fermentación microbiana, es económica y puede actuar para proteger la membrana celular del entorno externo que contiene grandes cantidades de metabolitos deseados, produciendo así elevadas concentraciones de metabolitos deseados. Kilimann *et al.* expusieron microorganismos a un medio que contenía sacarosa y a un medio que no contenía sacarosa a temperaturas letales, y luego examinaron la viabilidad de los mismos y las estructuras secundarias de las proteínas (*Biochimica et Biophysica Acta*, 1764, 2006). Los resultados del estudio revelaron que las estructuras 20 secundarias de proteínas en las células de los microorganismos expuestos al medio que contenía sacarosa estaban muy bien conservadas, pero las estructuras de proteínas en las células de los microorganismos expuestos al medio que contenía sacarosa estaban altamente modificadas. Particularmente, la viabilidad de los microorganismos expuestos al medio que contenía sacarosa era significativamente mayor que la de los microorganismos expuestos al medio que no contenía sacarosa. Esto demuestra directamente la función de 25 sacarosa de proteger microorganismos frente a un entorno externo perjudicial.

A pesar de que la sacarosa es una excelente materia prima que tiene las ventajas arriba descritas, incluido un bajo precio y una función de proteger a microorganismos frente a un entorno externo, todavía no ha sido reseñado ningún ejemplo que muestre la producción con éxito de compuestos químicos deseados utilizando sacarosa como 30 fuente de carbono y la aplicación comercial real de los mismos. Esto se debe a que un gran número de microorganismos no tiene un mecanismo completo de transportar sacarosa a las células, degradando la sacarosa transportada y ligando los productos degradados a la glucólisis y, así, no pueden utilizar sacarosa como fuente de carbono. Incluso en el caso de microorganismos con un mecanismo capaz de utilizar sacarosa, éstos no pueden producir de manera eficaz metabolitos deseados, debido a que la tasa de ingestión y degradación de sacarosa 35 como fuente de carbono es muy baja.

Jahreis *et al.* 2002 describe vectores recombinantes adecuados para uso en microorganismos que portan los genes *cscA* y *cscB* de *E. coli* que codifican, respectivamente, una sacarosa hidrolasa y una sacarosa permeasa. El documento WO2007/041269 describe también organismos recombinantes capaces de metabolizar sacarosa y de 40 portar *cscA* y *cscB* de *E. coli*.

Con el fin de realizar la producción de diversos compuestos químicos a través de la fermentación microbiana de una manera industrialmente rentable, se requiere el uso de una materia prima económica tal como sacarosa según se describe arriba y, además de ello, la identificación de una enzima capaz de ingerir y degradar eficazmente 45 sacarosa como fuente de carbono a una tasa elevada, y necesariamente se requieren la búsqueda y el desarrollo que permitan el uso de la enzima. Particularmente, a la vista del hecho de que el precio de materias primas para producir compuestos químicos a través de fermentación microbiana supone aproximadamente el 50% del precio de los productos finales, se requieren urgentemente la identificación de una enzima que permita el uso eficaz de sacarosa como una materia prima económica y el desarrollo de la aplicación de la enzima. 50

Se ha reseñado que la sacarosa puede utilizarse para producir diversos bioproductos, incluidos polímeros biodegradables, ácido cítrico, ácido itacónico, acetona, butanol, etanol, isopropanol y goma xantano, mediante cultivo de células a alta concentración. Sin embargo, raramente se han reseñado ejemplos que muestren la producción con éxito de compuestos químicos deseados a través de fermentación microbiana y la aplicación 55 comercial real de los mismos.

Así, con el fin de que la producción de diversos compuestos químicos a través de fermentación microbiana como una tecnología no contaminante sea aplicada con éxito en la industria, se requiere el desarrollo de microorganismos capaces de ingerir y degradar eficazmente una fuente de carbono económica y abundante tal

como sacarosa.

SUMARIO DE LA INVENCION

5 En su sentido más amplio, la invención se refiere a la materia según se define en las reivindicaciones anejas.

Por lo tanto, es un objeto de la invención proporcionar nuevos genes relacionados con el metabolismo de sacarosa que permitan utilizar la sacarosa como una fuente de carbono, y enzimas que son codificadas por los genes.

10 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un microorganismo recombinante capaz de metabolizar sacarosa, en el cual se introduce el gen relacionado con el metabolismo de sacarosa, y un método para producir metabolitos, polímero biodegradable o proteínas recombinantes utilizando el microorganismo recombinante.

15 Con el fin de conseguir los objetos anteriores, la presente invención proporciona una sacarosa fosfotransferasa con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; un gen (*ptsG*) que codifica dicha sacarosa fosfotransferasa; y un vector recombinante que contiene dicho gen (*ptsG*) y un gen (*sacC*) que codifica una sacarosa-6-fosfato hidrolasa.

20 La presente invención proporciona también un microorganismo recombinante capaz de metabolizar sacarosa, en que dicho gen se introduce en una célula hospedante seleccionada del grupo que consiste en bacterias, levaduras y hongos; y un método para producir metabolitos, polímeros biodegradables o proteínas recombinantes, comprendiendo el método cultivar dicho microorganismo recombinante en un medio que contiene sacarosa como fuente de carbono.

25 La presente descripción proporciona también una β -fructofuranosidasa con actividad para hidrolizar el enlace β -D-fructofuranósido para liberar fructosa; y un gen que codifica dicha β -fructofuranosidasa.

30 La presente invención proporciona también un microorganismo recombinante capaz de metabolizar sacarosa, en que dicho gen se introduce en una célula hospedante seleccionada del grupo que consiste en bacterias, levaduras y hongos; y un método para producir metabolitos, polímeros biodegradables o proteínas recombinantes, comprendiendo el método cultivar dicho microorganismo recombinante en un medio que contiene sacarosa como fuente de carbono.

35 Otras características y aspectos de la presente invención resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

40 La FIG. 1 es un diagrama esquemático que muestra una vía a través de la cual se ingiere y degrada sacarosa, y los productos degradados se metabolizan a través de glucólisis cuando nuevas enzimas relacionadas con el metabolismo (sacarosa fosfotransferasa, sacarosa-6-fosfato hidrolasa y fructoquinasa) derivadas de *M. succiniciproducens* MBEL55E, que permiten el metabolismo de sacarosa, se introducen en un microorganismo incapaz de metabolizar sacarosa. Las flechas gruesas (\rightarrow): indican las vías metabólicas en las que están implicadas las nuevas enzimas relacionadas con el metabolismo de sacarosa introducidas, derivadas de *M. succiniciproducens* MBEL55E; y las flechas finas (\rightarrow): indican las vías metabólicas originales del microorganismo recombinante.

50 La FIG. 2 es un diagrama esquemático que muestra cuatro vías posibles de cómo una nueva β -fructofuranosidasa derivada de *M. succiniciproducens* MBEL55E, la cual permite el metabolismo de sacarosa, puede estar implicada en el metabolismo de sacarosa cuando la enzima se introduce en un microorganismo incapaz de metabolizar sacarosa. Flechas gruesas (\rightarrow): cuatro vías posibles metabólicas en las que estará implicada la nueva β -fructofuranosidasa introducida, derivada de *M. succiniciproducens* MBEL55E; y las flechas finas (\rightarrow): indican las vías metabólicas originales del microorganismo recombinante.

55 La FIG. 3 es un mapa de un vector recombinante pMSscrIIA que contiene genes (*ptsG*, *sacC* y *rbsK*) que codifican sacarosa fosfotransferasa, sacarosa-6-fosfato hidrolasa y fructoquinasa.

La FIG. 4 es un diagrama gráfico que muestra el crecimiento de la cepa parental MBEL55E, una cepa MptsG recombinante y una cepa MsacC recombinante en medios de sacarosa (●: MBEL55E; ▲: MptsG; y Δ: MsacC).

La FIG. 5 es un mapa de corte y empalme del vector recombinante pTac15K.

La FIG. 6 es un mapa de corte y empalme del vector recombinante pTac15KsacC que contiene un gen que codifica sacarosa-6-fosfato hidrolasa.

5 La FIG. 7 es un diagrama gráfico que muestra el crecimiento de pTac15K recombinante de *E. coli* W3110 en un medio M9 que contiene sacarosa (línea continua que incluye ●: concentración de sacarosa; y línea continua que incluye ◆: DO₆₀₀).

10 La FIG. 8 es un diagrama gráfico que muestra el crecimiento de pTac15KsacC recombinante de *E. coli* W3110 de la invención, que tiene la capacidad de metabolizar sacarosa, en un medio M9 que contiene sacarosa (línea continua que incluye ●: concentración de sacarosa; y línea continua que incluye ◆: DO₆₀₀; línea de trazos discontinuos que incluye ●: concentración de glucosa; línea continua que incluye ○: concentración de fructosa; y línea de trazos discontinuos que incluye ▼: concentración de ácido acético).

15 La FIG. 9 es un diagrama gráfico que muestra el crecimiento de pTac15KEWcscA de *E. coli* W3110 y pTac15KBSsacA de *E. coli* W3110 en medio M9 que contienen sacarosa (línea continua que incluye ●: pTac15KEWcscA de *E. coli* W3110; y línea continua que incluye ▲: pTac15KBSsacA de *E. coli* W3110).

20 La FIG. 10 es un diagrama gráfico que muestra el crecimiento y la producción de metabolitos de pTac15KsacC de *E. coli* W3110 de la invención, capaz de metabolizar sacarosa, fermentada en condiciones anaerobias (línea continua que incluye ●: concentración de sacarosa; línea continua que incluye Δ: DO₆₀₀; línea continua que incluye ▼: concentración de glucosa; línea continua que incluye ■: concentración de fructosa; línea discontinua que incluye ●: concentración de ácido succínico; línea discontinua que incluye ∇: concentración de ácido láctico, línea discontinua que incluye ■: concentración de ácido fórmico; línea discontinua que incluye ⋄: concentración de ácido acético; y línea discontinua que incluye ▲: concentración de etanol).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN Y REALIZACIONES PREFERIDAS

30 La presente invención tiene como objetivo la producción de bioproductos utilizando sacarosa (comúnmente conocida como azúcar) en calidad de una fuente de carbono económica y abundante, particularmente el descubrimiento de un microorganismo capaz de utilizar sacarosa como fuente de carbono o enzimas que permitan el uso de un microorganismo incapaz de utilizar sacarosa, y tiene como objetivo utilizar las enzimas para producir bioproductos.

35 La sacarosa, que es un disacárido que consiste en glucosa y fructosa, es una fuente de carbono globalmente abundante. Se produce a partir de la mayoría de plantas con capacidad de fotosíntesis y, en particular, caña de azúcar y remolacha azucarera que son cultivos tropicales y cultivos subtropicales que contienen grandes cantidades de sacarosa. La sacarosa se puede producir industrialmente a través de un simple proceso de evaporar y concentrar un extracto obtenido al prensar mecánicamente caña de azúcar, y más del 60% de la sacarosa del mundo está siendo actualmente producida a partir de caña de azúcar. De acuerdo con el documento (publicado en 2004) de Koutinas *et al.*, quienes calcularon los precios de diversas materias primas utilizables en la fermentación microbiana sobre la base del contenido en glucosa, el precio de la sacarosa, basado en 1 kg del contenido en glucosa es 26,1 centavos (0,19 céntimos de €), lo que corresponde a 1/4 del precio de la glucosa y a 1/2 a 2/3 de los precios de trigo y melaza (Koutinas *et al.*, *Ind. Crops and Products*, 20:75, 2004). Además, con respecto al cambio en el precio de sacarosa publicado por la Organización Internacional del Azúcar para los últimos 15 años, el precio de la sacarosa cayó bruscamente hasta 6,27 centavos/libra (0,94 céntimos de €/kilo) en 1999 después de alcanzar un pico de 13,28 centavos/libra (1,99 céntimos de €/kilo) en 1995, aumentó de nuevo hasta 14,20 centavos/libra (1,06 céntimos de €/kilo) en marzo de 2008 y se mantuvo a un nivel de 12,44 centavos/libra (0,93 céntimos de €/kilo) el 7 de mayo de 2008, y se espera que el precio de la sacarosa se encuentre en una tendencia descendente debido a un excedente de suministro. Además de esta ventaja en términos de coste, la sacarosa es ventajosa debido a que puede ser suministrada de manera relativamente estable, e incluso en circunstancias de crisis de alimentos tales como la reciente crisis de los cereales, debido a que no se obtiene a partir de cereales.

55 Hasta la fecha, se ha reseñado que la sacarosa se puede utilizar para producir diversos bioproductos, incluidos polímeros biodegradables, ácido cítrico, ácido itacónico, acetona, butanol, etanol, isopropanol y goma xantano (Lee *et al.*, *Biotechnol. Lett.*, 15:971, 1993; Lee *et al.*, *Biotechnol. Techniques*, 1:59, 1997; Forster *et al.*, *App. Microbiol. Biotechnol.*, 75:1409, 2007; George *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 45:1160, 1983; Durre, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49:639, 1998; Kautola *et al.*, *Biotechnol. Lett.*, 11:313, 1989; Letisse *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*,

55:417, 2001), mediante cultivo celular a alta concentración. Esto sugiere que una mejora en la utilidad de sacarosa puede tener una influencia directa sobre la producción eficaz de bioproductos.

5 Sin embargo, a pesar de varias ventajas de la sacarosa, incluidas ventajas como una materia prima, rara vez se ha reseñado una función para proteger proteínas frente a una modificación, y una función para proteger a células frente a entornos externos (Kilimann *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1764, 2006) ejemplos que demuestran la producción con éxito de compuestos químicos deseados a través de fermentación microbiana utilizando sacarosa como una fuente de carbono y la aplicación comercial real de la misma. Un motivo de ello es que un gran número de microorganismos no puede producir eficazmente bioproductos deseados, debido a que los microorganismos no tienen un mecanismo capaz de metabolizar sacarosa o tienen una lenta tasa metabólica, incluso aunque tengan este mecanismo. Así, con el fin de la producción de diversos compuestos químicos a través de fermentación microbiana como una tecnología no contaminante a ser aplicada con éxito en la industria, se requiere el desarrollo de microorganismos capaces de ingerir y degradar eficazmente una fuente de carbono económica y abundante tal como sacarosa. Para este fin, se debe realizar la identificación de una enzima capaz de degradarse y metabolizarse a una tasa elevada y la utilización de la misma.

20 Hasta la fecha, por parte de varios investigadores se ha desarrollado un grupo de enzimas que permiten el uso de sacarosa. Ejemplos típicos incluyen la tecnología de Ajinomoto Co. en la que se introducen un PTS (sistema fosfotransferasa dependiente de fosfoenol-piruvato) derivado de *E. coli* y un sistema de transporte de sacarosa de no PTS, y se utilizan para producir aminoácidos. Esta tecnología se ha caracterizado debido a que se introduce un grupo de genes completo asociado con PTS o no PTS completando así una invención.

25 Sin embargo, en la presente invención, basada en la información genética de *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E (KCTC 0769BP), se encontraron nuevos genes (*ptsG*, *sacC* y *rbsK*) que codifican enzimas [sacarosa fosfotransferasa (PtsG, MS0784), sacarosa-6-fosfato hidrolasa (SacC, MS0909) y fructoquinasa (RbsK, MS1233)] que están implicadas en transportar sacarosa a las células, degradar la sacarosa transportada y ligar los productos degradados a glucolisis, y se identificaron las secuencias y funciones de los mismos.

30 Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención se refiere a sacarosa fosfotransferasa que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, sacarosa-6-fosfato hidrolasa que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y fructoquinasa que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, que son enzimas que están implicadas en transportar sacarosa a las células, degradar la sacarosa transportada y ligar los productos degradados a glucolisis. La presente invención se refiere también a un gen (*ptsG*) que codifica dicha sacarosa fosfotransferasa, un gen (*sacC*) que codifica dicha sacarosa-6-fosfato hidrolasa y un gen (*rbsK*) que codifica dicha fructoquinasa.

40 En la presente invención, la sacarosa fosfotransferasa (PtsG) actúa para transportar sacarosa a las células, al tiempo que convierte la sacarosa en sacarosa-6-fosfato, la sacarosa-6-fosfato hidrolasa (SacC) tiene una actividad de convertir sacarosa-6-fosfato en glucosa-6-fosfato y fructosa, y la fructoquinasa (RbsK) tiene una actividad para convertir fructosa en fructosa-6-fosfato.

45 En la presente invención, el *ptsG* se representa por una secuencia de bases de SEQ ID NO: 2, el *sacC* se representa por una secuencia de bases de SEQ ID NO: 4 y *rbsK* se representa por una secuencia de bases de SEQ ID NO: 6.

50 Específicamente, en la presente invención se construyó un vector recombinante que contenía los genes *ptsG* y *sacC*, y luego se introdujo en *E. coli* incapaz de utilizar sacarosa como una fuente de carbono, y la *E. coli* recombinante construida se cultivó en un medio que contenía sacarosa como una única fuente de carbono. Como resultado, se encontró que la *E. coli* recombinante tenía la capacidad de metabolizar sacarosa.

55 Por consiguiente, tal como se muestra en la FIG. 1, se puede inferir que la sacarosa es transportada a las células por parte de la sacarosa fosfotransferasa (PtsG) al tiempo que se convierte en sacarosa-6-fosfato, la sacarosa-6-fosfato transportada a las células se convierte en glucosa-6-fosfato y fructosa mediante la sacarosa-6-fosfato hidrolasa (SacC), la fructosa se convierte en fructosa-6-fosfato mediante la fructoquinasa (RbsK) y el producto degradado se liga a la glucolisis.

Entretanto, los autores de la presente invención han demostrado que microorganismos que no son capaces de metabolizar sacarosa pueden metabolizar sacarosa mediante la introducción de sacarosa-6-fosfato hidrolasa (SacC, MS0909), que es una β -fructofuranosidasa derivada de *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E (KCTC

0769BP). Otros genes (*cscA* y *sacA*), que codifican β -fructofuranosidasa, representan ejemplos de producir diversos metabolitos utilizando la cepa microbiana. En otras palabras, en base a la información genética de *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E (KCTC 0769BP), *E. coli* W y *Bacillus subtilis*, se descubrieron nuevos genes (*sacC*, *cscA* y *sacA*) que codifican β -fructofuranosidasa, que una enzima implicada en la degradación de sacarosa y en el ligamiento de los productos degradados a glucólisis, y se identificaron las secuencias y funciones de los mismos. El número EC (número de la Comisión Enzimática) proporcionado por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, es un esquema de clasificación numérica bien conocido para enzimas, basado en las reacciones químicas que éstas catalizan.

El nombre oficial de sacarosa-6-fosfato hidrolasa es β -fructofuranosidasa (EC 3.2.1.26) y tiene otros nombres, incluidos β -D-fructofuranósido fructohidrolasa, invertasa, sacarasa, glucosacarasa, β -h-fructosidasa, β -fructosidasa, invertina, sacarasa, maxinvert L 1000, fructosilinvertasa, invertasa alcalina, invertasa ácida. A saber, sacarosa-6-fosfato hidrolasa y sacarasa tienen todas el nombre oficial β -fructofuranosidasa (EC 3.2.1.26).

Dicha β -fructofuranosidasa cataliza la hidrólisis de residuos β -D-fructofuranósido no reductores terminales para dar β -D-fructofuranósido. Tiene el nombre oficial "sacarasa o invertasa" cuando cataliza la hidrólisis de sacarosa, y tiene el nombre oficial de "sacarosa-6-fosfato hidrolasa" cuando cataliza la hidrólisis de sacarosa-6-fosfato.

En Ejemplos de esta memoria, además de demostrar la capacidad metabolizante de sacarosa provocada por la introducción de sacarosa-6-fosfato hidrolasa (EC 3.2.1.26, SacC) derivada de *Mannheimia*, es decir, β -fructofuranosidasa, se realizó un intento de demostrar que la introducción de β -fructofuranosidasa general en microorganismos imparte la capacidad metabolizante de sacarosa a los microorganismos. Como resultado, cuando cada una de la invertasa derivada de *E. coli* W (EC 3.2.1.26, CscA) y β -fructofuranosidasa derivada de *Bacillus subtilis* se introdujo en microorganismos incapaces de metabolizar sacarosa, se observó que los microorganismos a los que se había introducido β -fructofuranosidasa (EC 3.2.1.26) se desarrollaban metabolizando sacarosa.

Por consiguiente, la descripción se refiere a β -fructofuranosidasa con actividades de hidrolizar el enlace β -D-fructofuranósido para liberar fructosa, incluida una actividad de hidrolizar sacarosa para formar glucosa y fructosa y una actividad para hidrolizar sacarosa-6-fosfato para producir glucosa-6-fosfato y fructosa. También, la β -fructofuranosidasa puede tener una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 9.

Específicamente, en la presente invención, sacarosa-6-fosfato hidrolasa (SacC) tiene una actividad de convertir sacarosa-6-fosfato en glucosa-6-fosfato y fructosa o una actividad para convertir sacarosa en glucosa y fructosa. También se utilizó β -fructofuranosidasa derivada de *Mannheimia* con una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y un gen (*sacC*) que codifica la misma se representa por una secuencia de bases de SEQ ID NO: 4.

En la presente descripción, invertasa, sacarasa y sacarosa hidrolasa (CscA), que son ejemplos de la β -fructofuranosidasa, son enzimas que están implicadas en degradar sacarosa y en ligar los productos degradados a glucólisis, y estas enzimas tienen una actividad para convertir sacarosa-6-fosfato en glucosa-6-fosfato y fructosa, o una actividad para convertir sacarosa en glucosa y fructosa. Además, en los Ejemplos se ilustró la β -fructofuranosidasa derivada de *E. coli* W y puede tener una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, y un gen (*cscA*) que codifica la misma se representa preferiblemente por una secuencia de bases de SEQ ID NO: 8.

Sacarosa-6-fosfato hidrolasa (SacA), que es un ejemplo de la β -fructofuranosidasa, es una enzima que está implicada en la degradación de sacarosa y en ligar los productos degradados a glucólisis, y tiene una actividad para convertir sacarosa-6-fosfato en glucosa-6-fosfato y fructosa, y una actividad para convertir sacarosa en glucosa y fructosa. En los Ejemplos, se ilustró la β -fructofuranosidasa derivada de *Bacillus subtilis*, y puede tener una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, y un gen (*sacA*) que codifica la misma se representa preferiblemente por una secuencia de bases de SEQ ID NO: 10 (*sacA*, BSU38040, sacarosa-6-fosfato hidrolasa).

Además de ello, cuando se comparó la secuencia de aminoácidos de la β -fructofuranosidasa derivada de *Mannheimia*, codificada por el gen *sacC*, con la secuencia de aminoácidos de enzimas investigadas a través de BLAST para proteínas, la invertasa codificada con *cscA* derivada de *E. coli* W tiene una identidad de la secuencia de aminoácidos de 28%, y sacarosa-6-fosfato hidrolasa (β -fructofuranosidasa) codificada por *sacA* derivada de *Bacillus subtilis* tiene una identidad de la secuencia de aminoácidos de 35%. También, las β -fructofuranosidasas derivadas de las dos cepas tienen todas el dominio conservado β -fructosidasa (COG1621) designado como "SacC". Esto indica que cuando cualquier enzima que tenga una secuencia de aminoácidos algo diferente de la β -

fructofuranosidasa derivada de *Mannheimia* codificada por el gen *sacC*, pero que contiene el dominio conservado de β -fructosidasa (COG1621) designado como "SacC" se introduce en microorganismos según se describe abajo, los microorganismos pueden crecer metabolizando sacarosa. Por lo tanto, a pesar de que la β -fructofuranosidasa ha sido ilustrada por una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 7 ó 9, el alcance de la presente invención no está limitado a la misma. A saber, en el alcance de la presente invención pueden incluirse β -fructofuranosidasas en tanto que tengan una actividad para hidrolizar el enlace β -D-fructofuranósido para liberar fructosa. Por ejemplo, en el alcance de la presente invención también se pueden incluir secuencias de aminoácidos que tengan una identidad de la secuencia de aminoácidos de al menos 70%, 80% ó 90% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, 7 ó 9.

De igual manera, el gen que codifica la β -fructofuranosidasa puede tener, por ejemplo, una secuencia de bases de SEQ ID NO: 4, 8 ó 10. ADN que comprende una mutación (sustitución, delección, inserción o adición) en una o más bases en estas secuencias y tiene una identidad de secuencia de al menos 70% u 80%, preferiblemente 90%, y más preferiblemente 95% en comparación con la secuencia de bases de acuerdo con la presente invención.

La expresión "identidad de la secuencia", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una similitud de la secuencia entre dos polinucleótidos o dos moléculas de ácidos nucleicos. La identidad de la secuencia puede determinarse comparando dos secuencias óptimamente alineadas a lo largo de una ventana de comparación, en que el fragmento del polinucleótido o de la secuencia de aminoácidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o delecciones (p. ej. huecos o colgantes) en comparación con la secuencia de referencia (p. ej. una secuencia consenso) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje de identidad de las secuencias puede calcularse determinando el número de posiciones en las que aparece la base de ácido nucleico o residuo aminoácido idéntico en ambas secuencias para proporcionar el número de posiciones apareadas, dividiendo el número de posiciones apareadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de las secuencias. La identidad de las secuencias entre secuencias de ácidos nucleicos o aminoácidos se puede medir utilizando el software de análisis de las secuencias, por ejemplo BLASTN o BLASTP.

En la presente invención, tal como se describe arriba, se sabe que la sacarosa, que es un disacárido que consiste en D-glucosa y D-fructosa, funciona para evitar la modificación de proteínas en células, estabilizar proteínas en células y minimizar la lisis de células provocada por el cambio en entornos externos. Así, sacarosa es muy útil en la producción de elevadas concentraciones de compuestos químicos de carácter básico o en un cultivo de células a alta concentración.

Tal como se muestra en la FIG. 2, cuando sacarosa-6-fosfato hidrolasa, que es una nueva β -fructofuranosidasa derivada de *M. succiniciproducens* MBEL55E, se introduce en microorganismos incapaces de metabolizar sacarosa, se piensa que la enzima introducida metaboliza sacarosa o sacarosa-6-fosfato a través de cuatro posibles vías.

La primera vía posible (Reacción I) es el caso en el que la sacarosa-6-fosfato hidrolasa degrada sacarosa para formar glucosa y fructosa en el espacio extracelular de células, y luego los productos degradados se introducen en células mediante enzimas que están implicadas en el transporte tal como la respectiva fosfotransferasa.

La segunda vía posible (Reacción II) es el caso en el que sacarosa-6-fosfato hidrolasa degrada sacarosa para formar glucosa y fructosa en el periplasma, y luego los productos degradados se introducen en células mediante enzimas que están implicadas en el transporte tal como la respectiva fosfotransferasa.

La tercera vía posible (Reacción III) es el caso en el que sacarosa se introduce en células mediante la enzima permeasa, distinta a la familia de las fosfotransferasas, y luego es degradada por la sacarosa-6-fosfato hidrolasa para formar glucosa y fructosa.

La cuarta vía posible (Reacción IV) es el caso en el que la sacarosa se convierte en sacarosa-6-fosfato mediante fosfato transferasa al tiempo que es introducida en células, y luego se convierte en fructosa y glucosa-6-fosfato por la sacarosa-6-fosfato hidrolasa introducida.

También, el gen *sacC* se deriva de *M. succiniciproducens* MBEL55E (KCTC 0769BP) que pertenece a la familia *Pasteurellaceae*, junto con *Actinobacillus succinogenes* 130Z (ATCC 55618). Particularmente, dicho *M. succiniciproducens* MBEL55E (KCTC 0769BP) y *A. succinogenes* 130Z (ATCC 55618) tienen secuencias genómicas y fisiologías de las células similares. Se sabe que las secuencias genómicas de las dos cepas

microbianas son muy similares entre sí entre todas las secuencias genómicas descodificadas hasta la fecha (McKinlay *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76:727, 2007). También, se sabe el gen *sacC* derivado de *A. succinogenes* 130Z tiene una homología muy elevada con uno derivado de *M. succiniciproducens* MBEL55E y es lo más similar al mismo. Así, resulta obvio para los expertos en la técnica que se pueden emplear de igual manera una enzima sacarosa-6-fosfato hidrolasa (*SacC*, MS0909) derivada de *M. succiniciproducens* MBEL55E y un gen que codifica la misma, y una sacarosa-6-fosfato hidrolasa derivada de *A. succinogenes* 130Z (*Asuc_1829*) y un gen que codifica la misma.

Por consiguiente, todavía en otro aspecto, la presente invención se refiere a un microorganismo recombinante capaz de metabolizar sacarosa, en el que se introduce un gen que codifica sacarosa fosfotransferasa y/o sacarosa-6-fosfato hidrolasa, y un método para producir metabolitos, polímeros biodegradables o proteínas recombinantes, que comprende cultivar dicho microorganismo recombinante en un medio que contenga sacarosa como una fuente de carbono.

En la presente invención, el vector recombinante, que es un vector capaz de expresar una proteína en una célula hospedante adecuada, se refiere a una construcción de ADN que contiene una secuencia de ADN operativamente enlazada a secuencias control capaces de controlar la expresión de una proteína junto con otras secuencias que facilitan la manipulación de genes, optimizan la expresión de proteínas o se requieren para la replicación del vector. Las secuencias control pueden incluir un promotor para regular la transcripción, un operador opcionalmente añadido para regular la transcripción, un sitio de unión al ribosoma de ARNm adecuado y/o secuencias que controlan la terminación de las transcripción/traducción.

Por ejemplo, el vector recombinante puede ser un vector recombinante tal como pTrc99A utilizado en los Ejemplos de la presente invención, pero además de este vector, se pueden utilizar en la presente invención otros vectores conocidos. También, una casete de expresión que contiene el gen *sacC* se puede insertar no sólo en vectores de expresión tales como pKK223-3, pTac99A, la serie pET o la serie pMAL, sino también en vectores de clonación tales como pACYC, pBluescript SK-, pBR322, la serie pGEM o pMB1, y vectores de expresión de este tipo se pueden utilizar en la presente invención. Además, es posible utilizar vectores recombinantes que se conocen en la técnica a la que pertenece la presente invención (Sambrook J y Russell D, *Molecular Cloning: a laboratory manual* 3ª ed., Cold Spring Harbor Lab (CSHL) Press, Nueva York, 2001). Además de ello, también se pueden utilizar en la presente invención vectores que contengan, además de un gen resistente a ampicilina, varios otros genes resistentes conocidos en la técnica.

Los genes arriba descritos se derivan de *M. succiniciproducens* MBEL55E (KCTC 0769BP) que pertenece a la familia *Pasteurellaceae*, junto con *Actinobacillus succinogenes* 130Z (ATCC 55618). Particularmente, las dos cepas, *M. succiniciproducens* MBEL55E (KCTC 0769BP) y *A. succinogenes* 130Z (ATCC 55618) tienen secuencias genómicas y fisiologías de las células muy similares. De acuerdo con el informe (2007) de McKinlay *et al.*, se sabe que las secuencias genómicas de las dos cepas microbianas son lo más similares entre sí entre todas las secuencias genómicas descodificadas hasta la fecha (*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76:727, 2007). Así, resulta obvio para los expertos en la técnica que los genes anteriores se aplican también a genes derivados de *A. succinogenes* 130Z (ATCC 55618) junto con *M. succiniciproducens* MBEL55E (KCTC 0769BP).

En Ejemplos de la presente invención, un microorganismo incapaz de utilizar sacarosa como una fuente de carbono se transformó utilizando un vector recombinante que contenía los genes *ptsG*, *sacC* y *rbsK*, construyendo así un microorganismo recombinante con la capacidad de metabolizar sacarosa. Sin embargo, también se puede construir un microorganismo recombinante tratado mediante ingeniería del genoma, insertando los genes anteriores en el cromosoma de un microorganismo incapaz de utilizar sacarosa como fuente de carbono de acuerdo con un método bien conocido en la técnica.

En la presente invención, se construyó un vector recombinante que contenía genes que codifican β -fructofuranosidasa, incluido el gen *sacC*, y luego se introdujo en *E. coli* incapaz de utilizar sacarosa como fuente de carbono, y el microorganismo recombinante construido se cultivó en un medio que contenía sacarosa como una única fuente de carbono. Como resultado, se encontró que el microorganismo recombinante tenía la capacidad de metabolizar sacarosa. Todavía en otro aspecto, la presente invención se refiere a dicho vector recombinante, a un microorganismo recombinante transformado con el vector recombinante y capaz de metabolizar sacarosa, y un método para producir metabolitos, polímeros biodegradables o proteínas recombinantes utilizando dicho microorganismo recombinante.

El vector recombinante puede ser un vector recombinante con un mapa de corte y empalme de la FIG. 5, pero

además del vector pTac15K mostrado en la FIG. 5, se pueden utilizar en la presente invención otros vectores conocidos. Además de ello, una casete de expresión que contiene genes que codifican β -fructofuranosidasa, incluido el gen *sacC* se puede insertar no sólo en pTrc99A, pTac99A o la serie pMAL, sino también en vectores de clonación tales como pACYC, pBluescript SK-, pBR322, la serie pGEM o pMB1, y los vectores recombinantes se pueden emplear en la presente invención. Además, es posible también utilizar vectores recombinantes que se conocen en la técnica a la que pertenece la presente invención (Sambrook J y Russell D, Molecular Cloning: a laboratory manual 3ª ed., Cold Spring Harbor Lab (CSHL) Press, Nueva York, 2001). Además de ello, también se pueden utilizar en la presente invención, vectores que contienen, además de un gen resistente a canamicina, varios otros genes resistentes conocidos en la técnica.

En Ejemplos, un microorganismo incapaz de utilizar sacarosa como fuente de carbono se transformó utilizando un vector recombinante que contenía los genes *sacC*, *cscA* y *sacA*, construyendo así un microorganismo recombinante capaz de metabolizar sacarosa. Sin embargo, también se puede construir un microorganismo recombinante capaz de metabolizar sacarosa insertando los genes anteriores en el cromosoma de un microorganismo incapaz de utilizar sacarosa como una fuente de carbono de acuerdo con un método conocido en la técnica. Además, en Ejemplos de la presente invención, únicamente se ilustró una cepa de *E. coli* específica como un microorganismo hospedante incapaz de utilizar sacarosa como fuente de carbono, resultará obvio para los expertos en la técnica que se puede obtener el mismo resultado que en el caso de utilizar la cepa de *E. coli* anterior, incluso si los genes anteriores se introducen no sólo en otras cepas de *E. coli*, sino también en microorganismos hospedantes incapaces de utilizar sacarosa como una fuente de carbono, incluidos bacterias, levaduras y hongos.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "metabolito" se refiere a una colección de compuestos intermedios y productos que se producen a través de procesos metabólicos. Los metabolitos se clasifican en metabolitos primarios y metabolitos secundarios. Por ejemplo, la presente invención se puede aplicar de diversas maneras a un microorganismo recombinante o tratado mediante ingeniería del genoma, incapaz de utilizar sacarosa con el fin de producir biocombustibles, metabolitos primarios y secundarios, polímeros biodegradables y proteínas recombinantes. Para la producción, por ejemplo, de butanol (Atsumi *et al.*, *Nature.*, 451:7174, 2008), etanol (Lindsay *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:70, 1995) y ácido láctico (Zhou, *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:399 2003) y ácido succínico y ácido málico (Jantama *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 99:1140, 2008), aminoácidos (Park *et al.* *PNAS*, 104:7797, 2006; Lee *et al.*, *Molecular Systems Biology*, 3:1, 2007), polímeros biodegradables (Ahn *et al.*, *Appl. Environl. Microbiol.*, 66:3624, 2000; Park *et al.*, *Biomacromolecules*, 2:248, 2001; Park *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 74:81, 2001), proteínas recombinantes (Jeong *et al.*, *Appl. Environl. Microbiol.*, 65:3027; 1999; Han *et al.*, *Appl. Environl. Microbiol.*, 69:5772, 2003), la glucosa ha sido utilizada como una fuente de carbono principal en la técnica anterior para producir los bioproductos deseados; sin embargo, cuando los genes de la presente invención se introducen en las cepas microbianas conocidas, los bioproductos deseados se pueden producir utilizando sacarosa como una fuente de carbono.

Además, una persona experta en la técnica también puede emplear fácilmente la presente invención para producir polímeros biodegradables y proteínas recombinantes. En Ejemplos de la presente invención, la producción de metabolitos tales como treonina se ilustró a modo de ejemplo, pero resultará obvio para una persona experta en la técnica que la presente invención también se puede emplear fácilmente para la producción de polímeros biodegradables, proteínas recombinantes y similares.

Ejemplos

En lo que sigue, la presente invención se describirá con mayor detalle haciendo referencia a ejemplos. Ha de entenderse, sin embargo, que estos ejemplos son únicamente para fines ilustrativos y no han de considerarse que limitan el alcance de la presente invención.

Particularmente, en Ejemplos que figuran a continuación, una cepa de *E. coli* específica se ilustró como una cepa hospedante incapaz de metabolizar sacarosa con el fin de expresar los genes de la presente invención, pero resultará obvio para una persona experta en la técnica que, incluso si se utilizan otras cepas de *E. coli* o microorganismos de otras especies, se pueden producir metabolitos, incluida sacarosa, introduciendo los genes de la presente invención, que están implicados en el metabolismo de sacarosa, en los microorganismos y cultivando los microorganismo recombinantes.

Ejemplo 1: Examen de la capacidad de los genes *ptsG*, *sacC* y *rbsK* de metabolizar sacarosa

1.1: Aislamiento de los genes *ptsG*, *sacC* y *rbsK*

Con el fin de examinar si los genes (*ptsG*, *sacC* y *rbsK*) de acuerdo con la presente invención están implicados juntos en el metabolismo de sacarosa, se aislaron los genes a partir de *M. succiniciproducens* MBEL55E (KCTC 0769BP).

Primero, el ADN de *ptsG* (MS0784) se amplificó mediante PCR utilizando el ADN genómico de *M. succiniciproducens* MBEL55E (KCTC 0769BP) como un molde con cebadores de SEQ ID NOS: 11 y 12. De igual manera, los ADNs de *sacC* (MS0909) y *rbsK* (MS1233) se amplificaron mediante PCR utilizando un conjunto de cebadores de SEQ ID NOS: 13 y 14, y un conjunto de cebadores de SEQ ID NOS: 15 y 16, respectivamente, y se llevó a cabo una PCR solapante utilizando una mezcla de los fragmentos de ADN como un molde con cebadores de SEQ ID NOS: 13 y 16. Los *ptsG* (MS0784), *sacC* (MS0909) y *rbsK* (MS1233) son genes que codifican sacarosa fosfotransferasa, sacarosa-6-fosfato hidrolasa y fructoquinasa, respectivamente.

SEQ ID NO: 11: 5'-GGAATTCATGCTCGTTTTAGCTAGAATTGG

SEQ ID NO: 12: 5'-TCCGAGCTCTTACTATTCTTTTGGCTTAGCTCTTG

SEQ ID NO: 13: 5'-ACCTGCGAGCTCTTTCACACAGGAAACAATTTTCATGCG
GTCGTTTTTACCG

SEQ ID NO: 14: 5'-CAAATTTTGTGTCATATGCATGAAATCTGTTTCCTGTG
TGAAATACTATTTATATTCAATTTCTTTCGGATA

SEQ ID NO: 15: 5'-TATCCGAAAGAAATTGAATATAAATAGTAATTTACACACA
GGAAACAGATTTTCATGCATATGACAAACAAAATTTG

SEQ ID NO: 16: 5'-ACCTGCGGGTACCCTATTAGTTTGCTAAAAATTCCGCT

1.2: Construcción del vector recombinante pMSscrIIA

Con el fin de expresar los genes derivados de *Mannheimia*, *ptsG* (MS0784), *sacC* (MS0909) y *rbsK* (MS1233) que codifican sacarosa fosfotransferasa, sacarosa-6-fosfato hidrolasa y fructoquinasa, respectivamente, se construyó en *E. coli* un vector de expresión de la siguiente manera.

Un fragmento de ADN que contiene los genes *sacC* (MS0909) y *rbsK* (MS1233) amplificado en el Ejemplo 1.1 se digirió con las enzimas de restricción *SacI* y *KpnI* y se ligó en pTrc99A (Pharmacia, Biotech., Uppsala, Suecia) digerido con las mismas enzimas de restricción, construyendo así pTrc99AsacCrbsK.

Después, el fragmento de ADN de *ptsG* (MS0784) obtenido en el Ejemplo 1.1, se digirió con *EcoRI* y *SacI* y se ligó en un vector de expresión pTrc99AsacCrbsK digerido con las mismas enzimas de restricción, construyendo así pTrc99AptsGsacCrbsK. El vector construido se denominó "pMSscrIIA" (FIG. 3).

1.1: Construcción de las cepas de *Escherichia coli* W3110 pMSscrIIA y W3110 pTrc99A

Se llevó a cabo el siguiente experimento utilizando como un microorganismo modelo *E. coli* W3100 que es una subcepa de *E. coli* K-12 conocida por ser incapaz de metabolizar sacarosa.

E. coli W3110 se extendió en placas en medio sólido LB y se cultivó a 37°C durante 8 horas, y la colonia se inoculó en 10 ml de medio líquido LB y se cultivó durante 8 horas. El caldo de cultivo se inoculó en 100 mL de medio líquido LB a razón de 1% (v/v) y se cultivó en una incubadora con agitación a 37°C.

Después de aproximadamente 2 horas, cuando el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,30-0,35, éste se dejó reposar en hielo durante 20 minutos para detener el crecimiento de las células. El caldo de cultivo se centrifugó a 4°C a 3.000 rpm durante 15 minutos para recoger las células, y luego las células se suspendieron en 32 ml de disolución RFI a 4°C. La suspensión se centrifugó a 4°C a 3.000 rpm durante 15 minutos para recoger las células. Las células se re-suspendieron en 8 ml de disolución RFI, y luego se dejaron reposar en hielo durante 15 minutos. Finalmente, la re-suspensión se dispensó en una cantidad de 100 µl/pocillo y se almacenó a -70°C. La composición de la composición de RFI consistía en RbCl 100 mM, MnCl₂·4H₂O 50 mM, CH₃COOK 0,1 M, CaCl₂

10 mM y glicerol al 15% (p/v) y se ajustó a pH 5,8 mediante la adición de acetato 0,2 M. La disolución de RFII consistía en MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 100 mM y glicerol al 15% (p/v) y se ajustó a pH de 6,8 mediante la adición de NaOH.

5 El vector de expresión pMSscrIIA construido en el Ejemplo 1.2 o pTrc99A (Pharmacia Biotech., Uppsala, Suecia) como testigo, se añadió a la cepa *E. coli* W3110, y luego la cepa se sometió a una transformación por choque térmico a 42°C durante 90 segundos, transformando así la cepa. Después de la transformación por choque térmico, se añadieron 0,8 ml de medio líquido LB a la cepa, y la cepa se cultivó en una incubadora con agitación a 37°C durante 1 hora.

10 El caldo de cultivo se extendió en placas en un medio LB sólido que contenía antibiótico ampicilina (concentración final: 50 µg/L) y se cultivó a 37°C durante 12 horas o más. Las colonias de *E. coli* W3110 pMSscrIIA y de *E. coli* W3110 pTrc99A formadas se inocularon en medio LB líquido y se cultivaron a 37°C durante 8 horas o más. Con el fin de confirmar si el vector se introducía con éxito, el vector se aisló a partir de la cepa cultivada utilizando el plásmido SV GeneAll^R (GeneAll Biotechnology, Corea) y se sometió a electroforesis. La cepa de *E. coli* W3110 pMSscrIIA se secuenció en Solgent Co. (Corea) utilizando los cebadores SEQ ID NOS: 17 a 24, examinando así si las secuencias base de la cepa eran consistentes con las secuencias base de los genes.

SEQ ID NO: 17: 5'-GGAAACAGACCATGGAATTC

SEQ ID NO: 18: 5'-CCGCAAAAGATTTATTCGAAGAAG

SEQ ID NO: 19: 5'-CCTGGTTATATGATACTTTAGG

SEQ ID NO: 20: 5'-TAGTGCTGGGCGCAAGAGCTAACG

SEQ ID NO: 21: 5'-ACCAGTGGGCGATAAAAATCG

SEQ ID NO: 22: 5'-TGATCAAGGTTTCGATTTCT

SEQ ID NO: 23: 5'-TTTTCTGAATGACGGCGAA

SEQ ID NO: 24: 5'-CGATCTGCCGCAATTTCAAG

20

1.4: Examen de la capacidad de *E. coli* recombinante de metabolizar sacarosa

25 Las colonias de *E. coli* W3110 pMSscrIIA y *E. coli* W3110 pTrc99A en medio sólido, construidas en el Ejemplo 1.3, se inocularon en un medio mínimo M9 que contenía 5 g/L de sacarosa como una única fuente de carbono y se cultivaron a 37°C durante 16 horas. Después, el caldo de cultivo se inoculó en 100 ml de un medio mínimo M9 que contenía sacarosa al 3% (v/v) y luego se cultivó a 37°C. A ello, en calidad de antibiótico, se añadió ampicilina hasta una concentración final de 50 µg/L. El medio mínimo M9 consistía en 33,9 g/L de Na₂HPO₄, 15 g/L de KH₂PO₄, 2,5 g/L de NaCl, 5 g/L de NH₄Cl y 0,36 g/L de MgSO₄. La concentración de células en el medio de cultivo se midió como DO₆₀₀ utilizando un espectrofotómetro. Durante el período de cultivo, se recogió periódicamente una muestra, la muestra recogida se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos y después la concentración de sacarosa en el sobrenadante se analizó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

35 Como resultado, tal como se muestra en la Tabla 1, la cepa de *E. coli* W3110 pTrc99A no podía crecer en el medio mínimo M9 que contenía sacarosa como única fuente de carbono, pero la cepa de *E. coli* W3110 pMSscrIIA mostraba una capacidad excelente de metabolizar sacarosa. La cepa de *E. coli* W3110 pMSscrIIA metabolizaba aproximadamente 2,2 g/L de sacarosa durante 19 horas, indicando un incremento en la biomasa de 3,12 basado en la DO₆₀₀, y producía 0,67 g/L de ácido acético como subproducto. Así, se confirmó que, cuando un microorganismo contiene todos los genes *ptsG*, *sacC* y *rbsK*, éste muestra una excelente capacidad de metabolizar sacarosa.

40

Tabla 1

Cepa	Plásmido	Crecimiento en	Sacarosa que	Concentración de sacarosa (g/L)
------	----------	----------------	--------------	---------------------------------

		medio mínimo M9 + 5 g/L de sacarosa	utiliza el fenotipo	0 h	19 h
<i>E. coli</i> W3110	pTrc99A	-	scr-	5,23	5,22
<i>E. coli</i> W3110	pMSscrIIA	+	scr+	6,73	4,53

5 Tal como se describe antes, cuando el gen sacarosa fosfotransferasa o una combinación del gen fosfotransferasa sacarosa con el gen sacarosa-6-fosfato hidrolasa se introdujo en el microorganismo incapaz de metabolizar sacarosa, el microorganismo tenía la capacidad de metabolizar sacarosa y, además, producía ácido acético como un metabolito utilizando sacarosa como una fuente de carbono.

10 Por consiguiente, cualquier persona experta en la técnica también puede emplear fácilmente la presente invención para la producción, además de ácido acético, de ácido láctico, ácido succínico, etanol, biocombustible y biobutanol con contenido en bioenergía, polímeros biodegradables y proteínas recombinantes.

Ejemplo 2: Examen de la capacidad de cada uno de los genes *ptsG* y *sacC* de metabolizar sacarosa

2.1: Construcción del vector recombinante para examinar la capacidad del gen *ptsG* y del gen *sacC* de metabolizar sacarosa

15 Con el fin de examinar si los genes *ptsG* y *sacC* de la presente invención están implicados por sí solos en la capacidad de metabolizar sacarosa, se construyeron un vector (pSacHR06ptsG) para la delección de *ptsG* (MS0784) y un vector (pSacHR06sacC) para la delección de *sacC* (MS0909) y se sometieron a un experimento de inactivación.

20 Primero, con el fin de interrumpir el gen sacarosa fosfotransferasa (*ptsG*) mediante recombinación homóloga, se construyó un vector de intercambio de genes de la siguiente manera. La región del brazo homólogo de la izquierda se amplificó utilizando el ADN genómico de *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E (KCTC 0769BP) en calidad de un molde con cebadores de SEQ ID NOS: 25 y 26; y la región del brazo homólogo de la derecha se amplificó utilizando los cebadores de SEQ ID NOS: 27 y 28; un fragmento de ADN que contenía un marcador antibiótico y un sitio lox mutante se amplificó utilizando un vector pECmulox (Kim *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 278:78, 2008) en calidad de un molde con cebadores de SEQ ID NOS: 29 y 30. Estos tres fragmentos de ADN se amplificaron mediante PCR solapante utilizando los cebadores de SEQ ID NOS: 25 y 28.

SEQ ID NO: 25: 5'-ATATCTGCAGCCGGCATTAAATATTAGTCAAC

SEQ ID NO: 26: 5'-CGTTCTAACGGAGGTTGAAAACCTGCCCTTT

SEQ ID NO: 27: 5'-GTCTCCCTATCACGCCGTTATTTTCATTATT

SEQ ID NO: 28: 5'-ATTAGTCGACACCATCCCCACGGAATACAT

SEQ ID NO: 29: 5'-TTTCAACCTCCGTTAGAACGCGGCTACAAT

30 SEQ ID NO: 30: 5'-TAACGGCGTGATAGGGAGACCGGCAGATCC

El fragmento de ADN final, así amplificado, se digirió con las enzimas de restricción *Pst*I y *Sal*I y se clonó en el vector pSacHR06 (Park *et al.*, *PNAS*, 104:7797, 2007) digerido con las mismas enzimas, construyendo así pSacHR06ptsG. Además, pSacHR06sacC se construyó de la misma manera que la antes descrita utilizando los cebadores de SEQ ID NOS: 31 a 36.

35

SEQ ID NO: 31: 5'-ATACACTGCAGTTATGCAATTTATCGCACCC

SEQ ID NO: 32: 5'-AATCTGCTCTGATGCGGTCGTGAAATGCTTCCA

SEQ ID NO: 33: 5'-CACAGAATCAGGACAAATGGCATTCAATGCTG

SEQ ID NO: 34: 5'-ATACTGTCTGACTCAATGGCATATGCAGCG

SEQ ID NO: 35: 5'-AAGCATTTCACGACCGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAG

SEQ ID NO: 36: 5'-TTGAATGCCATTTGTCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTAC

2.2: Construcción de cepas *M. succiniciproducens* MptsG y *M. succiniciproducens* MsacC

5 Utilizando cada uno del vector de intercambio pSacHR06ptsG para la delección del gen *ptsG* y el vector de intercambio pSacHR06sacC para la delección del gen *sacC*, construidos en el Ejemplo 2.1, los genes se suprimieron del genoma de *M. succiniciproducens* MBEL55E (KCTC 0769BP) de acuerdo con el método reseñado por Kim *et al.* (*FEMS Microbiol. Lett.*, 278:78, 2008), construyendo así las cepas mutantes *M. succiniciproducens* MptsG y *M. succiniciproducens* MsacC.

10 Específicamente, *M. succiniciproducens* MBEL55E (KCTC 0769BP) se extendió en un medio de LB-glucosa sólido que contenía 10 g/L de glucosa y se cultivó a 37°C durante 36 horas. Después, la colonia se inoculó en 10 ml de medio líquido de LB-glucosa y se cultivó durante 12 horas. El cultivo de células suficientemente desarrollado se inoculó en 100 ml de medio de LB-glucosa líquido al 1% (v/v) y se cultivó en una incubadora con agitación a 200 rpm a 37°C.

15 Cuando el caldo de cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,3-0,4 después de aproximadamente 4-5 horas, se centrifugó a 4°C a 4.500 rpm durante 20 minutos para recoger las células, y luego las células se re-suspendieron en 200 ml de disolución de glicerol al 10% a 4°C. La re-suspensión se centrifugó a 4°C a 5.500 rpm durante 20 minutos para recoger las células. El proceso de re-suspensión se repitió dos veces al tiempo que se reducía hasta la mitad la disolución de glicerol, y luego las células se re-suspendieron en disolución de glicerol a una relación en volumen de 1:1 para obtener un concentrado de células. El concentrado de células se mezcló con cada uno de los vectores de intercambio de genes pSacHR06ptsG o pSacHR06sacC construidos en el Ejemplo 2.1, y luego se sometió a electroporación en las condiciones de 2,5 kV, 25 µF y 400 ohmios, introduciendo así cada uno de los genes en la *M. succiniciproducens* cultivada. Después de la electroporación, el 1 ml de medio de LB-glucosa líquido se añadió a la cepa y luego la cepa se cultivó en una incubadora con agitación a 200 rpm a 37°C durante 1 hora. El caldo de cultivo se extendió en un medio de LB-glucosa sólido que contenía antibiótico cloranfenicol (concentración final: 6,8 µg/L) y se cultivó a 37°C durante 48 horas o más. Con el fin de seleccionar una colonia en la que sólo se produjera un sobrecruzamiento doble, las colonias formadas se estriaron en medio LB-sacarosa (medio LB que contenía 100 g/L de sacarosa) que contenía cloranfenicol (concentración final: 6,8 µg/L). Después de 24 horas, las colonias formadas se estriaron de nuevo sobre la misma placa.

20 La colonia (mutante) formada sobre la placa se cultivó en medio de LB-glucosa líquido que contenía un antibiótico, y un ADN genómico se aisló de la cepa cultivada por el método descrito en Rochelle *et al.* (*FEMS Microbiol. Lett.*, 100:59, 1992). La PCR se realizó utilizando el ADN genómico mutante aislado en calidad de un molde, y el producto de la PCR se sometió a electroforesis para confirmar la delección de *ptsG* y *sacC* en cada una de las cepas mutantes.

25 Con el fin de confirmar la delección de *ptsG* en la cepa MptsG, se realizaron PCRs utilizando un conjunto de cebadores de SEQ ID NOS: 37 y 38 y un conjunto de cebadores de SEQ ID NOS: 39 y 40, respectivamente. Con el fin de confirmar la delección de *sacC* en la cepa MsacC, se realizaron PCRs utilizando un conjunto de cebadores de SEQ ID NOS: 39 y 40 y un conjunto de cebadores de SEQ ID NOS: 41 y 42, respectivamente.

SEQ ID NO: 37: 5'-CGGGGCGAAAGTGATTGAGA

SEQ ID NO: 38: 5'-AATTGCCGCCTGGGTATTGG

SEQ ID NO: 39: 5'-ACCTTTACTACCGCACTGCTGG

SEQ ID NO: 40: 5'-GCGGGAGTCAGTGAACAGGTAC

SEQ ID NO: 41: 5'-GATCTTGAGTCCGTA AACAGGCTT

SEQ ID NO: 42: 5'-TTCCGCTCAAGCCATTGTAGTG

2.3: Comparación del crecimiento entre la cepa MptsG, la cepa MsaC y la cepa parental (MBEL55E)

5 Cada una de las cepas MptsG y MsaC recombinantes construidas en el Ejemplo 2.2 se cultivó en BHI (infusión cerebro-corazón Bacto™; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD) durante aproximadamente 8 horas, y 10 ml del caldo de cultivo se inocularon en 300 ml de medio de cultivo MH5S (por cada litro: 2,5 g de extracto de levadura, 2,5 g de polipeptona, 1 g de NaCl, 8,7 g de K₂HPO₄, 10 g de NaHCO₃, 0,02 g de CaCl₂·2H₂O, 0,2 g de MgCl₂·6H₂O y 10 g de sacarosa), y las curvas de crecimiento de las cepas se compararon con la curva de
10 crecimiento de la cepa parental MBEL55E cultivada en las mismas condiciones. La FIG. 4 es un conjunto de curvas de crecimiento de las cepas MBEL55E (●), MptsG (▲) y MsaC (Δ), medidas como DO₆₀₀. Tal como se muestra en la FIG. 4, la capacidad de crecimiento de la cepa parental (MBEL55E) en el medio de sacarosa desaparecía sustancialmente cuando se suprimieron de la cepa cada uno de los genes. Esto indica que cada uno de los genes es esencial para el crecimiento de la cepa en el medio de sacarosa.

15 Mientras tanto, el gen *rbsK* que codifica fructoquinasa (RbsK, MS1233) se sometió al mismo experimento que el descrito anteriormente, y no se observó cambio alguno en el crecimiento tal como una disminución en la tasa de crecimiento. También, en resultados de medición para la actividad enzimática, la cepa parental y la cepa a la que se ha suprimido *rbsK* no mostraron grandes diferencias en la actividad enzimática entre ellas y tenían niveles de
20 actividad enzimática que eran muy inferiores a los de la fructoquinasa general. A saber, las dos cepas mostraron actividades enzimáticas despreciables. En base a estos resultados, se infiere que el gen *rbsK* no codifica fructoquinasa o tiene una actividad muy débil, incluso a pesar de que codifique fructoquinasa.

2.4: Comparación de actividades enzimáticas de las cepas MptsG y MsacC y la cepa parental

25 Para medir la actividad enzimática de PTS de sacarosa, se utilizaron los métodos de Jacobson *et al.* (*J. Biol. Chem.*, 254:249, 1979) y Lodge *et al.* (*Infect. Immun.*, 56:2594, 1988).

30 Primero, con el fin de permeabilizar células, 1 ml del caldo de cultivo de células a un valor DO₆₀₀ de aproximadamente 1,2 se lavó con tampón TDM (Tris/HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM; pH 7,5) y se re-suspendió en 1 ml del mismo tampón, a ello se añadieron 0,01 ml de tolueno, y la disolución de células se agitó intensamente durante 45 segundos. La disolución de células agitada se centrifugó a 12.000 x g, y las células recogidas se lavaron dos veces con tampón TDM. Este proceso se repitió una vez más, y las células resultantes se re-suspendieron en 50 µl de tampón TDM, preparando así células permeabilizadas. Se realizó una fosforilación de
35 sacarosa dependiente de PEP añadiendo 5 µl de la suspensión de células permeabilizada a 100 µl de una mezcla de reacción que contiene Tris/HCl 25 mM (pH 8,0), DTT 1 mM, MgCl₂ 5 mM, KF 10 mM y 1 µCi de [¹⁴C]sacarosa, y midiendo la diferencia en la reacción entre la mezcla que contiene PEP 1 mM y la mezcla que no contiene PEP. Se dejó que la mezcla reaccionara a 37°C durante 10 minutos y a ello se añadió 1 mL de agua fría para detener la reacción. El producto de reacción final se hizo pasar a través de un disco de filtro de DEAE (Whatman, DE81) en un sistema de filtro y se lavó con un volumen décuplo de agua fría y luego se midió la radiactividad del mismo de acuerdo con un método conocido utilizando el contador de centelleo líquido Beckman LS6500 (Beckman, Ramsey, MN). La actividad de sacarosa-6-fosfato hidrolasa se midió por la misma modificación del método de Martin *et al.* (*Appl. Environ. Microbiol.*, 53:2388, 1987). 20 ml del cultivo de células a un valor DO₆₀₀
40 de aproximadamente 1 se permeabilizaron de la misma manera que en la medición de la actividad PTS de sacarosa y, finalmente, se re-suspendieron en 1 mL de tampón TDM, preparando así células permeabilizadas. Se realizó una fosforilación de sacarosa dependiente de PEP añadiendo 30 µl de las células permeabilizadas a 300 µl de una mezcla de reacción que contiene tampón fosfato de sodio-potasio 50 mM (pH 7,2), MgCl₂ 5 mM, sacarosa 4 mM, NADP 0,8 mM y 6,4 U de glucosa-6-fosfato deshidrolasa, y midiendo la diferencia en la reacción entre la mezcla que contiene PEP 10 mM y la mezcla que no contiene PEP.

Se midieron las actividades de las cepas mutantes de las que se eliminaron los genes *ptsG* y *sacC* y la actividad de la cepa parental, y los resultados de la medición se muestran en la Tabla 2 que figura a continuación. Los resultados revelan que la enzima PTS de sacarosa, codificada por MS0784 (*ptsG*), tiene actividad PTS, y que la enzima sacarosa-6-fosfato hidrolasa, codificada por MS0909 (*sacC*), tiene funciones glucolíticas en células.

Tabla 2

Enzimas	Cepas	Medio de cultivo ^a	Actividad específica de la enzima (mU/mg) ^b	Actividad relativa (%) ^c
Sacarosa fosfotransferasa	MBEL55E	MH5S*	3,7	100,0
		BHI	1,4	37,8
	MptsG	BHI	0,098	2,6
Sacarosa-6-fosfato hidrolasa	MBEL55E	MH5S*	18,3	100,0
		BHI	20,4	111,5
	MsacC	BHI	1,7	9,3

^aBHI, infusión cerebro-corazón Bacto™ (Becton, Dickinson and Company, Spark, MD);

la composición del medio MH5S contiene: por litro, 2,5 g de extracto de levadura, 2,5 g de polipeptona, 1 g de NaCl, 8,7 g de K₂HPO₄, 10 g de NaHCO₃, 0,02 g de CaCl₂·2H₂O, 0,2 g de MgCl₂·6H₂O y 10 g de sacarosa.

^bLa actividad de sacarosa fosfotransferasa se expresó en una unidad de mU/mg convertida a partir de cpm (recuentos por minuto) medida a través de un contador de centelleo líquido.

^cLa actividad relativa se determinó calculando los valores restantes hasta 100% para el caldo de cultivo indicado por el símbolo *.

Ejemplo 3: Aislamiento de nuevos genes que codifican enzimas implicadas en el metabolismo de sacarosa

Genes que codifican β-fructofuranosidasa, incluido *sacC*, de los que se confirmó que tenían la capacidad de metabolizar sacarosa sobre la base de los resultados del Ejemplo 2, se aislaron de cada una de *Mannheimia*, *E. coli* y *Bacillus subtilis* de la siguiente manera.

3.1: Aislamiento del gen que codifica sacarosa-6-fosfato hidrolasa derivada de *Mannheimia*

Primeramente, el ADN del gen *sacC* (MS0909) se amplificó mediante PCR utilizando el ADN genómico de *M. succiniciproducens* MBEL55E (KCTC 0769BP) en calidad de molde con cebadores de SEQ ID NOS: 43 y 44. El gen *sacC* (MS0909) es un gen (SEQ ID NO: 4) que codifica β-fructofuranosidasa (sacarosa-6-fosfato hidrolasa).

SEQ ID NO 43: 5'-ACTGAGCCATGGCGAAAATCAATAAAGTAGATC-3'

SEQ ID NO 44: 5'-TGATCCGAGCTCCTATTATTCCAGTGTTCCCGCC-3'

3.2: Aislamiento del gen que codifica invertasa derivada de *E. coli*

El ADN del gen *cscA* se amplificó mediante PCR utilizando el ADN genómico de *E. coli* W en calidad de un molde con cebadores de SEQ ID NOS: 45 y 46. El *cscA* es un gen (SEQ ID NO: 8) que codifica β-fructofuranosidasa (invertasa).

SEQ ID NO 45: ACTCCGGAATTCATGACGCAATCTCGATTGCA

SEQ ID NO 46: ACCTGCGAGCTCCCGTTGTTCCACCTGATATTATG

3.3: Aislamiento del gen que codifica sacarosa-6-fosfato hidrolasa derivada de *Bacillus subtilis*

El ADN del gen *sacA* se amplificó mediante PCR utilizando el ADN genómico de *Bacillus subtilis* en calidad de un molde con cebadores de SEQ ID NOS: 47 y 48. El *sacA* es un gen (SEQ ID NO: 10) que codifica β-fructofuranosidasa (sacarosa-6-fosfato hidrolasa).

SEQ ID NO 47: GCATAGAATTCATGACAGCACATGACCAGGAGCT

SEQ ID NO 48: GCATAGAGCTCCTACATAAGTGTCCAAATTCGGACATTC

Ejemplo 4: Construcción de vectores recombinantes

5 **4.1: Preparación de pTac15K**

Se construyó un vector pTac15K insertando el promotor *trc* y las regiones de terminador de la transcripción pKK223-3 (Pharmacia Biotech., Uppsala, Suecia) en pACYC177 (NEB, Beverly, MA, EE.UU.). pTac15K es un vector de expresión para la expresión constitutiva y tiene una estructura mostrada en un mapa de corte y empalme de la FIG. 5.

4.2: Construcción de pTac15KsacC

15 Con el fin de expresar el gen *sacC* (MS0909) que codifica β -fructofuranosidasa (sacarosa-6-fosfato hidrolasa) derivada de *Mannheimia* en *E. coli*, se construyó un vector de expresión de la siguiente manera.

De acuerdo con un método de ingeniería molecular conocido, el fragmento de PCR que contiene el gen *sacC* (MS0909), amplificado en el Ejemplo 3.1, se digirió con *EcoRI* y *SacI* y se ligó en pTac15K digerido con las mismas enzimas, construyendo así pTac15KsacC (FIG. 6). El vector construido se secuenció en Solgent Co. (Corea) utilizando los cebadores de SEQ ID NOS: 49 a 52, examinando así si la secuencia base del gen introducido en el vector era consistente con la del gen *sacC* (MS0909).

SEQ ID NO 49: 5'-CCCGTTCTGGATAATGTTTT-3'

SEQ ID NO 50: 5'-AAAGTCACGGTTGTTATTCC-3'

SEQ ID NO 51: 5'-CATTTAATGCCGCTCATATT-3'

SEQ ID NO 52: 5'-ACCGCTCAATTATTGAGATT-3'

25 **4.3: Construcción del vector recombinante pTac15KEWcscA**

De acuerdo con un método de ingeniería molecular conocido, el fragmento de ADN obtenido en el Ejemplo 3.2 se digirió con *EcoRI* y *SacI* y se ligó en pTac15K digerido con las mismas enzimas, construyendo así pTac15KEWcscA.

30 **4.4: Construcción del vector recombinante pTac15KBSsacA**

De acuerdo con un método de ingeniería molecular conocido, el fragmento de ADN obtenido en el Ejemplo 3.3 se digirió con *EcoRI* y *SacI* y se ligó en pTac15K digerido con las mismas enzimas, construyendo así pTac15KBSsacA.

35 **Ejemplo 5: Construcción de cepas recombinantes**

5.1: Construcción de la cepa de *Escherichia coli* W3110 pTac15KsacC

40 Se llevó a cabo el siguiente experimento utilizando como un microorganismo modelo *E. coli* W3110 que es una subcepa de *E. coli* K-12 que se sabe que es incapaz de metabolizar sacarosa. La cepa *E. coli* W3110 se extendió en placas en medio LB sólido y se cultivó a 37°C durante 8 horas y luego la colonia se inoculó en 10 ml de medio LB líquido y se cultivó durante 8 horas. El caldo de cultivo se inoculó en 100 ml de medio LB líquido al 1% (v/v) y se cultivó en una incubadora con agitación a 37°C.

45 Cuando el caldo de cultivo alcanzó una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,30-0,35 después de aproximadamente 2 horas, se dejó reposar en hielo durante 20 minutos para detener el crecimiento de las células. El caldo de cultivo se centrifugó a 4°C a 3.000 rpm durante 15 minutos para recoger las células y luego las células se suspendieron en 32 ml de disolución RFI a 4°C. La suspensión de células se centrifugó a 4°C a 3.000 rpm durante 15 minutos

para recoger las células. Las células recogidas se re-suspendieron en 8 ml de disolución RFI y luego se dejaron reposar en hielo durante 15 minutos. Finalmente, la re-suspensión se dispensó en una cantidad de 100 µl/pocillo y se almacenó a -70°C. La composición de la disolución RFI consistía en RbCl 100 mM, MnCl₂·4H₂O 50 mM, CH₃COOK 0,1 M, CaCl₂ 10 mM y glicerol al 15% (p/v) y se ajustó hasta un pH de 5,8 mediante la adición de acetato 0,2 M. La disolución de RFI consistía en MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂ 100 mM y glicerol al 15% (p/v) y se ajustó a un pH de 6,8 mediante la adición de NaOH.

El vector de expresión construido en el Ejemplo 2.2 o pTac15K (Pharmacia Biotech., Uppsala, Suecia) en calidad de un testigo se añadió a la cepa *E. coli* W3110, y luego la cepa se sometió a transformación por choque térmico a 42°C durante 90 segundos, transformando así la cepa. Después de la transformación por choque térmico, se añadieron 0,8 ml de medio LB líquido a la cepa y luego la cepa se cultivó en una incubadora con agitación a 37°C durante 1 hora.

El caldo de cultivo se extendió en placa en un medio LB sólido que contenía antibiótico canamicina (concentración final: 50 µg/L) y se cultivó a 37°C durante 12 horas o más. Las colonias de *E. coli* W3110 pTac15K y *E. coli* W3110 pTac15KsacC se inocularon en medio LB líquido y se cultivaron a 37°C durante 8 horas o más. Con el fin de confirmar si el vector se introducía con éxito en la cepa, el vector se aisló de la cepa cultivada utilizando el plásmido SV de GeneAll^R (GeneAll Biotechnology, Corea), y se sometió a electroforesis.

5.2: Construcción de las cepas de *E. coli* W3110 pTac15KEWcscA y *E. coli* W3110 pTac15KBSsacA

De acuerdo con el mismo método que el descrito en el Ejemplo 5.1, *E. coli* W3110, que es una subcepa de *E. coli* K-12 que se sabe que es incapaz de metabolizar sacarosa, se transformó utilizando cada uno de los vectores pTac15KEWcscA y pTac15KBSsacA construidos en los Ejemplos 4.3 y 4.4, y se confirmó mediante electroforesis si el vector se introdujo con éxito.

Ejemplo 6: Examen de la capacidad metabolizante de sacarosa y del cremiento de *E. coli* recombinante

Cada una de las colonias de *E. coli* W3110 pTac15KsacC y *E. coli* W3110 pTac15K en medio sólido, construidas en el Ejemplo 5.1, se inoculó en 10 ml de medio LB y se cultivó a 37°C durante 8 horas. Después, las células se inocularon en 100 ml de un medio mínimo M9 (que contenía 10 g/L de sacarosa) al 5% (v/v) y se cultivaron a 37°C. A esto se añadió, en calidad de antibiótico canamicina hasta una concentración final de 50 µg/L. El medio LB consistía en 10 g/L de triptona, 10 g/L de NaCl y 5 g/L de extracto de levadura, y el medio mínimo M9 consistía en 33,9 g/L de Na₂HPO₄, 15 g/L de KH₂PO₄, 2,5 g/L de NaCl, 5 g/L de NH₄Cl y 0,36 g/L de MgSO₄. La concentración de células en el caldo de cultivo se midió como DO₆₀₀ utilizando un espectrofotómetro. Durante el período de cultivo se recogió periódicamente una muestra, y la muestra recogida se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos. Después, las concentraciones de sacarosa y metabolitos en el sobrenadante se analizaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Como resultado, tal como se muestra en las FIGS. 7 y 8 y en la Tabla 3, la cepa de *E. coli* W3110 pTac15K no podía crecer en el medio mínimo M9 que contenía sacarosa como única fuente de carbono, pero la cepa *E. coli* W3110 pTac15KsacC mostró una capacidad excelente de metabolizar sacarosa. La cepa de *E. coli* W3110 pTac15KsacC metabolizó 11,08 g/L de sacarosa durante 17 horas y mostró un incremento en la biomasa de 3,71 basado en la DO₆₀₀. Este aumento en la biomasa corresponde a una cantidad de biomasa de aproximadamente 1,37 g/L a la vista del factor de conversión (1 DO₆₀₀ = 0,37 g/L DCW) de DO₆₀₀ y el peso de la célula en seco (DCW (siglas inglesas), g/L) de *E. coli* convencional. Además, se podía observar que se produjeron 1,42 g/L de ácido acético, quedaban 2,01 g/L de glucosa y 4,51 g/L de fructosa, y los dos sacáridos se consumieron gradualmente con el paso del tiempo.

Tabla 3

Cepas	Plásmidos	Crecimiento en medio mínimo M9 + 10 g/L de sacarosa	Sacarosa que utiliza el fenotipo	Concentración de sacarosa (g/L)	
				0 h	19 h
<i>E. coli</i> W3110	pTAC15K	-	scr-	11,00	11,12
<i>E. coli</i> W3110	pTAC15KsacC	+	scr+	11,08	0,00

5 En la curva de crecimiento de la cepa W3110 pTac15K (FIG. 7) se piensa que un ligero incremento en la DO a las 8 horas después de la inoculación puede ser atribuible a los componentes del medio en los que se inoculó a razón de 5% (v/v). Los resultados del análisis LC de la cepa W3110 pTac15K indicaron que la cepa ni degradaba sacarosa ni crecía utilizando sacarosa como única fuente de carbono.

10 Además de ello, las cepas recombinantes de *E. coli* W3110 pTac15KEWcscA y *E. coli* W3110 pTac15KBSsacA transformadas en el Ejemplo 5.2 se cultivaron utilizando sacarosa como una única fuente de carbono de la misma manera que en el caso de la cepa de *E. coli* W3110 pTac15KsacC. Como resultado, tal como se muestra en la FIG. 9, las cepas mostraron una excelente capacidad de crecer. También, en el caso de *E. coli* W3110 pTac15KEWcscA, la sacarosa disminuyó de 7,77 g/L en la fase inicial a 1,82 g/L al cabo de 48 horas, y en el caso de la cepa de *E. coli* W3110 pTac15KBSsacA, la sacarosa disminuyó de 8,49 g/L en la fase inicial a 7,98 g/L al cabo de 48 horas. Esto sugiere que estas cepas pueden crecer metabolizando sacarosa.

Ejemplo 7: Producción de metabolitos en *E. coli* recombinante utilizando sacarosa como fuente de carbono

20 Tal como se describe arriba, cuando la sacarosa-6-fosfato hidrolasa derivada de *M. succiniciproducens* se introdujo en el microorganismo incapaz de crecer utilizando sacarosa como una fuente de carbono, el microorganismo podía crecer utilizando sacarosa como única fuente de carbono. A saber, cuando un microorganismo incapaz de utilizar sacarosa como fuente de carbón se trata de modo que pueda cultivarse en un medio mínimo utilizando sacarosa como una única fuente de carbono, los sistemas existentes para producir diversos bioproductos (p. ej. metabolitos primarios y secundarios, proteínas recombinantes y polímeros biodegradables) se pueden aplicar a la presente invención.

25 Por consiguiente, este Ejemplo muestra la producción de diversos metabolitos utilizando sacarosa en condiciones anaerobias.

30 La cepa de *E. coli* W3110 pTac15KsacC, construida en el Ejemplo 5.1, se inoculó en 10 ml de medio LB y se cultivó a 37°C durante 8 horas, y después el caldo de cultivo se inoculó en 200 mL de medio LB y se cultivó a 37°C durante 8 horas. Luego, el caldo de cultivo se inoculó en un fermentador de 2,5 L de volumen (New Brunswick System, BioFlo 3000). Un medio de cultivo en el fermentador consistía en medio mínimo R/2 que contenía 20 g/L de sacarosa, y CO₂ al 100% se introdujo en el fermentador a una velocidad de 0,5 vvm bajo condiciones operativas de pH 6,8, 37°C y 200 rpm. En calidad de un antibiótico se añadió canamicina hasta una concentración final de 50 µg/L. El medio R/2 consistía en 6,75 g/L de KH₂PO₄, 2 g/L de (NH₄)₂HPO₄, 0,85 g/L de C₆H₈O₇·H₂O, 0,7 g/L de MgSO₄·7H₂O y 5 ml/L de disolución de metales traza (10 g/L de FeSO₄·7H₂O, 2 g/L de CaCl₂, 2,2 g/L de ZnSO₄·7H₂O, 0,54 g/L de MnSO₄·5H₂O, 1 g/L de CuSO₄·5H₂O, 0,1 g/L de NH₄Mo₇O₂₄·7H₂O, 0,02 g/L de Na₂B₄O₇·10H₂O y 5 mL de HCl). La concentración de células en el caldo de cultivo se midió como DO₆₀₀ utilizando un espectrofotómetro, y durante el período de cultivo se recogió periódicamente una muestra, la muestra recogida se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos y después se analizaron las concentraciones de sacarosa y metabolitos en el sobrenadante mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

45 Tal como se muestra en la FIG. 10 y la Tabla 4, se podían producir con éxito ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, ácido succínico y etanol. En las condiciones anaerobias arriba descritas durante 52,5 horas, se consumieron por completo 22,13 g/L de sacarosa y sacáridos derivados de la misma y, como resultado, se produjeron 4,49 g/L de ácido acético, 3,74 g/L de ácido fórmico, 4,19 g/L de ácido láctico, 5,10 g/L de ácido succínico y 2,66 g/L de etanol a rendimientos de 0,20, 0,17, 0,19, 0,23 y 0,12 g/g de sacarosa, y la suma total de estos rendimientos era 0,91 g/g de sacarosa, lo cual se aproximaba significativamente al valor teórico. También la DO₆₀₀ a las 52,5 horas después del comienzo del cultivo era 2,7, que correspondía a un DCW de 0,999 a la vista del factor de conversión arriba descrito. El rendimiento específico calculado que indica el rendimiento por peso de cepa se muestra en la Tabla 4 que figura a continuación. Los resultados de la Tabla 4 indican que, cuando la sacarosa-6-fosfato hidrolasa se introduce sola, se pueden producir con éxito diversos metabolitos a un alto

rendimiento y a un elevado rendimiento específico utilizando sacarosa.

Tabla 4

Sacarosa y productos	Conc. inicial	Conc. final	Rendimiento (g/g de sacarosa)	Rendimiento específico (g/g de DCW)
Sacarosa	22,13	0	-	-
Ácido acético	0	4,49	0,20	4,49
Ácido fórmico	0	3,74	0,17	3,74
Ácido láctico	0	4,19	0,19	4,19
Ácido succínico	0	5,10	0,23	5,11
Etanol	0	2,66	0,12	2,66
Total	22,13	20,18	0,91	20,19

5 **Ejemplo 8: Aplicación a bioproductos útiles tratados metabólicamente mediante ingeniería a través de aplicaciones a una cepa productora de treonina**

10 Se llevó a cabo el siguiente experimento utilizando una cepa productora de treonina con el fin de ilustrar que cuando los genes de la presente invención se introducen en una cepa de *E. coli* tratada mediante ingeniería en el genoma o recombinante, la cepa puede producir también bioproductos utilizando sacarosa en lugar de otras fuentes de carbono existentes. Específicamente, se llevó a cabo el siguiente experimento utilizando, como modelo, TH28C pBRThrABCR3 tratado mediante ingeniería en el genoma y recombinante (Lee *et al.*, *Molecular Systems Biology*, 3:149, 2007) metabólicamente modificado, basado en *E. coli* W3110.

15 De acuerdo con el mismo método que el descrito en el Ejemplo 5, la cepa TH28C pBRThrABCR3 se transformó con el plásmido pTac15KsacC construido en el Ejemplo 4, construyendo así TH28C pBRThrABCR3 pTac15KsacC.

20 La cepa TH28C pBRThrABCR3 pTAC15KsacC10 construida se inoculó en 10 mL de medio LB y se cultivó a 31°C durante 12 horas, y el caldo de cultivo se inoculó en 50 mL de medio LB y se cultivó a 31°C durante 12 horas. Luego, el caldo de cultivo se inoculó en un fermentador de 2,5 L de volumen (New Brunswick System, BioFlo 3000). El medio de cultivo contenido en el fermentador consistía en medio TPM2 que contenía 20 g/L de sacarosa, y se mantuvo a un nivel de saturación del aire de más del 40% suministrando aire con una concentración de oxígeno disuelto de 1 vvm bajo condiciones de pH de 6,5 y temperatura de 31°C e incrementando automáticamente el número de revoluciones (rpm) hasta 1000. En calidad de antibióticos se añadieron cloranfenicol, canamicina y ampicilina hasta concentraciones finales de 30 µg/L, 40 µg/L y 50 µg/L, respectivamente. El medio TMP2 consistía en 2 g/L de extracto de levadura, 2 g/L de MgSO₄·7H₂O, 2 g/L de KH₂PO₄, 10 g/L de (NH₄)₂SO₄, 0,2 g/L de L-metionina, 0,2 g/L de L-lisina, 0,05 g/L de L-isoleucina y 10 ml/L de disolución de metales traza (10 g/L de FeSO₄·7H₂O, 2 g/L de CaCl₂, 2,2 g/L de ZnSO₄·7H₂O, 0,54 g/L de MnSO₄·5H₂O, 1 g/L de CuSO₄·5H₂O, 0,1 g/L de NH₄Mo₇O₂₄·7H₂O, 0,02 g/L de Na₂B₄O₇·10H₂O y 5 mL de HCl). La concentración de células en el caldo de cultivo se midió como DO₆₀₀ utilizando un espectrofotómetro, y la muestra periódicamente recogida se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 minutos y después se analizaron las concentraciones de sacarosa y metabolitos en el sobrenadante mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Para el análisis de aminoácidos, 5 ml del caldo de cultivo se sometieron a procesos de centrifugación y filtración, y luego se separaron en Science Lab Center Co. (Daejeon, Corea), utilizando una columna de separación de cationes (LCA K06/Na 1,6150 mm; Sykam GmbH, Eresing, Alemania). Después, la muestra separada se analizó utilizando el analizador de aminoácidos Sykam S433.

35 Como resultado, tal como se muestra en la Tabla 5 que figura a continuación, se pudieron producir con éxito, utilizando sacarosa, 4,7 g/L de treonina.

40 Tabla 5

	Valor inicial	Valor final (después de 15 h de cultivo)
DO ₆₀₀	0,4	18,0
Sacarosa	23,7 g/L	0 g/L
Treonina	0 g/L	4,7 g/L

45 Tal como se describe arriba, cuando el gen β-fructofuranosidasa de la presente invención se introdujo en un microorganismo incapaz de utilizar sacarosa como una fuente de carbono, el microorganismo había tenido la capacidad de metabolizar sacarosa y, además, podía producir diversos metabolitos, incluido ácido acético, ácido

5 fórmico, ácido láctico, ácido succínico y etanol, utilizando sacarosa como una fuente de carbono. Además de ello, cuando el gen de la presente invención se introdujo en la cepa metabólicamente modificada de la misma manera, se podía producir con éxito un metabolito deseado (treonina en este Ejemplo). Además, cualquier persona experta en la técnica también puede emplear fácilmente la presente invención para producir polímeros biodegradables, proteínas recombinantes y similares.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

10 Tal como se describe antes en detalle, la presente invención proporciona un microorganismo recombinante capaz de utilizar sacarosa económica como una fuente de carbono en lugar de glucosa cara. También, en un proceso de cultivar microorganismos que han sido incapaces de utilizar sacarosa como una fuente de carbono, la sacarosa puede ser sustituida por otras fuentes de carbono, incluida glucosa. En la presente invención, se identificó y desarrolló un grupo de nuevas enzimas que permiten el uso eficaz de sacarosa, que es económica y abundante en la naturaleza. Enzimas de este tipo se utilizarán para la producción más eficaz y económica de compuestos
15 químicos útiles o proteínas recombinantes médicas a través de la fermentación microbiana utilizando sacarosa como una fuente de carbono. Particularmente debido a que se sabe que la sacarosa funciona para prevenir la modificación de proteínas en células, estabilizar proteínas en células y minimizar la lisis de células es muy útil en la producción de elevadas concentraciones de compuestos químicos de carácter básico o en cultivo de células a alta concentración.

20 A pesar de que la presente invención se ha descrito en detalle con referencia a características específicas, resultará evidente para los expertos en la técnica que esta descripción sólo es para una realización preferida y no limita el alcance de la presente invención. Así, el alcance sustancial de la presente invención quedará definido por las reivindicaciones anejas.

25

ES 2 424 240 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
- 5 <120> Microorganismo recombinante con capacidad de utilizar sacarosa como fuente de carbono
- <130> 21522EP
- <140> EP 08 862 527.2
- 10 <141> 18-12-2008
- <150> KR 10-2007-0133239
- <151> 18-12-2007
- 15 <150> KR 10-2008-0106133
- <151> 28-10-2008
- <160> 52
- 20 <170> PatentIn version 3.2
- <210> 1
- <211> 492
- <212> PRT
- 25 <213> Mannheimia succiniproducens MBEL55E
- <200>
- <223> Sacarosa fosfotransferasa (PtsG)
- 30 <400> 1

```

Met Leu Val Leu Ala Arg Ile Gly Glu Asn Phe Cys Leu Ile Tyr Lys
 1           5           10           15

Arg Gly Val Ala Met Asn Tyr Pro Lys Ile Ala Gln Gln Val Ile Glu
          20           25           30

Lys Leu Gly Gly Lys Glu Asn Ile Ala Asn Leu Ala His Cys Ala Thr
 35           40           45

Arg Leu Arg Leu Thr Met Asn Asp Glu Ser Lys Ile Asp Lys Gln Ala
 50           55           60

Ile Glu Asp Ile Glu Gly Val Lys Gly Gln Phe Ser Thr Ser Gly Gln
 65           70           75           80

Tyr Gln Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Val Asn Lys Val Tyr Ala Glu
          85           90           95

Met Asn Thr Ile Met Asn Gly Ser Pro Ser Ala Asp Ser Thr Gly Glu
          100          105          110

Ser Gln Gln Ala Lys Gly Pro Gln Gln Gly Leu Ile Gln Arg Leu Ile
 115          120          125

```

ES 2 424 240 T3

Lys Gly Leu Ala Asp Ile Phe Val Pro Ile Ile Pro Ala Ile Val Ala
 130 135 140
 Gly Gly Leu Leu Met Gly Ile Asn Asn Val Phe Thr Ala Lys Asp Leu
 145 150 155 160
 Phe Glu Glu Gly Arg Thr Leu Leu Asp Leu Tyr Pro Gln Tyr Lys Asp
 165 170 175
 Leu Ala Asp Leu Ile Asn Thr Phe Ala Asn Ala Pro Phe Val Phe Leu
 180 185 190
 Pro Val Leu Leu Gly Phe Ser Ala Thr Arg Lys Phe Gly Gly Asn Pro
 195 200 205
 Phe Leu Gly Ala Thr Leu Gly Met Leu Leu Val His Pro Ala Leu Thr
 210 215 220
 Asn Ala Tyr Gly Tyr Ala Glu Ala Leu Ala Gly Gly Asn Leu Gln Leu
 225 230 235 240
 Trp Asn Ile Phe Gly Leu Glu Ile Glu Lys Val Gly Tyr Gln Gly Thr
 245 250 255
 Val Ile Pro Val Leu Ile Ala Ala Trp Val Leu Ala Thr Leu Glu Lys
 260 265 270
 Phe Leu Val Lys Val Val Pro Ser Val Leu Asn Asn Leu Val Thr Pro
 275 280 285
 Leu Phe Ser Leu Phe Ile Thr Gly Phe Leu Ala Phe Thr Val Ile Gly
 290 295 300
 Pro Phe Gly Arg Glu Ala Gly Glu Phe Leu Ser Gln Gly Leu Thr Trp
 305 310 315 320
 Leu Tyr Asp Thr Leu Gly Phe Ile Gly Gly Gly Val Phe Gly Ala Leu
 325 330 335
 Tyr Ala Pro Ile Val Ile Thr Gly Met His Gln Thr Phe Ile Ala Ile
 340 345 350
 Glu Thr Gln Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ala Thr Phe Ile Phe Pro Ile
 355 360 365
 Ala Ala Met Ser Asn Ile Ala Gln Gly Ala Ala Cys Leu Ala Val Ala
 370 375 380

ES 2 424 240 T3

Val Leu Asn Lys Asp Ala Lys Thr Arg Gly Leu Ala Leu Pro Ser Gly
385 390 395 400

Ile Ser Ala Leu Leu Gly Ile Thr Glu Pro Ala Met Phe Gly Val Asn
405 410 415

Leu Arg Phe Arg Tyr Pro Phe Tyr Ala Ala Met Leu Gly Ala Gly Ser
420 425 430

Ala Ala Ala Phe Ile Ala Phe Phe Asn Val Lys Ala Thr Ala Leu Gly
435 440 445

Ala Ala Gly Leu Ile Gly Ile Ala Ser Ile Arg Ala Gly Asp Trp Gly
450 455 460

Met Tyr Ser Val Gly Met Val Ile Ser Phe Cys Val Ala Phe Ala Ala
465 470 475 480

Ala Leu Val Leu Gly Ala Arg Ala Asn Ala Lys Glu
485 490

- <210> 2
- 5 <211> 1479
- <212> ADN
- <213> Mannheimia succiniproducens MBEL55E

- <200>
- 10 <223> Gen que codifica sacarosa fosfotransferasa (ptsG)

```

<400> 2
ttgctcgttt tagctagaat tggcgaaaat ttttgcttaa tttataaacg aggagtcgct      60
atgaactacc ctaaaattgc ccaacaggtt atcgaaaaac ttggcggaaa agaaaatattc     120
gctaactctg cgcattgtgc aacgcgtttg cgcttgacaa tgaatgacga aagtaaaatc     180
gacaaacagg ccattgaaga tatcgagggc gtaaaagggc agttttcaac ctccgggtcaa    240
taccaaatta ttttcggttc aggtacggtg aataaagttt acgccgaaat gaataccatt     300
atgaacggtt cgccgctcggc ggattccacc ggggaaagtc aacaggcgaa agggccgcag    360
caaggtttga ttcaacgatt aattaaaggt ctggctgata ttttcgttcc cattattccg     420
gctattgtcg ccggcggttt gttaatgggg attaataatg tctttaccgc aaaagattta     480
ttcgaagaag ggaggacatt actcgacctt tatccgcaat acaaagattt agcggattta     540
attaatacct ttgctaacgc gccttttgtg tttctgcccg tattgttagg tttctcggca     600
accagaaaat tcggtggcaa tccgttctta ggagcgacat taggtatggt gctcgttcac     660
cccgctttaa ccaatgctta cggttatgcy gaagcgttag ccggcggcaa tcttcaatta     720

```

ES 2 424 240 T3

tggaaatatt tcgggctaga gattgaaaaa gtcggttata aaggtacggt tattcccgtt 780
 ttaattgccg cctgggtatt ggcgacttta gaaaaattct tagtgaaagt agtgccttcc 840
 gtattaaata attagtcac gccgttattt tcattattta tcaccggttt tttggctttc 900
 accgtaatcg gacctttcgg tcgtgaagcg ggggaatttt taagtcaggg tttaacctgg 960
 ttatatgata ctttaggttt taccgagcgc ggcgtgttcg gcgcattata cgcacctatc 1020
 gtgattaccg gtatgcacca aacctttatc gccattgaaa cgcaattgct ggcaagcact 1080
 gcggcaactt ttatcttccc gattgccgcc atgtcgaata ttgvcagagg tgccgcttgt 1140
 ttagccgttg ccgtgttaaa taaagatgcc aaaaccgag gtctggcgtt gccttccggt 1200
 atttccgcat tattagggat taccgaacct gccatgttcg ggggaattt gcgcttccgt 1260
 tatccgttct atgvcgctat gttaggtgcc ggttccgccc cggcgtttat cgcgttcttc 1320
 aatgttaaag ccaactgcgc tggcgcggcg ggcttaatcg gtatcgcac aattcgtgcc 1380
 ggcgactggg gaatgtattc cgtggggatg gtaatttcgt tttgtgtggc tttcgcgtcg 1440
 gcattagtgc tgggvcgcaag agctaacgca aaagaatag 1479

<210> 3
 <211> 502
 5 <212> PRT
 <213> Mannheimia succiniproducens MBEL55E

<200>
 <223> Sacarosa-6-fosfato hidrolasa (SacC)

10 <400> 3

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

ES 2 424 240 T3

Ile Pro Cys Glu Leu Phe Glu Ser His Gly Cys Tyr Ser Gly Gly Ala
 115 120 125

Leu Pro Val Gly Asp Lys Ile Ala Ala Phe Tyr Thr Gly Asn Thr Arg
 130 135 140

Arg Ala Ala Asp Asn Gln Arg Val Pro Phe Gln Asn Leu Ala Ile Phe
 145 150 155 160

Asp Arg Thr Gly Lys Leu Leu Ser Lys Arg Pro Leu Ile Glu Asn Ala
 165 170 175

Pro Lys Gly Tyr Thr Glu His Val Arg Asp Pro Lys Pro Tyr Phe Thr
 180 185 190

Lys Glu Gly Lys Ile Arg Phe Ile Cys Gly Ala Gln Arg Glu Asp Leu
 195 200 205

Thr Gly Thr Ala Ile Ile Phe Glu Met Asp Asn Leu Asp Asp Glu Pro
 210 215 220

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

Phe Met Trp Glu Cys Pro Asp Leu Leu Lys Val Gly Asp Asn Asp Ile
 245 250 255

Phe Ile Trp Ser Pro Gln Gly Lys Arg Arg Glu Ala Arg Arg Phe Gln
 260 265 270

Asn Asn Phe His Ala Val Tyr Ala Val Gly Lys Leu Asp Asp Arg Thr
 275 280 285

Phe Asn Ala Ala His Ile Ala Glu Leu Asp Gln Gly Phe Asp Phe Tyr
 290 295 300

Ala Pro Gln Thr Phe Ala Gly Leu Glu Asn Gln Lys His Ala Val Met
 305 310 315 320

Phe Gly Trp Cys Gly Met Pro Asp Leu Thr Tyr Pro Thr Asp Lys Tyr
 325 330 335

Lys Trp His Ser Met Leu Thr Leu Pro Arg Glu Ile Thr Leu Gln Gly
 340 345 350

ES 2 424 240 T3

Asn Arg Leu Val Gln Arg Pro Ile Lys Glu Ile Tyr Gln Asn Leu Thr
 355 360 365

Ala Leu Ser Gln Ile Ser Leu Gln Gln Gln Ala Glu Ile Gln Asp Leu
 370 375 380

Asp Arg Ala Tyr Ile Lys Phe Asp Ala Glu Asn Thr Ala Phe Asn Ile
 385 390 395 400

Arg Phe Phe Ala Asn Glu Gln Gly Gln Thr Leu Ser Leu Ser Tyr Asp
 405 410 415

Gly Glu Leu Val Cys Leu Asp Arg Ser Gln Thr Glu Glu Thr Glu Trp
 420 425 430

Met Lys Lys Phe Ala Ser Gln Arg Tyr Cys Glu Ile Lys Asn Leu Arg
 435 440 445

Gln Val Glu Ile Phe Phe Asp Arg Ser Ile Ile Glu Ile Phe Leu Asn
 450 455 460

Asp Gly Glu Lys Ala Leu Thr Ser Arg Phe Phe Ile Ala Asn Arg Gln
 465 470 475 480

Asn Ser Val Lys Thr Asp Arg Thr Leu Arg Leu Asn Val Gly Tyr Pro
 485 490 495

Lys Glu Ile Glu Tyr Lys
 500

<210> 4
 <211> 1509
 <212> ADN
 5 <213> Mannheimia succiniproducens MBEL55E

<200>
 <223> Gen que codifica sacarosa-6-fosfato hidrolasa (SacC)

10 <400> 4
 gtgcggtcgt ttttaccgca cttttcttta ttttattttc accaaggtat aatgatgatt 60
 atatttaata acggtaaata taaaagcatt ttggcggccg aacagggcga gcttgaacga 120
 attaaaagcg aggtagaaaa agatcgggat tttcgcccct actaccatct cgcgccatct 180
 acaggcttac taaacgatcc caacggtttg gtttttgacg gcgaaaaatt tcatctgttc 240
 tatcaatggt tcccgtttga tgccattcac ggcattgaaac actggaagca tttcagcacc 300
 gaggattttc atatctatac cgaagccgat ccgcttatcc cttgcgaact ttttgaaagt 360
 cacggttggt attccggcgg cgccttacca gtgggcgata aaatcgccgc attttatacc 420

ES 2 424 240 T3

ggtaacacaa gacgcgctgc ggataaccaa cgggttccct ttcaaaattt agcgatTTTT 480
 gaccgcaccg gtaaacttct cagtaaacgc ccattaattg aaaatgcacc gaaaggctac 540
 accgaacacg ttcgtgatcc gaaaccttac ttcaaaaaag aaggaaaaat ccgTTTTatt 600
 tgcggcgcac aacgtgaaga ttaaccggc accgccatta tttttgaaat ggataatctt 660
 gatgatgagc cgcgcttatt aggcgaattg tctctccccg cttttgataa tcaaaagggtg 720
 tttatgtggg aatgcccgga tttattgaaa gtcggcgata acgatatttt catctggtct 780
 ccgcaaggca aacggcgcgga agcccgccgg ttccaaaata attttcatgc ggtctatgcc 840
 gtaggaaaat tggatgatcg gacatttaat gccgctcata ttgccgaact tgatcaaggt 900
 ttcgatttct atgcgccgca aacttttgcc ggcttgaaa atcaaaagca tgccgttatg 960
 ttcggttggg gcggtatgcc ggatttgacc taccgcacgg ataaatacaa atggcattca 1020
 atgctgactc tcccgcggga aattacattg caaggcaata ggcttgttca gcgcccgata 1080
 aaagaaattt atcaaaattt gaccgcactt tcgcaaattt ccctgcaaca gcaagcggaa 1140
 attcaggatt tagatcgagc ctatattaa tttgacgcgg aaaacacagc gtttaatatc 1200
 cgctTTTTtg ccaacgaaca aggacaaacg ctctcgcttt cttatgacgg agaacttggt 1260
 tgtctggatc gttcgcaaac ggaagaaacg gaatggatga aaaaatttgc tagtcagcgt 1320
 tattgtgaaa taaagaatct gcgacaagtg gaaattttct ttgaccgctc aattattgag 1380
 atttcctga atgacggcga aaaagccctg acttcgagat tctttattgc gaaccgcaa 1440
 aattccgtca aaaccgaccg cactttgcgg ttaaactgcg gttatccgaa agaaattgaa 1500
 tataaatag 1509

<210> 5
 <211> 310
 5 <212> PRT
 <213> Mannheimia succiniproducens MBEL55E

<200>
 <223> Fructoquinasa (RbaK)

10

<400> 5
 Met His Met Thr Asn Lys Ile Trp Val Leu Gly Asp Ala Val Val Asp
 1 5 10 15
 Leu Ile Pro Asp Gly Asp Asn His Tyr Leu Arg Cys Ala Gly Gly Ala
 20 25 30
 Pro Ala Asn Val Ala Val Gly Val Ala Arg Leu Gly Val Pro Ser Ala
 35 40 45
 Phe Ile Gly Arg Val Gly Lys Asp Pro Leu Gly Glu Phe Met Arg Asp
 50 55 60

ES 2 424 240 T3

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

ES 2 424 240 T3

<210> 6
 <211> 933
 <212> ADN
 <213> Mannheimia succiniproducens MBEL55E

5

<200>
 <223> Gen que codifica fructoquinasa (rbsK)

<400> 6
 atgcatatga caaacaaaat ttgggtatta ggcgatgccg tgggtgattt aattcctgac 60
 ggagacaacc attatattgcg ttgctgcaggc ggcgcaccgg ctaatgtggc ggtcggcggt 120
 gcccgtttag gtgtgcctag cgcatttata gcccgtag gtaaagatcc gttaggggaa 180
 tttatgctcg atacgctgaa tcaggaaaat gtaaacaccg attatatgtt gttagatcct 240
 aaacaacgta cttcgacggt ggtggttggg ttaactgacg gcgaacgtag ttttaccttt 300
 atggtgaatc caagtgcgga tcaattttta caaatttccg atctgccgca atttcaagcc 360
 ggagactggt tgcactgctg ctctatcgcc ttaatcaatg aaccgaccgg cagcgcact 420
 ttcacggcaa tgaaaaatat ccgtgctggc ggcggtaaag tatctttcga tccgaattta 480
 cgcgaaagct tatggaaatc ccaggatgaa atgatcgatg tggatgatga agcggtaagc 540
 cttgccgacg tattgaaatt ttcagaagaa gaattaacgc tgtaacca taccgacagc 600
 ctggaaaaat cttttgaaaa aatcaccgca ctttatcccg ataaattgat tattgtcact 660
 ttagggaaag aagggtgcgt ctatcatctg cacggtaaaa aagaggtggt tgcagggaaa 720
 gcgctgaaac cggtagatac caccggggcc ggcgacgctt ttgtcagcgg gttattagcc 780
 ggattatcac aaacggaaaa ctggcagcaa cctgaacaac tcgttactat tattcgccag 840
 gccaacgcca gcggcgcgct tgccacaacg gcaaaaggcg ctatgtcggc attaccgaat 900
 cagcaacaat tagcgggaatt tttagcaaac taa 933

10

<210> 7
 <211> 477
 <212> PRT
 <213> E. coli W

15

<200>
 <223> Sacarosa hidrolasa (CscA)

<400> 7
 Met Thr Gln Ser Arg Leu His Ala Ala Gln Asn Ala Leu Ala Lys Leu
 1 5 10 15
 His Glu His Arg Gly Asn Thr Phe Tyr Pro His Phe His Leu Ala Pro
 20 25 30

20

ES 2 424 240 T3

Pro Ala Gly Trp Met Asn Asp Pro Asn Gly Leu Ile Trp Phe Asn Asp
 35 40 45
 Arg Tyr His Ala Phe Tyr Gln His His Pro Met Ser Glu His Trp Gly
 50 55 60
 Pro Met His Trp Gly His Ala Thr Ser Asp Asp Met Ile His Trp Gln
 65 70 75 80
 His Glu Pro Ile Ala Leu Ala Pro Gly Asp Asp Asn Asp Lys Asp Gly
 85 90 95
 Cys Phe Ser Gly Ser Ala Val Asp Asp Asn Gly Val Leu Ser Leu Ile
 100 105 110
 Tyr Thr Gly His Val Trp Leu Asp Gly Ala Gly Asn Asp Asp Ala Ile
 115 120 125
 Arg Glu Val Gln Cys Leu Ala Thr Ser Arg Asp Gly Ile His Phe Glu
 130 135 140
 Lys Gln Gly Val Ile Leu Thr Pro Pro Glu Gly Ile Met His Phe Arg
 145 150 155 160
 Asp Pro Lys Val Trp Arg Glu Ala Asp Thr Trp Trp Met Val Val Gly
 165 170 175
 Ala Lys Asp Pro Gly Asn Thr Gly Gln Ile Leu Leu Tyr Arg Gly Ser
 180 185 190
 Ser Leu Arg Glu Trp Thr Phe Asp Arg Val Leu Ala His Ala Asp Ala
 195 200 205
 Gly Glu Ser Tyr Met Trp Glu Cys Pro Asp Phe Phe Ser Leu Gly Asp
 210 215 220
 Gln His Tyr Leu Met Phe Ser Pro Gln Gly Met Asn Ala Glu Gly Tyr
 225 230 235 240
 Ser Tyr Arg Asn Arg Phe Gln Ser Gly Val Ile Pro Gly Met Trp Ser
 245 250 255
 Pro Gly Arg Leu Phe Ala Gln Ser Gly His Phe Thr Glu Leu Asp Asn
 260 265 270
 Gly His Asp Phe Tyr Ala Pro Gln Ser Phe Leu Ala Lys Asp Gly Arg
 275 280 285

ES 2 424 240 T3

Arg Ile Val Ile Gly Trp Met Asp Met Trp Glu Ser Pro Met Pro Ser
 290 295 300

Lys Arg Glu Gly Trp Ala Gly Cys Met Thr Leu Ala Arg Glu Leu Ser
 305 310 315 320

Glu Ser Asn Gly Lys Leu Leu Gln Arg Pro Val His Glu Ala Glu Ser
 325 330 335

Leu Arg Gln Gln His Gln Ser Val Ser Pro Arg Thr Ile Ser Asn Lys
 340 345 350

Tyr Val Leu Gln Glu Asn Ala Gln Ala Val Glu Ile Gln Leu Gln Trp
 355 360 365

Ala Leu Lys Asn Ser Asp Ala Glu His Tyr Gly Leu Gln Leu Gly Thr
 370 375 380

Gly Met Arg Leu Tyr Ile Asp Asn Gln Ser Glu Arg Leu Val Leu Trp
 385 390 395 400

Arg Tyr Tyr Pro His Glu Asn Leu Asp Gly Tyr Arg Ser Ile Pro Leu
 405 410 415

Pro Gln Arg Asp Thr Leu Ala Leu Arg Ile Phe Ile Asp Thr Ser Ser
 420 425 430

Val Glu Val Phe Ile Asn Asp Gly Glu Ala Val Met Ser Ser Arg Ile
 435 440 445

Tyr Pro Gln Pro Glu Glu Arg Glu Leu Ser Leu Tyr Ala Ser His Gly
 450 455 460

Val Ala Val Leu Gln His Gly Ala Leu Trp Leu Leu Gly
 465 470 475

<210> 8
 <211> 1434
 <212> ADN
 <213> E. coli W

<200>
 <223> Gen que codifica sacarosa hidrolasa (CscA)

<400> 8

atgacgcaat ctcgattgca tgcggcgcaa aacgccttag caaaacttca tgagcaccgg 60
 ggtaacactt tctatcccca ttttcacctc ggcctcctg ccgggtggat gaacgatcca 120

ES 2 424 240 T3

aacggcctga tctggtttaa cgatcgttat cacgcgtttt atcaacatca tccgatgagc 180
 gaacactggg ggccaatgca ctggggacat gccaccagcg acgatatgat ccaactggcag 240
 catgagccta ttgcgctagc gccaggagac gataatgaca aagacgggtg tttttcaggt 300
 agtgctgtcg atgacaatgg tgtcctctca cttatctaca ccggacacgt ctggctcgat 360
 ggtgcaggta atgacgatgc aattcgcgaa gtacaatgtc tggctaccag tccggatggt 420
 attcatttcg agaaacaggg tgtgatcctc actccaccag aaggaatcat gcacttccgc 480
 gatcctaaag tgtggcgtga agccgacaca tgggtggatgg tagtcggggc gaaagatcca 540
 ggcaacacgg ggcagatcct gctttatcgc ggcagttcgt tgcgtgaatg gaccttogat 600
 cgcgtactgg cccacgctga tgcgggtgaa agctatatgt gggaatgtcc ggactttttc 660
 agccttggcg atcagcatta tctgatgttt tccccgcagg gaatgaatgc cgagggatac 720
 agttaccgaa atcgctttca aagtggcgta ataccggaa tgtggtcgcc aggacgactt 780
 tttgcacaat ccgggcattt tactgaactt gataacgggc atgactttta tgcaccacaa 840
 agctttttag cgaaggatgg tccggcgtatt gttatcggct ggatggatat gtgggaatcg 900
 ccaatgccct caaacctgca aggatgggca ggctgcatga cgctggcgcg cgagctatca 960
 gagagcaatg gcaaacttct acaacgcccg gtacacgaag ctgagtcggt acgccagcag 1020
 catcaatctg tctctccccg cacaatcagc aataaatatg ttttgcagga aaacgcgcaa 1080
 gcagttgaga ttcagttgca gtgggcgctg aagaacagtg atgccgaaca ttacggatta 1140
 cagctcggca ctggaatgcg gctgtatatt gataaccaat ctgagcgact tgttttgtgg 1200
 cggattacc cacacgagaa tttagacggc taccgtagta ttcccctccc gcagcgtgac 1260
 acgctcggcc taaggatatt tatcgataca tcatccgtgg aagtatttat taacgacggg 1320
 gaagcgggta tgagtagtcg aatctatccg cagccagaag aacgggaact gtcgctttat 1380
 gcctcccacg gagtggctgt gctgcaacat ggagcactct ggctactggg ttaa 1434

<210> 9
 <211> 480
 5 <212> PRT
 <213> Bacillus subtilis

<200>
 <223> Sacarosa-6-fosfato hidrolasa (SacA)

10 <400> 9

Met Thr Ala His Asp Gln Glu Leu Arg Arg Arg Ala Tyr Glu Glu Val
 1 5 10 15

Glu Lys Lys Glu Pro Ile Ala Asn Ser Asp Pro His Arg Gln His Phe
 20 25 30

ES 2 424 240 T3

His Ile Met Pro Pro Val Gly Leu Leu Asn Asp Pro Asn Gly Val Ile
 35 40 45

Tyr Trp Lys Gly Ser Tyr His Val Phe Phe Gln Trp Gln Pro Phe Gln
 50 55 60

Thr Gly His Gly Ala Lys Phe Trp Gly His Tyr Thr Thr Gln Asp Val
 65 70 75 80

Val Asn Trp Lys Arg Glu Glu Ile Ala Leu Ala Pro Ser Asp Trp Phe
 85 90 95

Asp Lys Asn Gly Cys Tyr Ser Gly Ser Ala Val Thr Lys Asp Asp Arg
 100 105 110

Leu Tyr Leu Phe Tyr Thr Gly Asn Val Arg Asp Gln Asp Gly Asn Arg
 115 120 125

Glu Thr Tyr Gln Cys Leu Ala Val Ser Asp Asp Gly Leu Ser Phe Glu
 130 135 140

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

Phe Ser Arg Ser Glu Val Trp Glu His Glu Gly Thr Trp Tyr Met Val
 165 170 175

Ile Gly Ala Gln Thr Glu Asn Leu Lys Gly Gln Ala Val Leu Phe Ala
 180 185 190

Ser Asp Asn Leu Thr Glu Trp Arg Phe Leu Gly Pro Ile Thr Gly Ala
 195 200 205

Gly Phe Asn Gly Leu Asp Asp Phe Gly Tyr Met Trp Glu Cys Pro Asp
 210 215 220

Leu Phe Ser Leu Gln Gly Ser Asp Val Leu Ile Val Ser Pro Gln Gly
 225 230 235 240

Leu Glu Ala Asp Gly Phe Arg Tyr Gln Asn Val Tyr Gln Ser Gly Tyr
 245 250 255

Phe Val Gly Arg Leu Asp Tyr Asn Lys Pro Glu Leu Lys His Gly Glu
 260 265 270

Phe Thr Glu Leu Asp Gln Gly Phe Asp Phe Tyr Ala Pro Gln Thr Leu
 275 280 285

ES 2 424 240 T3

Glu Asp Asp Gln Gly Arg Arg Ile Leu Phe Ala Trp Met Ala Val Pro
 290 295 300

Asp Gln Asp Glu Gly Ser His Pro Thr Ile Asp Cys His Trp Ile His
 305 310 315 320

Cys Met Thr Leu Pro Arg Gln Leu Thr Leu Ser Gly Gln Lys Leu Ile
 325 330 335

Gln Gln Pro Leu Pro Glu Leu Lys Ala Met Arg Arg Asn Glu Lys Lys
 340 345 350

Ile His Ile Asn Met His Gly Ser Ser Gly Ala Leu Pro Val Glu Lys
 355 360 365

Pro Glu Arg Thr Glu Ile Leu Leu Glu Asp Ile His Thr Glu Ser Gly
 370 375 380

Phe Ser Ile Ser Ile Arg Gly Thr Ala Thr Phe Ser Phe His Lys Asp
 385 390 395 400

Glu Gly Ile Val Thr Leu Glu Arg Lys Ser Phe Asp Gly Lys Arg Thr
 405 410 415

Glu Ala Arg His Cys Arg Ile Lys Asp Leu His Thr Val His Met Phe
 420 425 430

Leu Asp Ala Ser Ser Val Glu Ile Phe Ile Asn Asn Gly Glu Glu Val
 435 440 445

Phe Ser Ala Arg Tyr Phe Pro Phe Pro Gly Asn His Glu Val Thr Ala
 450 455 460

Ser Ala Thr Gly Lys Ser Glu Met Asn Val Gly Ile Trp Thr Leu Met
 465 470 475 480

- <210> 10
- <211> 1443
- 5 <212> ADN
- <213> Bacillus subtilis
- <200>
- <223> Gen que codifica sacarosa-6-fosfato hidrolasa (SacA)
- 10 <400> 10

ES 2 424 240 T3

atgacagcac atgaccagga gcttcgtcgc cgggcttatg aagaagtgga gaaaaaagag 60
 cccatcgcta acagcgatcc gcaccgccag cattttcata tcatgccgcc gggtgggctg 120
 ctgaatgacc cgaatggcgt gatttattgg aagggcagct atcatgtatt ctttcagtgg 180
 cagccgtttc agacggggca cggcgcaaaa ttttgggggc attatacgac acaggatggt 240
 gtgaattgga agcgggaaga gattgctgctg gctccgagtg attggtttga taaaaacggc 300
 tgctactcgg gcagcgtgt cacgaaagac gatcggctct atctttttta cacaggaaat 360
 gtcagggatc aggatggaat tcgggaaacg tatcaatgcc ttgctgtttc tgacgacggg 420
 ctgtcctttg agaaaaaggg tgctcgtcgc cgccttccgg aagcgatatt aacggcgcac 480
 ttttcgcgat ccgaagtatg ggagcatgaa ggcacatggt atatggtgat tgggtgcgcaa 540
 acagagaatt tgaaagggca ggctgtgttg tttgcttctg ataacctgac agagtggaga 600
 tttcttgccc cgataaccgg cgcgggcttc aacgggctgg acgattttgg atacatgtgg 660
 gaatgccctg atttgttttc cttcaagga tcggatgtgc tgattgtttc gcctcaaggg 720
 cttgaggctg acggtttccg ttatcagaac gtatatcaat caggttatth tgctggccgc 780
 ctcgattata acaagcctga actgaagcat ggtgaattta cggagcttga tcaaggtttt 840
 gatttttacg cgccgcaaac acttgaagac gatcagggaa ggcggattht atttgcatgg 900
 atggcgggtg ctgatcagga tgaagggtcc catccgacca ttgactgcca ctggattcac 960
 tgcatgacgc tgccgagaca gctgacgctt tcaggacaga agctgattca gcagccgctg 1020
 cctgagctaa aagccatgcg cagaaatgag aaaaaaatac acatcaacat gcatggatca 1080
 tctggtgctg ttccagtgga aaaacctgaa agaactgaga ttctactgga agacattcat 1140
 acggagtctg gcttttcaat cagtatccgc ggaacggcta cgttttctt ccataaagac 1200
 gaggggattg ttacgctgga acgaaagac tttgacggaa aaagaacaga agcgagacat 1260
 tgccgcatca aggatttgca taccgtacac atgtttctcg acgcgtcatc tgtggaaatc 1320
 tttatcaata acggagaaga ggtctttagt gcaagatatt ttcctttccc gggaaatcat 1380
 gaagtaacag ccagtgcgac cgggaaatct gaaatgaatg tcggaatttg gacacttatg 1440
 tag 1443

5 <210> 11
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> cebador

10 <400> 11
 ggaattcatg ctcgttttag ctagaattgg 30

15 <210> 12
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> cebador

ES 2 424 240 T3

<400> 12
 tccgagctct tactattcctt ttgcgttagc tcttg 35

5 <210> 13
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> cebador

10 <400> 13
 acctgcgagc tctttcacac aggaaacaat tttcatgcgg tcgtttttac cg 52

<210> 14
 <211> 75
 15 <212> ADN
 <213> cebador

<400> 14
 caaattttgt ttgtcatatg catgaaatct gtttctgtg tgaattact atttatattc 60

20 aatttctttc ggata 75

<210> 15
 <211> 75
 <212> ADN
 25 <213> cebador

<400> 15
 tatccgaaag aaattgaata taaatagtaa tttcacacag gaaacagatt tcatgcatat 60

30 gacaaacaaa atttg 75

<210> 16
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> cebador

35 <400> 16
 acctgcgggt accctattag tttgctaaaa attccgct 38

40 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> cebador

45 <400> 17
 ggaaacagac catggaattc 20

<210> 18
 50 <211> 24
 <212> ADN
 <213> cebador

ES 2 424 240 T3

	<400> 18	
	ccgcaaaaga tttattcgaa gaag	24
5	<210> 19 <211> 22 <212> ADN <213> cebador	
10	<400> 19	
	cctggttata tgatacttta gg	22
15	<210> 20 <211> 24 <212> ADN <213> cebador	
20	<400> 20	
	tagtgctggg cgcaagagct aacg	24
25	<210> 21 <211> 20 <212> ADN <213> cebador	
30	<400> 21	
	accagtgggc gataaaatcg	20
35	<210> 22 <211> 20 <212> ADN <213> cebador	
40	<400> 22	
	tgatcaaggt ttcgatttct	20
45	<210> 23 <211> 20 <212> ADN <213> cebador	
	<400> 23	
	ttttcctgaa tgacggcgaa	20
50	<210> 24 <211> 20 <212> ADN <213> cebador	
55	<400> 24	
	cgatctgccg caatttcaag	20

ES 2 424 240 T3

<210> 25
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> cebador
 5 <400> 25
 atatctgcag ccggcattaa atattagtca ac 32
 10 <210> 26
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> cebador
 15 <400> 26
 cgttctaacg gaggttgaaa actgcccttt 30
 <210> 27
 <211> 31
 20 <212> ADN
 <213> cebador
 <400> 27
 25 gtctccctat cacgccgta ttttcattat t 31
 <210> 28
 <211> 30
 <212> ADN
 30 <213> cebador
 <400> 28
 attagtcgac accatcccca cggatacat 30
 35 <210> 29
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> cebador
 40 <400> 29
 tttcaacctc cgtagaacg cggctacaat 30
 45 <210> 30
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> cebador
 50 <400> 30
 taacggcgtg ataggagac cggcagatcc 30
 55 <210> 31
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> cebador

ES 2 424 240 T3

<400> 31
 atacactgca gttatgcaat ttatcgcacc c 31

5 <210> 32
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> cebador

10 <400> 32
 aatctgctct gatgcggtcg tgaaatgctt cca 33

15 <210> 33
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> cebador

20 <400> 33
 cacagaatca ggacaaatgg cattcaatgc tg 32

25 <210> 34
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> cebador

<400> 34

30 atactgtcga ctcaatggca tatgcagcg 29

<210> 35
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> cebador

35 <400> 35
 aagcatttca cgaccgcatc agagcagatt gtactgagag 40

40 <210> 36
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> cebador

45 <400> 36
 ttgaatgccca tttgtcctga ttctgtggat aaccgtatta c 41

50 <210> 37
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> cebador

55 <400> 37
 cggggcgaaa gtgattgaga 20

ES 2 424 240 T3

<210> 38
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> cebador

 <400> 38

 aattgccgcc tgggtattgg 20

 10
 <210> 39
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> cebador

 15
 <400> 39

 acctttacta ccgcactgct gg 22

 20
 <210> 40
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> cebador

 25
 <400> 40

 gcgggagtca gtgaacaggt ac 22

 30
 <210> 41
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> cebador

 <400> 41

 35 gatcttgagt ccgtaaaaca ggctt 25

 40
 <210> 42
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> cebador

 <400> 42

 ttccgctcaa gccattgtag tg 22

 45
 <210> 43
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> cebador

 50
 <400> 43

 actgagccat ggcgaaaatc aataaagtag atc 33

 55
 <210> 44
 <211> 34
 <212> ADN

ES 2 424 240 T3

	aaagtcacgg ttggtattcc	20
	<210> 51	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> cebador	
	<400> 51	
10	catttaatgc cgetcatatt	20
	<210> 52	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> cebador	
	<400> 52	
	accgctcaat tattgagatt	20
20		

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un vector recombinante que contiene un gen (*ptsG*) que codifica una sacarosa fosfotransferasa y un gen *sacC* que codifica sacarosa-6-fosfato hidrolasa, en donde el gen *ptsG* tiene la SEQ ID NO: 2.
- 2.- El vector recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el gen *sacC* tiene la SEQ ID NO: 4.
- 10 3.- Un microorganismo recombinante capaz de metabolizar sacarosa, en que el vector recombinante de la reivindicación 1 se introduce en una célula hospedante seleccionada del grupo que consiste en bacterias, levaduras y hongos.
- 15 4.- Un microorganismo recombinante capaz de metabolizar sacarosa, en el que un gen (*ptsG*) que codifica una sacarosa fosfotransferasa y un gen (*sacC*) que codifica sacarosa-6-fosfato hidrolasa se introducen en un ADN cromosómico de una célula hospedante seleccionada del grupo que consiste en bacterias, levaduras y hongos, en donde el gen *ptsG* tiene la SEQ ID NO: 2.
- 5.- El microorganismo recombinante capaz de metabolizar sacarosa de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el gen *sacC* tiene la SEQ ID NO: 4.
- 20 6.- Un método para producir metabolitos, polímeros biodegradables o proteínas recombinantes, comprendiendo el método cultivar el microorganismo recombinante de la reivindicación 3 en un medio que contiene sacarosa como una fuente de carbono.
- 25 7.- Un método para producir metabolitos, polímeros biodegradables o proteínas recombinantes, comprendiendo el método cultivar el microorganismo recombinante de la reivindicación 4 en un medio que contiene sacarosa como una fuente de carbono.

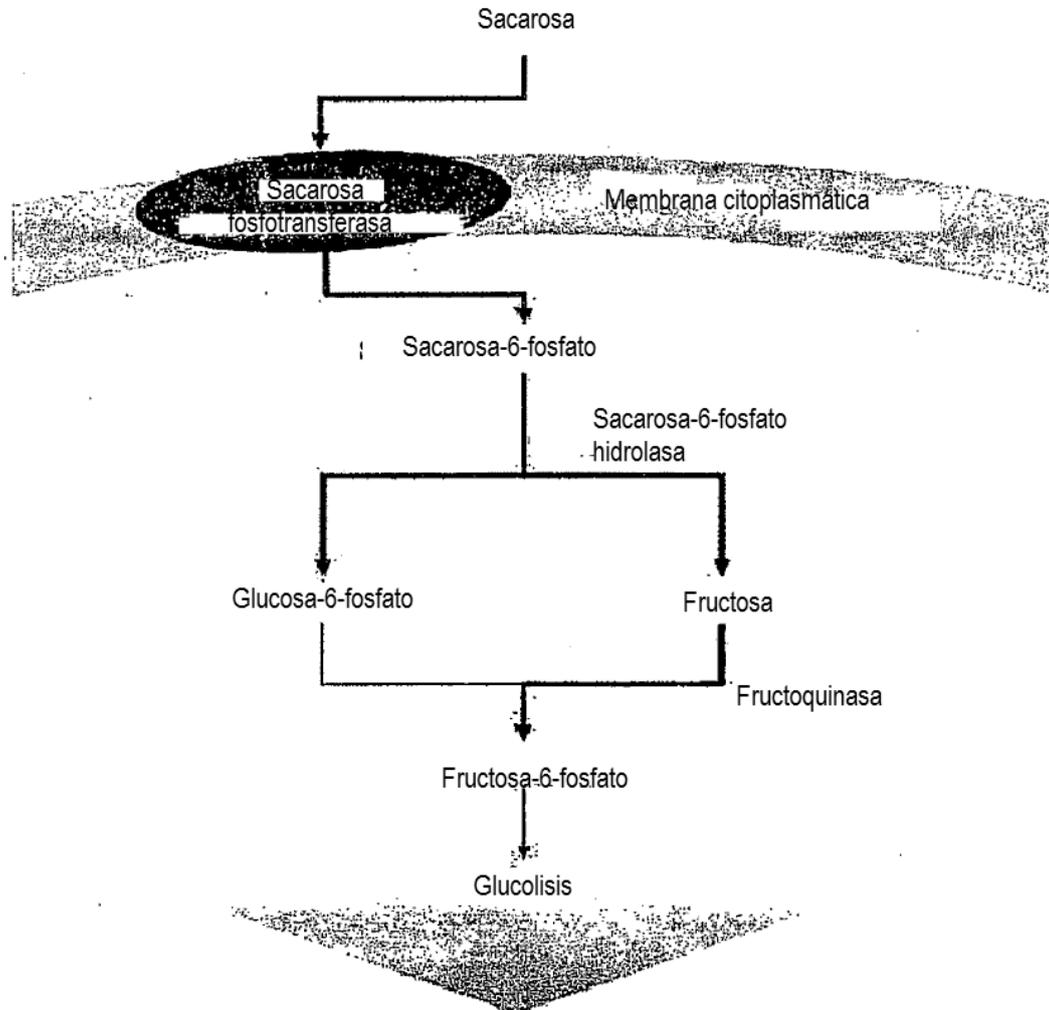


FIG. 2

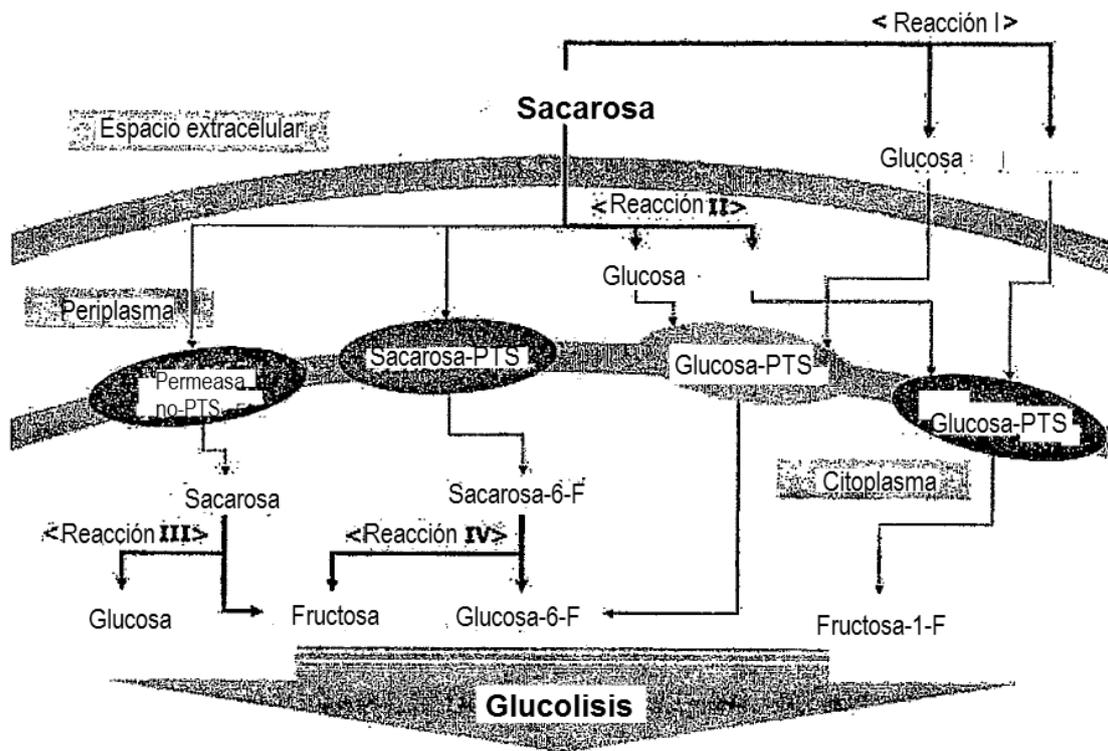


FIG. 3

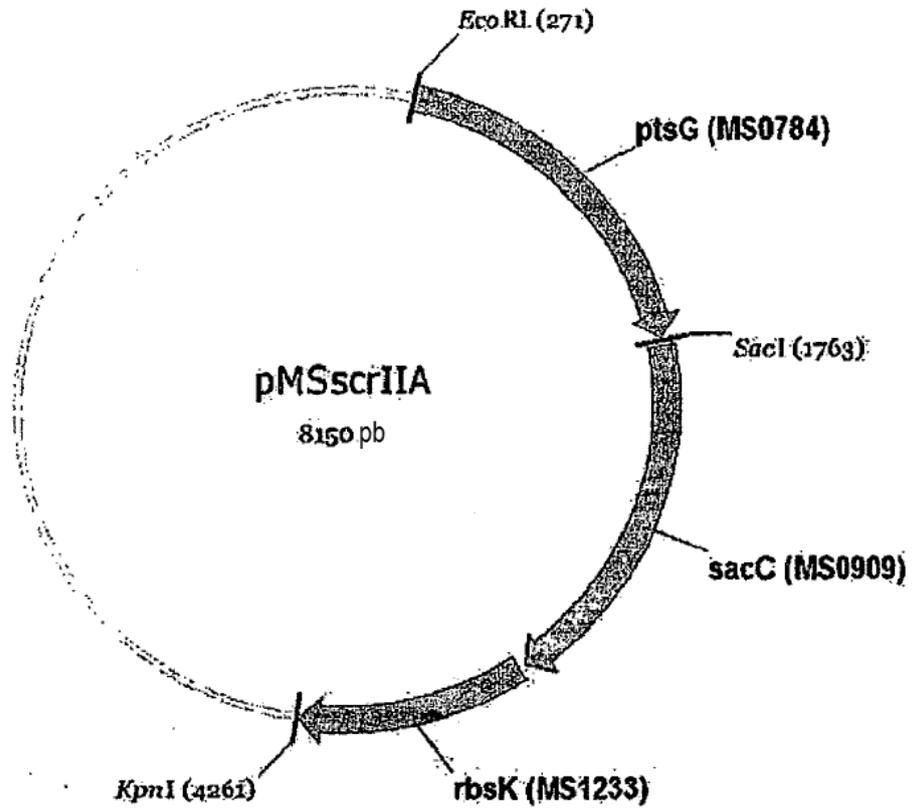


FIG. 4

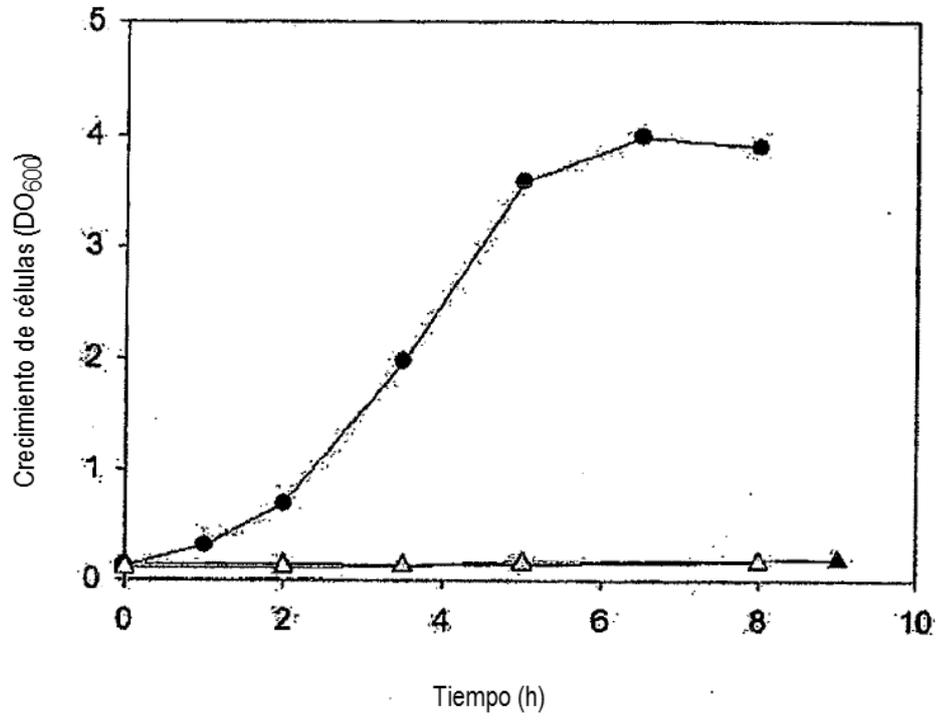


FIG. 5

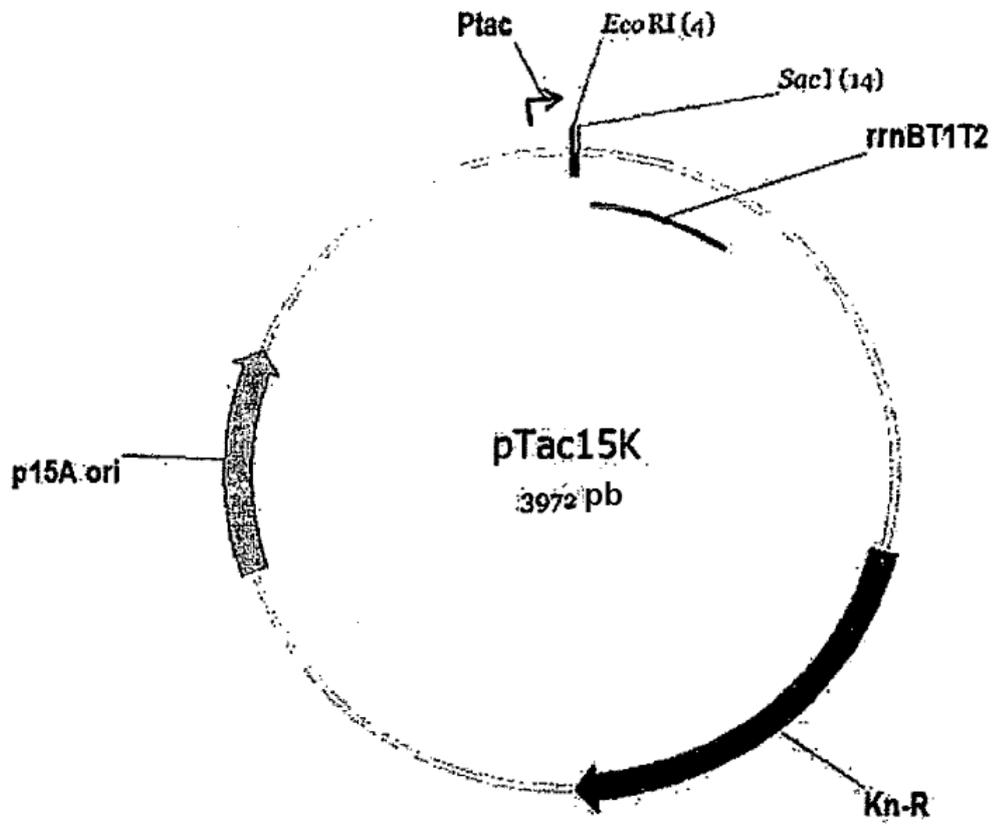


FIG. 6

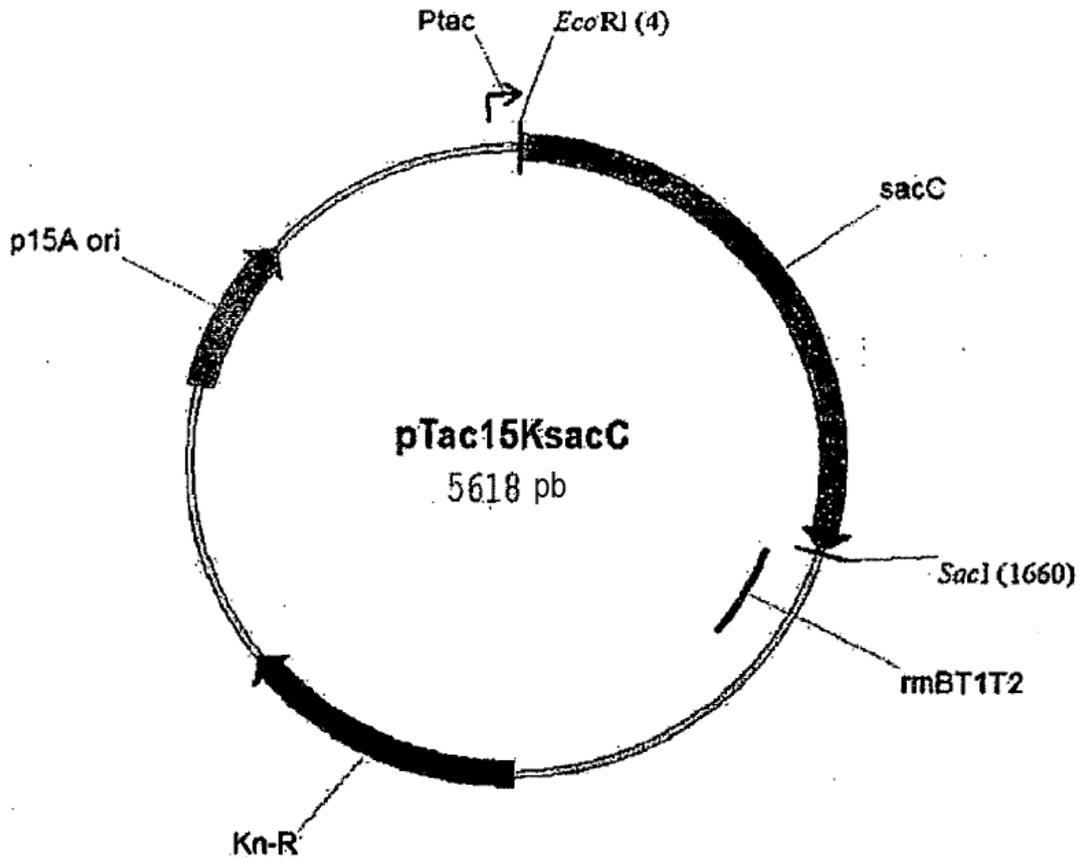


FIG. 7

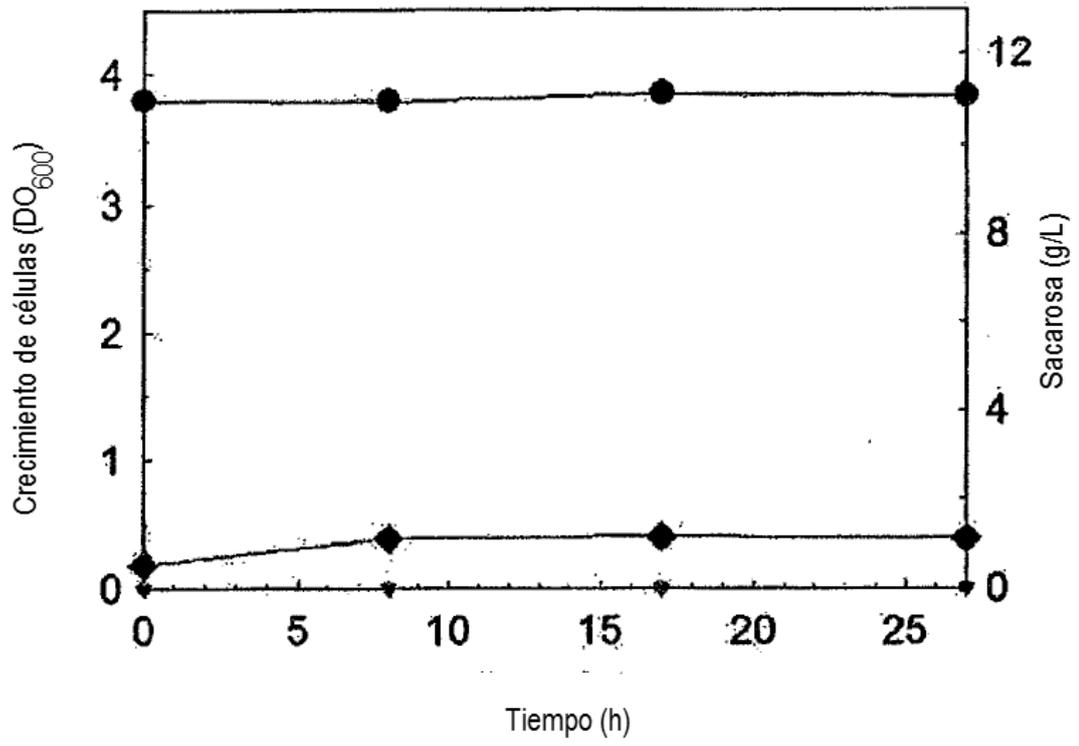


FIG. 8

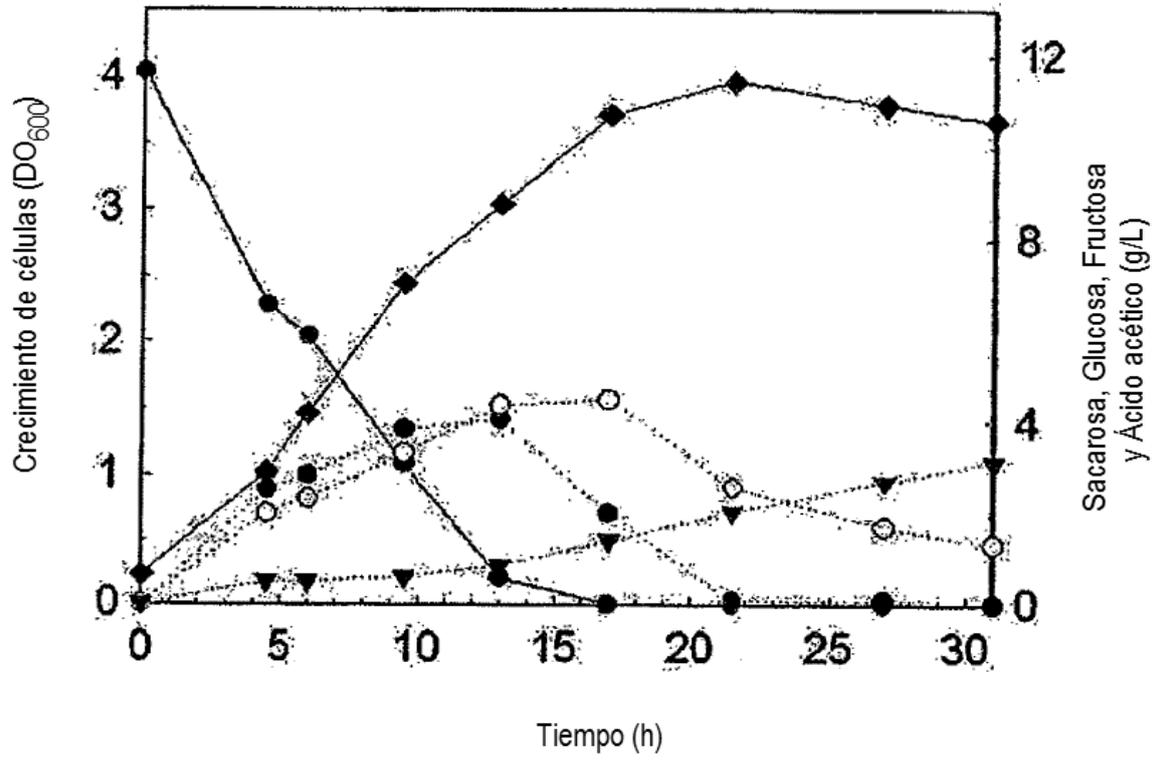


FIG. 9

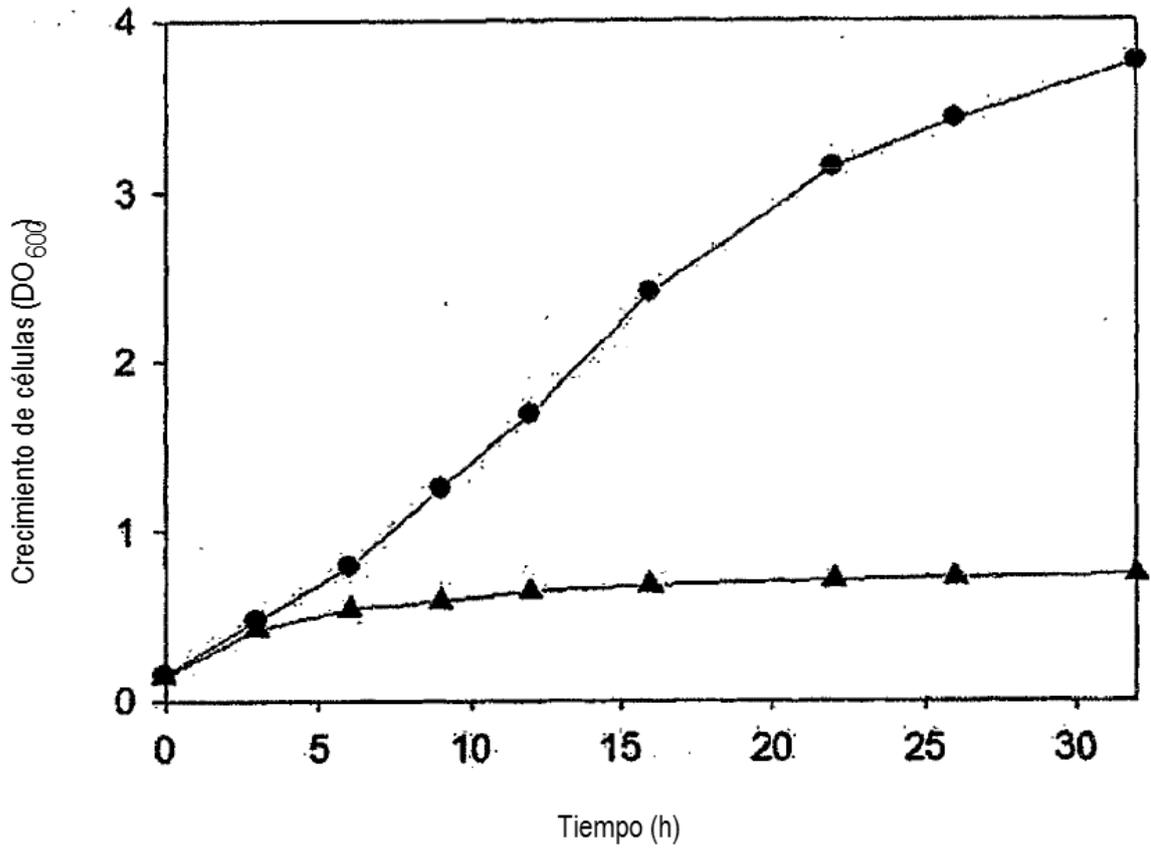


FIG. 10

