

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 167**

51 Int. Cl.:

C12P 19/12 (2006.01)

C12P 19/24 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2010** **E 10768885 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015** **EP 2499253**

54 Título: **Microorganismos con mayor actividad de sacarosa mutasa**

30 Prioridad:

11.11.2009 DE 102009053566

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

17.08.2015

73 Titular/es:

**SÜDZUCKER AKTIENGESELLSCHAFT
MANNHEIM/OCHSENFURT (100.0%)
Maximilianstrasse 10
68165 Mannheim, DE**

72 Inventor/es:

**PELZER, STEFAN;
ZUREK, CHRISTIAN;
ROSE, THOMAS;
ECK, JÜRGEN;
WACH, WOLFGANG;
KLINGEBERG, MICHAEL y
HARMS, KARSTEN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 543 167 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

Microorganismos con mayor actividad de sacarosa mutasa

- 5 La presente invención se refiere a la preparación biotecnológica de isomaltulosa y a composiciones que contienen isomaltulosa, y proporciona mejores medios para ello, sobre todo células microbianas.

10 Los disacáridos isomaltulosa (palatinosa) y trehalulosa se pueden obtener por transposición (isomerización) de la sacarosa (azúcar de caña, azúcar de remolacha). Los productos de isomerización de la sacarosa, sobre todo la isomaltulosa, se emplean cada vez más como sucedáneo de la sacarosa en los productos alimenticios y afines. La isomaltulosa es un azúcar acariógeno de bajo índice glicémico que desde 2005 está autorizado como producto alimenticio o aditivo de uso alimentario. Además las composiciones de isomaltulosa o con contenido de isomaltulosa que pueden obtenerse a partir de la sacarosa son materias primas para preparar el alcohol de azúcar isomalt, una mezcla racémica de 1,6-GPS (6-O- α -D-glucopiranosil-D-sorbita) y 1,1-GPM (1-O- α -D- glucopiranosil-D-manita), así como sus derivados, en particular mezclas enriquecidas en GPS o GPM. Entretanto el isomalt se ha asentado como sucedáneo de azúcar en productos alimenticios y afines. La transformación de isomaltulosa a isomalt y productos similares tiene lugar, como es sabido, por hidrogenación catalítica y alternativamente por conversión biotecnológica.

20 La producción biotecnológica de isomaltulosa y trehalulosa tiene lugar como es sabido por isomerización enzimática de la sacarosa, utilizando preferiblemente células bacterianas inmovilizadas o fragmentos de ellas. En este caso la isomerización tiene lugar por acción del enzima bacteriana sacarosa mutasa, E. C. 5.4.99.11 (sinónimo: sacarosa isomerasa, sacarosa mutasa, isomaltulosa sintasa). Microorganismos que tienen actividad conocida de sacarosa mutasa y pueden utilizarse en procesos biotecnológicos son en concreto *Protaminobacter rubrum*, *Erwinia rhapontici*, *Pseudomonas mesoacidophila*, *Pantoea dispersa* y *Serratia plymuthica*. Su sacarosa mutasa es conocida por las denominaciones SmuA, Pall, SmtA, MutB, SIM y otras. Las sacarosa mutasas bacterianas son codificadas por un gen cromosómico. La expresión genética es controlada por un elemento promotor de sacarosa mutasa. De aquí en adelante estas sacarosa mutasas se mencionan unitariamente, de manera general, con la denominación "SmuA" de la sacarosa mutasa de *P. rubrum*, aunque las sacarosa mutasas no se limitarían a esta. En *P. rubrum* la SmuA es codificada por el gen cromosómico denominado *smuA*; la expresión es controlada por un elemento promotor de *smuA*. En lo sucesivo también figura la denominación *smuA* como representativa de los genes de sacarosa mutasa de otros organismos.

35 A través de las patentes EP 0751218 A y WO 95/20047 A se conocen microorganismos transgénicos modificados genéticamente que poseen actividad de sacarosa mutasa, en los cuales hay al menos un gen codificador de la actividad enzimática del metabolismo de la sacarosa que está inactivado por mutagénesis de la célula.

40 La tasa de conversión del sustrato sacarosa a isomaltulosa y adicionalmente, dado el caso, a trehalulosa en los microorganismos conocidos es susceptible de mejora. Además en los microorganismos conocidos la actividad de sacarosa mutasa también depende de la concentración o presencia de sacarosa en el medio de cultivo, lo cual complica la realización del proceso biotecnológico. Asimismo existen limitaciones y disposiciones para organismos genéticamente alterados (GmO), como por ejemplo el Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) [Reglamento alemán de seguridad en tecnología genética]. Además de microorganismos capaces de proporcionar un mayor rendimiento de isomaltulosa, también se desea de disponer de microorganismos mejorados que no estén sujetos a normas legales.

45 El problema técnico de la presente invención consiste en disponer de mejores métodos y medios, sobre todo de microorganismos mejorados, para la preparación biotecnológica de isomaltulosa y composiciones con contenido de isomaltulosa, que superen las conocidas desventajas del estado técnico.

50 La presente invención resuelve completamente el problema técnico proporcionando una nueva célula microbiana que comparada con el tipo natural de esta célula, preferiblemente sin modificar, muestra una tasa de formación - es decir de síntesis - de isomaltulosa multiplicada como mínimo por el factor 2, preferiblemente por el factor 2,5, con especial preferencia por el factor 3, 4, 5 o más.

55 A este respecto la presente invención proporciona preferiblemente una célula que posee una actividad - es decir en concreto una actividad volumétrica de la sacarosa mutasa expresada por la célula - multiplicada como mínimo por el factor 2, preferiblemente por el factor 2,5, con especial preferencia por el factor 3, 4, 5 o más en comparación con su tipo natural. En una forma de ejecución preferida la célula de la presente invención muestra una expresión de la sacarosa mutasa independiente del sustrato, concretamente de la concentración de sacarosa, en comparación con su tipo natural.

60 En la presente invención, para disponer de la célula según la misma se prevé sustituir en la célula de tipo natural - preferiblemente sin modificar - la región no codificadora del promotor del gen *smuA* que codifica la sacarosa mutasa SmuA por otro promotor potente, preferiblemente endógeno u homólogo, o por un fragmento funcional del mismo (= promotor sucedáneo). Los presentes inventores encontraron sorprendentemente promotores muy efectivos de tipo homólogo y sobre todo endógeno, es decir propios del organismo, así como fragmentos de los mismos con los

cuales se puede incrementar la expresión del gen *smuA* y por tanto, especialmente, la concentración de sacarosa mutasa en el periplasma de la célula, la actividad volumétrica y la tasa de formación de isomaltulosa en comparación con la célula de tipo natural.

5 Por consiguiente el objeto de la presente invención es una célula que lleva en el genoma un gen de sacarosa mutasa, preferiblemente endógeno (gen *smuA*), que codifica una sacarosa mutasa (SmuA), en la cual un elemento promotor o un promotor de sacarosa mutasa (promotor de *smuA*) - es decir, al menos una unidad controladora o reguladora de la expresión de este gen – está reemplazado por otro promotor o un fragmento del mismo (promotor sucedáneo) escogido entre: (a) un promotor endógeno distinto del promotor de *smuA* procedente de la propia cepa
10 de la célula (promotor propio, endógeno), en concreto el promotor del gen de la 3,4-dihidroxi-2-butanon-4-fosfato sintasa (*ribB*); (b) un promotor homólogo del promotor endógeno según (a) procedente de una cepa donante (promotor ajeno, homólogo), y (c) un fragmento funcional de promotor (a) o (b) - en que el promotor sucedáneo está caracterizado por una molécula polinucleótida escogida del grupo formado por moléculas con una secuencia de nucleótidos según SEQ ID N°: 2 hasta SEQ ID N°: 3 y secuencias homólogas de las mismas con al menos 85% de
15 coincidencia - que controla o regula especialmente la expresión de este gen *smuA* y sobre todo puede aumentarla respecto a la célula de tipo natural.

Según una forma de ejecución especialmente preferida esta célula es una cepa autoclonada, producida por autoclonación con sus propias secuencias genéticas (endógenas). Por lo tanto la célula de la presente invención es
20 preferiblemente una cepa reorganizadora del promotor. Según la presente invención se crea una cepa con mejores propiedades utilizando una copia de otro fragmento regulador, no codificador de proteína, preferiblemente propio de la cepa (endógeno), es decir un promotor o fragmento funcional del mismo empleado para expresar su propia sacarosa mutasa mediante la reorganización del promotor. Ventajosamente esta cepa reorganizadora del promotor no forma ninguna proteína nueva, sino que preferentemente solo vehicula la expresión de mayores cantidades de la
25 sacarosa mutasa SmuA propia de la célula, de la misma forma que su tipo natural. Por consiguiente no se prefiere ningún gen y/o fragmento genético ajeno a la célula y tampoco que la célula de la presente invención contenga moléculas ajenas de ácidos polinucleicos, codificadoras y/o no codificadoras, ni episomales ni cromosómicas. Se comprende que en esta variante de ejecución de la presente invención, para obtener la cepa de autoclonación se introducen temporalmente en la célula elementos vectoriales intermedarios que no se manifiestan ahí de forma
30 duradera, sino que preferentemente según la presente invención se eliminan de la célula por selección en el segundo paso de recombinación. Las secuencias genéticas se intercambian preferiblemente sin dejar huella. En esta forma de ejecución, el método de la presente invención renuncia a infiltrar duraderamente material genético de un "organismo donante" ajeno según el GenTSV. Así se dispone de una célula microbiana mejorada, que según las normas y directrices legales no es considerada como "organismo genéticamente alterado" (GVO). No es necesario cumplir en absoluto o completamente las normas de seguridad, restricciones de uso y disposiciones vigentes para
35 los GVO, lo cual facilita el aprovechamiento económico de la célula según la presente invención.

En una segunda forma de ejecución alternativa la presente invención proporciona una célula recombinante que lleva un promotor homólogo. En vez del promotor natural de *smuA*, esta célula lleva al menos otro promotor que procede
40 de un organismo donante homólogo o un fragmento funcional de este promotor, el cual es preferiblemente homólogo del promotor sucedáneo endógeno de la primera forma de ejecución de la presente invención.

Según la presente invención el promotor sucedáneo es elegido o caracterizado como el

45 - promotor del gen de la 3,4-dihidroxi-2-butanon-4-fosfato sintasa (*ribB*).

Con él pueden estar relacionados los siguientes promotores:

50 - promotor del gen *ompA*, que codifica la "proteína de membrana externa",
- promotor del gen codificador del "activador de transcripción putativo ECA2934",
- promotor del gen de la ribonucleasa E *me*,
- promotor del operón de la proteína L21 de la subunidad ribosómica 50S,
- promotor del operón de la proteína de choque frío CspE,
- promotor del operón de la proteína L28 de la subunidad ribosómica 50S, y
55 - promotor del gen de la epimerasa-deshidratasa dependiente de NAD.

En una variante preferida se prevé como promotor sucedáneo un fragmento funcional del promotor completo, que es capaz de regular la expresión del gen *smuA* según la presente invención.

60 En las tablas 1A y 1B figuran listas de promotores sucedáneos y sus fuentes características.

Tabla 1A

Tamaño (pb)	Fragmento del promotor caracterizado en la fuente; homología con:	SEQ ID N°:
321	Región promotora <i>ribB</i> de <i>P. rubrum</i> (3,4-dihidroxi-2-butanon-4-fosfato sintasa)	2

313	Región promotora ribB (3,4-dihidroxi-2-butanon-4-fosfato sintasa), <i>Spro_4286</i> de <i>Serratia proteamaculans 568</i> , identidades = 298/313 (95%)	3
228	Región promotora ompA de <i>P. rubrum</i>	4
180	Promotor ompA de <i>S. proteamaculans</i> (<i>Spro_1754</i>) identidades = 178/180 (98%)	5
178	Promotor ompA de <i>S. marcescens</i> (emb X00618.1) identidades = 173/180 (96%)	6
109	Región intergenética de <i>P. rubrum</i> entre "proteína hipotética ECA2934" y "regulador transcripcional putativo"	7
59	Región promotora ante "regulador transcripcional putativo de ECA2934 [<i>Pectobacterium atrosepticum</i> SCR11043]" de <i>Erwinia carotovora subsp. atroseptica</i> SCR11043 (emb BX950851.1) identidades = 51/59 (86%)	8
209	Región intergenética de <i>P. rubrum</i> entre "ribonucleasa E" y "pseudouridilato sintasa C 23S de ARNr"; actividad promotora en la dirección de ribonucleasa	9
210	Región intergenética entre "ribonucleasa E" (<i>Spro_1898</i>) y pseudouridilato sintasa C 23S de ARNr (<i>Spro_1899</i>) en <i>S. proteamaculans</i> (gb CP000826.1) identidades = 203/210 (96%)	10
165	Región promotora del gen de la "ribonucleasa E (rne)" de <i>Serratia marcescens</i> (gb AF259269.1, AF259269) identidades = 158/165 (95%)	11

Tabla 1B

Tamaño (pb)	Fragmento del promotor caracterizado en la fuente; homología con:	SEQ ID N°:
242	Región intergenética de <i>P. rubrum</i> : genes flanqueadores "octaprenildifosfato sintasa" y "proteína L21 de la subunidad ribosómica 50S"	12
242	Región promotora de la "proteína L21 de la subunidad ribosómica 50S" (<i>Spro_0473</i>) de <i>S. proteamaculans</i> (gb CP000826.1) identidades = 236/242 (97%)	13
120	Región promotora de <i>P. rubrum</i> de la "proteína de choque frío CspE"	14
118	Región promotora de la "proteína de choque frío CspE" (<i>Spro_1189</i>) de <i>S. proteamaculans</i> (gb CP000826.1) identidades = 111/118 (94%)	15
115	Región promotora de la "proteína de choque frío CspE" identidades = 94/115 (81%)	16
238	Región promotora de <i>P. rubrum</i> de la "proteína L28 de la subunidad ribosómica 50S"	17
238	Región promotora de la "proteína L28 de la subunidad ribosómica 50S" (<i>Spro_4481</i> ; gen "rpmB") de <i>S. proteamaculans</i> (gb CP000826.1) identidades = 231/238 (97%)	18
238	Región del "grupo de genes waa" de <i>S. marcescens</i> cepa N28b (gb U52844.3 SMU52844) identidades = 226/238 (94%)	19
152	Región promotora de <i>P. rubrum</i> de la "epimerasa-deshidratasa dependiente de NAD"	20
86	Región promotora de la "epimerasa-deshidratasa dependiente de NAD (<i>Spro_2372</i>)" de <i>S. proteamaculans</i> (gb CP000826.1) identidades = 73/86 (84%)	21

- 5 Un fragmento sucedáneo empleado con preferencia en la presente invención, procedente del promotor del gen de la 3,4-dihidroxi-2-butanon-4-fosfato sintasa ribB o de una región homóloga, está caracterizado por una secuencia nucleótida elegida entre: SEQ ID N°: 2 y SEQ ID N°: 3. En una forma de ejecución preferida la célula es una célula de *P. rubrum* autoclonada con el fragmento sucedáneo según la SEQ ID N°: 2 de *P. rubrum*.
- 10 Un fragmento sucedáneo preferido según la presente invención, procedente del promotor del gen *ompA* que codifica la "proteína de membrana externa" o de una región homóloga, está caracterizado por una secuencia nucleótida elegida entre: SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5 y SEQ ID N°: 6 y una célula de *P. rubrum* autoclonada con el fragmento sucedáneo según la SEQ ID N°: 4 de *P. rubrum*.
- 15 Un fragmento sucedáneo preferido según la presente invención, procedente del promotor del gen del activador de transcripción putativo ECA2934 o de una región homóloga, está caracterizado por una secuencia nucleótida elegida entre: SEQ ID N°: 7 y SEQ ID N°: 8 y una célula de *P. rubrum* autoclonada con el fragmento sucedáneo según la SEQ ID N°: 7 de *P. rubrum*.
- 20 Un fragmento sucedáneo preferido según la presente invención, procedente del promotor del gen de la ribonucleasa E *rne* o de una región homóloga, está caracterizado por una secuencia nucleótida elegida entre: SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10 y SEQ ID N°: 11 y una célula de *P. rubrum* autoclonada con el fragmento sucedáneo según la SEQ ID N°: 9 de *P. rubrum*.
- 25 Un fragmento sucedáneo preferido según la presente invención, procedente del promotor del operón de la proteína L21 de la subunidad ribosómica 50S o de una región homóloga, está caracterizado por una secuencia nucleótida elegida entre: SEQ ID N°: 12 y SEQ ID N°: 13 y una célula de *P. rubrum* autoclonada con el fragmento sucedáneo según la SEQ ID N°: 12 de *P. rubrum*.

Un fragmento sucedáneo preferido según la presente invención, procedente del promotor del operón de la proteína de choque frío CspE o de una región homóloga, está caracterizado por una secuencia nucleótida elegida entre: SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15 y SEQ ID N°: 16 y una célula de *P. rubrum* autoclonada con el fragmento sucedáneo según la SEQ ID N°: 14 de *P. rubrum*.

Un fragmento sucedáneo preferido según la presente invención, procedente del promotor del operón de la proteína L28 de la subunidad ribosómica 50S o de una región homóloga, está caracterizado por una secuencia nucleótida elegida entre: SEQ ID N°: 17, SEQ ID N°: 18 y SEQ ID N°: 19 y una célula de *P. rubrum* autoclonada con el fragmento sucedáneo según la SEQ ID N°: 17 de *P. rubrum*.

Un fragmento sucedáneo preferido según la presente invención, procedente del promotor del gen de la epimerasa-deshidratasa dependiente de NAD o de una región homóloga, está caracterizado por una secuencia nucleótida elegida entre: SEQ ID N°: 20 y SEQ ID N°: 21 y una célula de *P. rubrum* autoclonada con el fragmento sucedáneo según la SEQ ID N°: 20 de *P. rubrum*.

Por tanto el promotor sucedáneo endógeno o, alternativamente, homólogo de la presente invención se caracteriza o, preferiblemente, está formado por un polinucleótido que preferentemente presenta o consta de una secuencia de nucleótidos escogida del grupo de las secuencias endógenas u homólogas según la presente invención consistentes en SEQ ID N°: 2 hasta SEQ ID N°: 21 y sus modificaciones y fragmentos funcionales. Como promotor sucedáneo se emplea con preferencia justamente este polinucleótido o alternativamente lo contiene como el elemento funcional esencial o característico. Por consiguiente la presente invención también se refiere a fragmentos o modificaciones funcionales accesibles fácilmente para el especialista de este polinucleótido mencionado en concreto, siempre que puedan actuar como promotores o en general como elementos reguladores de la expresión del gen *smuA* de la sacarosa mutasa.

La presente invención también se refiere preferentemente a moléculas polinucleótidas funcionales con secuencias homólogas que coinciden al menos en un 85%, preferiblemente en más del 90% o del 95% o del 97% (identidades) con las secuencias mencionadas en concreto anteriormente. El especialista conoce los métodos experimentales y los algoritmos para la determinación de la homología secuencial y la analogía funcional.

Por "fragmento funcional" se entiende sobre todo una molécula polinucleótida con una secuencia acortada respecto a la secuencia concretamente indicada, que al menos lleva o, preferiblemente, consta del propio motivo promotor, es decir la unidad reguladora que vehicula la expresión del gen *smuA*. El especialista conoce métodos de cribado rutinarios que sirven para determinar los fragmentos funcionales adecuados según la presente invención. Estos fragmentos fácilmente identificables son asimismo objeto de la presente invención. Se prefieren los fragmentos acortados aproximadamente en 100 pb, 50 pb, 20 pb, 10 pb, 5 pb o 2 pb respecto a la molécula polinucleótida aquí citada concretamente o en unas 50, 20, 10, 5 o 2 del número de bases original.

Por "modificación funcional" de la molécula polinucleótida con las secuencias citadas en concreto se entiende sobre todo una molécula polinucleótida como unidad reguladora capaz de vehicular la expresión del gen *smuA*, la cual se diferencia directamente de la molécula polinucleótida concreta, sobre todo, por intercambio (sustitución), supresión (delección) o complementación (adición) de uno o más nucleótidos. El especialista conoce métodos de cribado que sirven para encontrar fácilmente dichas moléculas modificadas, apropiadas para llevar a cabo la presente invención. Se prefieren las modificaciones obtenidas por sustitución, delección y/o adición de 1 o más - 2, 3, 4, 5 - o de unos 10, 20, 50 o 100 o más nucleótidos en las moléculas polinucleótidas concretamente mencionadas.

Según una variante preferida de la presente invención, estas modificaciones o fragmentos funcionales proceden endógenamente de la célula huésped, preferentemente de su genoma. Según una variante alternativa, estas modificaciones o fragmentos son elementos homólogos de otros organismos.

Además la presente invención también comprende moléculas polinucleótidas resultantes como es sabido de la síntesis o alteración aleatoria de los mencionados promotores sucedáneos, la cuales son adecuadas como unidades reguladoras para vehicular la expresión del gen *smuA* en la célula y se pueden utilizar como promotores sucedáneos conforme a la presente invención. El especialista puede prepararlas de manera conocida mediante procedimientos rutinarios a partir de esta descripción.

El elemento promotor de *smuA* intercambiado o "sustituido" de la presente invención está localizado preferiblemente en una unidad de *smuA* y con preferencia en la región intergenética entre el gen *smuA* y un ORF recién hallado situado anteriormente. Por "unidad de *smuA*" se entiende aquí la organización cromosómica situada antes del gen *smuA*, con secuencias reguladoras en la 5'-UTR (promotor, operador) de la expresión de *smuA*. La unidad de *smuA* se caracteriza especialmente por el polinucleótido con la SEQ ID N°: 1 (fig. 1); las figuras 3ABC ilustran el elemento que debe intercambiarse preferentemente en la región intergenética de la unidad de *smuA* de *P. rubrum*.

En la presente invención se prevé con preferencia una célula huésped escogida de microorganismos del grupo de las gammaproteobacteria clasificadas y no clasificadas. La célula está escogida preferentemente del grupo formado por microorganismos de los géneros: *Escherichia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Rauoltella*,

Pectobacterium, Pseudomonas, Azotobacter, Pantoea, Leucanea, así como Protaminobacter. La célula está elegida con especial preferencia del grupo formado por: *Klebsiella* sp., sobre todo las cepas LX3 y NK33-98-8, *Klebsiella pneumoniae*, sobre todo la cepa 342; *Enterobacter* sp., sobre todo la cepa SZ62; *Enterobacter* sp., sobre todo la cepa FMB1; *Rauoltella planticola*; *Pantoea dispersa*; *Erwinia rhapontici*; *Erwinia tasmaniensis*, sobre todo la cepa Et1/99; *Pectobacterium atrosepticum*, sobre todo la cepa SCRI 1043; *Pectobacterium carotovum*, sobre todo la Subespecies brasiliensis, sobre todo la cepa PBR 1692; *Protaminobacter rubrum*; *Pseudomonas mesoacidophila*; *Serratia plymuthica*, así como *Azotobacter vinelandii* y *Leucanea leucocephalia*. En una variante especialmente preferida la célula es *Protaminobacter rubrum* (*P. rubrum*) o una cepa derivada de la misma biotecnológicamente apta. Se entiende que la presente invención se extiende también a formas de estas células huésped inmovilizadas y/o modificadas de otra manera, que puedan ser especialmente adecuadas para procesos biotecnológicos.

También son objeto de la presente invención medios para obtener una célula según la presente invención, sobre todo una cepa autoclonada. Un medio de este tipo es una molécula polinucleótida - preferentemente aislada - ya descrita antes detalladamente como tal, que contiene o consta del promotor sucedáneo anteriormente descrito o de un fragmento funcional del mismo capaz de regular la expresión del gen *smuA* y que además lleva un segmento expresable codificador de la sacarosa mutasa que está bajo el control de expresión de este elemento regulador.

También es objeto de la presente invención un vector o un sistema vectorial, sobre todo un plásmido de intercambio, que sea apropiado para infiltrar en una célula la molécula polinucleótida de la presente invención, anteriormente caracterizada con mayor detalle, es decir el promotor sucedáneo o el fragmento del mismo. La célula huésped es preferentemente uno de los microorganismos anteriormente definidos. El vector sirve preferiblemente para integrar el promotor sucedáneo o un fragmento del mismo en el genoma cromosómico de la célula, sobre todo para sustituir el promotor natural del gen *smuA* en el cromosoma de la célula, con el fin de generar así, especialmente, una cepa de autoclonación.

El vector de intercambio que vehicula el promotor sucedáneo está configurado preferiblemente de manera que no replique en la célula huésped en la cual se introduce. Un constructo vectorial preferido es un derivado de pUT que está basado en un origen de replicación R6K; este vector no replica concretamente en *P. rubrum*, al menos no de modo condicional.

También es objeto de la presente invención un método para obtener una célula según la presente invención capaz de transformar sacarosa en isomaltulosa o composiciones de isomaltulosa, el cual consta de las siguientes etapas: en una primera etapa se prepara una cepa de tipo natural o una cepa de la célula, modificada de manera clásica o recombinante; en una segunda etapa esta cepa se pone en contacto o se une con al menos una de las moléculas polinucleótidas anteriormente descritas, por tanto en concreto con el promotor sucedáneo o el fragmento del mismo y/o al menos uno de los vectores anteriormente caracterizados que contienen el promotor sucedáneo o el fragmento del mismo, de modo que preferiblemente el promotor sucedáneo o el plásmido de intercambio se infiltre en la célula. Un método preferido es la conjugación intergenética, sobre todo con *E. coli* como cepa donante.

En otra etapa preferida, sobre todo seguida, la célula se cultiva en condiciones que permitan una recombinación homóloga entre la molécula polinucleótida o el vector o plásmido de intercambio infiltrados que lleva la molécula polinucleótida y el respectivo segmento del genoma celular, a fin de integrar el promotor sucedáneo en el genoma de la célula. En una forma de ejecución preferida el vector o plásmido de intercambio, que ya no contiene el promotor sucedáneo incluido al principio y que contiene preferiblemente el promotor de *smuA* intercambiado, es eliminado por selección del segundo paso de recombinación.

Según un segundo aspecto de la presente invención son objeto de la misma unas células en las cuales el gen *smuA* se expresa de manera alternativa, o preferiblemente adicional, fuera del cromosoma (episomal), en concreto bajo la regulación de al menos uno de los promotores sucedáneos anteriormente definidos o de sus fragmentos funcionales, así como medios para obtener tales células recombinantes. Un medio de esta clase es otra molécula polinucleótida que contenga al menos una copia simple o múltiple de un segmento expresable codificador de sacarosa mutasa y además, como mínimo, una copia simple o múltiple de otro elemento regulador de la expresión de esta sacarosa mutasa, en concreto, por tanto, un elemento promotor. El elemento regulador de la expresión de la sacarosa mutasa está seleccionado del grupo de los promotores sucedáneos y fragmentos funcionales de los mismos anteriormente caracterizados. Por lo tanto es objeto de la presente invención un casete de expresión de sacarosa mutasa.

En una variante alternativa de este aspecto de la presente invención la molécula polinucleótida según la presente invención, en concreto el casete de expresión, está en forma asilada. Así, por ejemplo, se puede transferir del modo ya sabido a una célula huésped. También se prevé el uso de la molécula polinucleótida de la presente invención, en concreto del casete de expresión, para desarrollar sistemas libres de células y biocatalizadores.

También es objeto de este segundo aspecto de la presente invención un vector, sobre todo un vector de expresión, que contenga al menos una copia de la molécula polinucleótida anteriormente caracterizada, sobre todo del casete de expresión, preferiblemente en forma expresable. El vector de expresión puede infiltrarse preferiblemente en una célula huésped, a fin de expresar el gen de la sacarosa mutasa (*smuA*) preferiblemente de forma episomal. En otra

variante preferida el vector de la presente invención sirve para infiltrar el casete de expresión de la sacarosa mutasa en el genoma cromosómico de la célula huésped.

También es objeto del segundo aspecto de la presente invención un método para preparar una célula recombinante según la presente invención capaz de transformar sacarosa en isomaltulosa o composiciones de isomaltulosa, que consta al menos de las siguientes etapas: en una primera etapa se prepara una cepa de tipo natural de la célula; en una segunda etapa se pone en contacto esta cepa con al menos una de las moléculas polinucleótidas de la presente invención, en concreto con el casete de expresión de la sacarosa mutasa, y/o con al menos uno de los vectores anteriormente caracterizados, en concreto con el vector de expresión de la sacarosa mutasa. Entonces la molécula polinucleótida y/o el vector se integran preferentemente en la célula de forma expresable.

En este contexto también figura el empleo de las moléculas polinucleótidas, de los promotores sucedáneos y sus fragmentos o de los casetes de expresión completos, anteriormente caracterizados, para obtener una célula de la presente invención; por tanto una cepa autoclonada según el primer aspecto de la presente invención y una célula recombinante según el segundo aspecto de la presente invención.

En este contexto también figura el uso del vector anteriormente caracterizado, por tanto un plásmido de intercambio según el primer aspecto de la presente invención y un vector de expresión según el segundo aspecto de la presente invención, para obtener dicha célula.

Por último la presente invención también se refiere a métodos de preparación biotecnológica de isomaltulosa y/o de una composición de isomaltulosa a partir de un substrato de sacarosa o que contiene sacarosa. Según la presente invención el método consta al menos de la siguiente etapa: cultivo de la célula en un medio que contiene el substrato y en unas condiciones que permiten la transformación del substrato en isomaltulosa, preferiblemente mediante el uso de la sacarosa mutasa homóloga (SmuA) propia de la célula. Preferiblemente, en una etapa preferentemente subsiguiente, la isomaltulosa o la composición de isomaltulosa se aísla del medio de cultivo y/o de la célula.

La expresión de la sacarosa mutasa en las células huésped según la presente invención tiene la ventaja de ser independiente o muy independiente de la concentración de sacarosa y la presente invención permite el cultivo de las células huésped de la presente invención, es decir la formación de biomasa en un medio de glucosa (fuente de C).

En el contexto de la presente invención se entiende por "composición de isomaltulosa" el producto de isomerización de la sacarosa, el cual contiene isomaltulosa en proporción muy predominante. Otros componentes son trehalulosa e isomelecitosa. Se entiende sobre todo la siguiente composición: 70 hasta 90% de isomaltulosa, 5 hasta 10% de trehalulosa, 0 hasta 0,5% de isomelecitosa, 0 hasta 0,2% de trisacáridos y 0 hasta 0,2% de sacáridos residuales.

Por consiguiente también es objeto de la presente invención el empleo de una célula según la presente invención, anteriormente definida, para la producción biotecnológica de isomaltulosa o de una composición de isomaltulosa, preferiblemente a partir de sacarosa o de un substrato que contenga sacarosa y según el método aquí descrito.

La presente invención se ilustra más detalladamente mediante las siguientes figuras y ejemplos, sin que éstos deban entenderse como una limitación:

La figura 1 ilustra la organización cromosómica anterior al gen *smuA* con secuencias reguladoras en la 5'-UTR (promotor, operador); SEQ ID N°: 1: en esta región se pudo detectar un "marco de lectura abierto" (ORF) de 234 aminoácidos que muestra homologías significativas con los llamados reguladores de transcripción del tipo GntR; el respectivo gen se designa en lo sucesivo como *gntR*. Entre *gntR* y *smuA* se halla una región intergenética de unos 400 pb que presenta elementos reguladores (promotor, operador) de la expresión de *smuA* (véase también la figura 3A).

La figura 2 muestra ejemplos de tipos de vectores utilizables en la presente invención, el plásmido de "muchas copias" pUCTT-gusA (figura 2A) y el plásmido de "pocas copias" pSCTT-gusA (figura 2B) para la obtención de bancos de genes promotores de *P. rubrum*. Como gen indicador de promotor se usó preferentemente el gen de β-glucuronidasa *gusA*. Con preferencia se usaron las secuencias sucedáneas SEQ ID N°: 2 hasta SEQ ID N°: 11 (tabla 1A) junto con el plásmido de la figura 2A; las secuencias sucedáneas SEQ ID N°: 12 hasta SEQ ID N°: 21 (tabla 1B) junto con el plásmido de la figura 2B.

La figura 3 muestra fragmentos de secuencias de ADN de la región intergenética entre la zona 3' del gen *gntR* recién encontrada que codifica un regulador de transcripción potencial de la familia GntR y la zona 5' del gen de sacarosa mutasa *smuA* de *P. rubrum*. Esta figura también ilustra la estrategia preferida de la presente invención para insertar promotores sucedáneos homólogos sin dejar huella: se selecciona un sitio de corte *MunI* situado naturalmente unos 35 pb antes del gen putativo de *gntR*. Además se usa preferiblemente una secuencia AAAC situada inmediatamente antes del sitio natural de unión del ribosoma (RBS) de *smuA*, que constituye una parte GTTT/AAAC del sitio de unión *PmeI* (figura 3B). Una introducción episomal de un fragmento intermedio en *MunI/PmeI* (figura 3B) permite la inserción dirigida de promotores sucedáneos. La figura 3C muestra el ejemplo de la inserción del promotor *ribB* - aquí también denominado 3C1 - sin dejar huella. En las figuras 3A-C están resaltadas las secuencias importantes.

La figura 4 muestra como ejemplo un mapa vectorial del plásmido de intercambio de promotor pUT-GntR-Pr3C1-SmuA, producido preferentemente según la presente invención, que contiene la secuencia de intercambio según SEQ ID N°: 2.

La figura 5 ilustra esquemáticamente como ejemplo el proceso de preparación de los organismos de la presente invención: intercambio de la región promotora de *smuA* con un promotor homólogo por autoclonación. Basado en un vector preferiblemente no replicativo en la célula huésped de *P. rubrum* (p.ej. el vector de pUT) se construye preferentemente en *E. coli* un plásmido de intercambio de promotor que contiene el promotor sucedáneo. Éste se flanquea sin dejar huella entre un fragmento de ADN de unos 1000 pb de tamaño, que codifica el regulador putativo de *gntR*, y un fragmento de ADN de la región *SmuA*, de unos 1000 pb de tamaño, posterior al regulador putativo de *gntR*, que codifica la zona 5' de *SmuA*. El plásmido producido se transfiere a la célula huésped, aquí *P. rubrum* de tipo natural. Por selección, preferiblemente con kanamicina, se eligen aquellas colonias que llevan plásmidos de intercambio integrados en el cromosoma, preferentemente mediante al menos una de ambas regiones homólogas. La incubación en medio exento de kanamicina permite seleccionar cepas de intercambio de promotores en las cuales el plásmido integrado se desune nuevamente del cromosoma mediante un segundo entrecruzamiento (segundo paso de recombinación). De manera preferente estas colonias pueden detectarse fenotípicamente, como es sabido, por la falta de actividad de *xyIE* tras la adición de catecol (no hay coloración amarilla). La obtención de la cepa de reorganización del promotor puede comprobarse a continuación usando métodos de biología molecular (p.ej. PCR) del modo ya conocido, para poder excluir asimismo la disgregación completa del plásmido de intercambio que conduce a la reconstrucción del tipo natural.

La figura 6 muestra el desarrollo de la transformación del carbohidrato durante 24 horas en organismos según la presente invención (n° 3C1A) y en el tipo natural (WT).

El protocolo de secuencias contiene:

SEQ ID N°: 1: secuencia de ADN antes del gen *smuA*, que contiene el promotor/operador natural de *smuA*, el cual se puede sustituir total o parcialmente por el promotor sucedáneo según la presente invención o por su fragmento funcional;
SEQ ID N°: 2 hasta 21: secuencia de promotores sucedáneos funcionales que pueden regular la expresión del gen *smuA* en la célula en lugar del promotor natural de *smuA*.

Para identificar los promotores fuertes frente al promotor natural de *smuA* tiene lugar preferiblemente según la presente invención un intercambio sin la introducción de nuevas secuencias no homólogas en el organismo. Para ello según la presente invención se procede básicamente del siguiente modo: se crea un plásmido de intercambio de promotores que contiene preferiblemente unas 1000 pb de una región de ADN antes y después del promotor de *smuA*. A continuación tiene lugar un intercambio sin dejar huella entre el promotor natural de *smuA* localizado en el plásmido, cuyo tamaño es de unas 400 pb, y otro promotor homólogo. El intercambio exacto de bases se puede confirmar, por ejemplo, mediante secuenciación de ADN. El plásmido de intercambio de promotores resultante se transfiere al organismo y el plásmido se integra por recombinación homóloga en la unidad cromosómica de *smuA*. El intercambio de promotores tiene lugar preferentemente por eliminación simultánea del plásmido de intercambio, seleccionando específicamente el segundo paso de recombinación.

Si es preciso, el intercambio correcto de promotores sin dejar huella y la ausencia de cualquier secuencia ajena en el organismo se puede verificar del modo conocido por métodos de PCR y/o de secuenciación. Mediante hibridación Southern se pueden obtener más seguridades.

Para el intercambio del promotor natural de *smuA* se selecciona preferentemente la región intergenética entre una zona codificadora de un regulador potencial de la expresión de la sacarosa mutasa y una zona codificadora de la sacarosa mutasa en el cromosoma bacteriano. El fragmento intermedio se elimina con especial preferencia por hidrólisis en las regiones *MunI* y *PmeI*. La inserción selectiva del promotor sucedáneo homólogo preferido según la presente invención tiene lugar en forma de fragmento *MunI* o *EcoRI/PmeI*.

Ejemplo 1: intercambio del promotor de *smuA* por autoclonación en *P. rubrum*

Todas las clonaciones y modificaciones de ADN se efectúan de la manera descrita por Sambrook y otros, 1989 (Molecular cloning: A laboratory manual, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). De no indicarse lo contrario, las preparaciones de PCR, los kits de clonación de ácidos nucleicos, los métodos de detección y selección y los cultivos se llevaron a cabo del modo conocido, siguiendo las instrucciones del correspondiente fabricante.

1.1 Promotores homólogos de *P. rubrum*

El ADN cromosómico del *P. rubrum* de tipo natural se aísla y se digiere parcialmente con *AluI*. Los fragmentos se clonan en los sitios de corte *StuI* de dos vectores: distintos promotor-sonda representados en la figura 2, que se diferencian básicamente por el número de copias: mientras el vector pUCTT-gusA es un derivado de pUC con gran número de copias que lleva el gen de resistencia al cloranfenicol *cat* de pBR328 (DSMZ, Braunschweig), el vector pSCTT-gusA es un vector con poco número de copias que proviene del conocido plásmido pSC101 (DSMZ,

Braunschweig) y lleva el gen de resistencia a la kanamicina *aphII*. Como gen indicador de promotor se emplea en ambos vectores el gen *gusA*, el cual codifica una β -glucuronidasa y se expresa tras la inserción de un fragmento funcional del promotor.

5 Después de añadir el sustrato ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico (X-Gluc) la expresión resultante se puede detectar por coloración azul (procedimiento según Platteeuw C. y otros, 1994, Appl Environ Microbiol. 60: 587–93). Mediante tres terminadores (Ter) se puede inhibir una expresión no deseada del gen indicador por parte de potenciales elementos promotores propios del plásmido. Ambos tipos de vector replican tanto en *E. coli* como en *P. rubrum*.

10 Para comprobar la función promotora de los fragmentos del promotor sucedáneo propios de la célula huésped, el gen cromosómico de β -glucuronidasa *uidA* presente naturalmente en *E. coli* se puede inactivar usando métodos conocidos del especialista, a fin de producir una cepa de ensayo *gusA* de *E. coli* DH10B Δ *uidA* de *E. coli*.

15 La transformación del banco genético de pUCTT-*gusA* o de pSCTT-*gusA* de los promotores sucedáneos en la DH10B Δ *uidA* de *E. coli* produce colonia azules en las cuales el gen indicador *gusA* sin promotor se expresa por medio del fragmento de promotor autoclonado.

20 El análisis de restricción del ADN plásmido aislado de colonia azules demuestra que los fragmentos cromosómicos de *P. rubrum* de distinto tamaño también tienen funciones promotoras.

Con la ayuda de la electroporación (preparación de células electrocompetentes y realización según Dower y otros, 1988, Nucleic Acids Res., 16: 6127–6145) se pueden transferir los clones según *P. rubrum* y se puede confirmar la actividad promotora ya detectada en *E. coli*.

25 1.2 Inserción de promotores sucedáneos sin dejar huella

Los promotores sucedáneos de la presente invención (SEQ ID N°: 2 hasta 21) se intercambian respectivamente con la región del promotor/operador de *smuA* (véase SEQ ID N°: 1 y 3ABC) mediante recombinación homóloga, sin dejar huella.

35 Esta preparación se basa en la integración cromosómica de un plásmido de intercambio de promotores mediante recombinación homóloga. Se prepara un vector base que no replica en *P. rubrum*, al menos condicionalmente. Se usan por ejemplo derivados de pUT basados en un origen de replicación R6K (Herrero y otros, 1990, J. Bacteriol., 172: 6557–67). Estos vectores solo replican en presencia del gen *pir*, que codifica la proteína π esencial para la replicación. Una cepa de este tipo es la *E. coli* S17-1 λ *pir* (Herrero y otros, 1990, J. Bacteriol., 172: 6557–67), que se usa para construir los correspondientes plásmidos de intercambio de promotores.

40 Todos los plásmidos de intercambio de promotores basados en el vector de pUT según la presente invención se construyen de forma que el nuevo promotor sucedáneo intercambiado si dejar huella quede flanqueado arriba por un fragmento de ADN de 925 pb de tamaño, que codifica el regulador del gen *gntR*, y abajo por un fragmento de ADN de 1066 de tamaño, que codifica la región 5' de *smuA*. En la figura 3 está representada con detalle la estrategia de clonación, tomando como ejemplo el fragmento de promotor sucedáneo *ribB* (3C1). En la figura 4 está representado como ejemplo el plásmido final de intercambio de promotores (pUT-GntR-Pr3C1-SmuA⁺), que vehicula el intercambio del fragmento 3C1 con el promotor de *smuA*.

45 1.3 Producción de cepas de reorganización del promotor

Una vez preparados, los plásmidos de intercambio de promotores se transfieren a *P. rubrum*, preferentemente mediante una conjugación intergenética entre *E. coli* S17-1 λ *pir* y *P. rubrum*. Los plásmidos de pUT utilizados llevan un "origen de transferencia" (*oriT*) del plásmido RP4 y pueden moverse hacia *P. rubrum* mediante el plásmido RP4 integrado cromosómicamente en *E. coli* S17-1 λ *pir* (Herrero y otros, 1990, J. Bacteriol., 172: 6557–67).

55 Las condiciones de la conjugación intergenética se optimizaron del modo siguiente: la selección de transconjugados potenciales de *P. rubrum* requiere un marcador seleccionable en *P. rubrum* (p.ej. *aphII*, resistencia a kanamicina) y la posibilidad de inhibir específicamente el donante de *E. coli*. Por aplicación sobre placa de agar con un medio que contiene rifamicina (100 μ g/ml) se generan espontáneamente colonias de *P. rubrum* de tipo natural resistentes a la rifamicina, que por lo demás no se diferencian del tipo natural. La conjugación se lleva cabo de la manera siguiente:

60 Se cultivan por la noche en 5 ml de medio dYT (por litro: 16 g de Bacto triptona, 10 g de extracto de levadura Bacto y 5 g de NaCl) a 37°C, añadiendo kanamicina (50 μ g/ml), cepas donantes de *E. coli* S17-1 λ *pir* que llevan el respectivo plásmido de intercambio de promotores. El recipiente *P. rubrum* también se cultivó por la noche en 5 ml de dYT con adición de rifamicina (100 μ g/ml) a 30°C. En matraces Erlenmeyer con 100 ml de medio dYT (véase composición arriba) se inocularon respectivamente 1 ml de este cultivo nocturno y se incubó a 30°C (*P. rubrum*) o a 37°C (*E. coli*) y 65 250 rpm hasta una DO (600 nm) de 0,4 a 0,8. Donante y recipiente se mezclaron en relación 1:4, se separaron por centrifugación, se lavaron con 1 ml de dYT y por último se recogieron en 100 μ l de medio dYT. La suspensión se

pipetea sobre un filtro de nitrocelulosa (tamaño de poro 0,45 µm) colocado sobre una placa de dYT y se incuba por la noche a 30°C. A continuación las células se separan del filtro con 1 ml de dYT, se diluyen, se aplican sobre placas de selección (dYT + 50 µg/ml de kanamicina y 100 µg/ml de rifamicina) y se incuban por la noche a 30°C.

5 Mediante la selección con kanamicina se obtienen aquellos transconjugados de *P. rubrum* en que los plásmidos están integrados en el cromosoma preferentemente a través de ambas regiones homólogas (figura 5). La incubación en medio exento de kanamicina permite seleccionar cepas de intercambio de promotores en los cuales el plásmido integrado se desune del cromosoma en un segundo paso de recombinación. Para detectar si ha tenido lugar esta separación se puede utilizar un gen marcador cromático *xyIE* presente en los plásmidos. El gen *xyIE* codifica una catecol-2,3-dioxigenasa que transforma el catecol en ácido 2-hidroximucónico-semiladehído, que puede detectarse fenotípicamente por una marcada coloración amarilla. La desunión del plásmido de intercambio de promotores anteriormente integrado es un hecho infrecuente (1 de 1000 colonias) y se puede detectar con la ayuda de este marcador gracias a la coloración amarilla restante en las colonias deseadas tras la adición de catecol (reactivo de pulverización: 0,2 ml de una solución acuosa de 0,5 mol/l). Como la desintegración del plásmido de intercambio de promotores también tendría como consecuencia la reconstitución del tipo natural, todas las cepas de reorganización de promotores resultantes se pueden comprobar y verificar por experimentos de PCR, análisis de Southern-Blot y secuenciación genómica. Los resultados demuestran que las nuevas cepas generadas se han formado mediante intercambio exacto de bases (autoclonación), sin dejar huella, y que no presentan ninguna secuencia ajena.

20 Ejemplo 2: espectro de productos y rendimiento de la síntesis

2.1 Análisis de la composición de hidratos de carbono por HPLC

25 La composición resultante de hidratos de carbono se determina por HPLC con los siguientes componentes: bomba de HPLC, transmisor de muestras, detector de IR (índice de refracción), columna previa: 10 mm x 4,6 mm, fase amínica (p.ej. Zorbax-NH2); columna de separación: 250 mm x 4,6 mm, fase amínica (p.ej. Zorbax-NH2); interfase, ordenador y programa para el registro y valoración de los datos.

30 La medición se realizó en las siguientes condiciones cromatográficas: volumen inyectado 10 µl; caudal: 1,0 hasta 1,8 ml/min. El caudal que debe ajustarse para que la separación sea óptima depende del tipo y estado de la columna de separación y también de la composición del eluyente. En la tabla 2 figuran otros parámetros analíticos.

Tabla 2:

Aparato:	Sistema HP1100 HPLC	
Columna(s):	Zorbax-NH2 de 250 x 4,6 mm, 5 µm, con columna previa de 10 x 4,6 mm	a temp. ambiente
Detector:	Detector de índice de refracción	temperado a 30°C
Eluyente:	Acetonitrilo al 73% (v/v)	flujo: 1.400 ml/min
Volumen inyectado:	10 µl	
Tiempo de análisis:	30 min	
Concentración de la muestra	Solución de muestra al 10%	

35 2.2 Biotransformación celular completa en el matraz agitado

40 Las cepas de la presente invención y las cepas de control del tipo natural se cultivaron en 30 ml de medio LB (DO₆₀₀ inicial de 0,05). Los cultivos se incubaron respectivamente a 30°C y 200 rpm en el agitador horizontal. Tras las primeras 24 horas de fermentación se extraen células 5 x DO, se separan por centrifugación y se lavan con 1 ml de tampón de acetato de Ca (0,01 mol/l, pH 5,5). Los precipitados celulares (correspondientes a células 5 x DO) se resuspendieron respectivamente en 1,25 ml de tampón de acetato de Ca (0,01 mol/l, pH 5,5) con una solución de 0,584 mol/l (200 g/l). Para efectuar la biotransformación las preparaciones se incubaron durante 90 min en placas de pocillos profundos, agitando ligeramente a temperatura ambiente. La reacción se paró por tratamiento térmico (5 min a 98°C).

Tabla 3:

Nombre de la muestra	Fructosa	Glucosa	Sacarosa	Isomaltulosa	Trehalulosa	Isomaltosa	DP-3	Isomelecitosa	Resto
	HPLC-NH2	HPLC-NH2	HPLC-NH2	HPLC-NH2	HPLC-NH2	HPLC-NH2	HPLC-NH2	HPLC-NH2	HPLC-NH2
	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L
3C1A2S	4,7	4,0	63,1	138,4	10,6	0,4	<0,1	0,3	0,1
3C1B2S	4,6	4,0	58,2	134,1	10,2	0,4	<0,1	0,3	<0,1
WT2S	1,6	1,4	166,1	42,6	3,4	<0,1	<0,1	0,1	<0,1
3C1A2G	4,0	3,5	78,2	111,6	8,9	0,1	<0,1	0,1	<0,1
3C1B2G	3,8	3,3	79,0	108,4	8,4	0,2	<0,1	0,1	<0,1
WT2G	0,1	0,1	196,5	2,6	0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
	% normalizado	% normalizado	% normalizado	% normalizado	% normalizado	% normalizado	% normalizado	% normalizado	% normalizado
3C1A2S	2,1	1,8	28,5	62,4	4,8	0,2	<0,1	0,2	<0,1
3C1B2S	2,2	1,9	27,5	63,3	4,8	0,2	<0,1	0,1	<0,1
WT2S	0,8	0,6	77,1	19,8	1,6	<0,1	<0,1	0,1	<0,1
3C1A2G	1,9	1,7	37,9	54,0	4,3	0,1	<0,1	0,1	<0,1
3C1B2G	1,9	1,6	38,9	53,3	4,2	0,1	<0,1	<0,1	<0,1
WT2G	0,1	0,1	98,4	1,3	0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

La tabla 3 muestra los resultados del análisis por HPLC de los sobrenadantes tras la fermentación en cultivo de sacarosa (S) o glucosa (G) de dos cepas de intercambio de promotores producidas individualmente (nº 3C1A y nº 3C1B) en comparación con el tipo natural (WT):

5 La cantidad de isomaltulosa producida en el cultivo de sacarosa (S) por las cepas 3C1 (3C1A2S y 3C1B2S) aumenta por un factor aproximado de 3,2 en comparación con el tipo natural respectivo (WT2S).

10 En el cultivo de glucosa (G) la diferencia es más marcada, pues bajo estas condiciones el SmuA solo se expresa en cantidades mínimas en el tipo natural (WT2G). En comparación con el cultivo de sacarosa las cepas de la presente invención (3C1A2G, 3C1B2G) producen solo un 10% menos de isomaltulosa.

En el transcurso posterior de la fermentación (superior a 24 horas) se alcanza un rendimiento de isomaltulosa del 70 hasta el 90% y ocasionalmente superior al 90%.

15 2.3 Biotransformación celular completa en el fermentador

Se cultivaron en el mismo medio *P. rubrum* Z12 de tipo natural y las cepas de intercambio de *P. rubrum* producidas por autoclonación. El crecimiento del cultivo previo tuvo lugar en el matraz agitado a 30°C en condiciones aeróbicas.

20 Se realizaron fermentaciones comparativas en unos fermentadores de 500 ml (de la firma Sixfors): medio nutriente: peptona de soja: 15,0 g; melaza (80°Bx): 20,0 g; (NH₄)₂HPO₄: 2,0 g; sacarosa: 40,0 g; H₂O hasta 1000 ml, pH 7,2–7,4; parámetros de fermentación: tasa de aireación (inicio de la fermentación): 0,5 VVm; número de revoluciones del agitador: 500 rpm; pO₂: 20%.

25 Los fermentadores se inocularon con 5 ml de un cultivo previo en fase exponencial de crecimiento. La fermentación en los fermentadores de 500 ml tuvo lugar bajo los parámetros arriba indicados durante 15 horas a 30°C. Al final de las fermentaciones se separaron las células por centrifugación a 17.600 × g durante 30 minutos y se desechó el sobrenadante transparente. A continuación se determinó el rendimiento celular (biomasa seca) y su actividad de sacarosa mutasa.

30 La biomasa seca se determinó filtrando 10 ml de suspensión de la fermentación a través de un filtro de 0,45 µm y secando este filtro a 105°C. Se llevaron a cabo respectivamente dos fermentaciones por cepa. El tipo natural produjo tras 15 horas de fermentación una biomasa seca de 85,1 ± 5,6 g/kg y la cepa de intercambio de promotores nº 3C1 tomada como ejemplo dio un rendimiento de 80,9 ± 1,0 g/kg. En base a estos datos no pudo observarse ninguna diferencia significativa en el rendimiento de biomasa.

35 Para determinar la actividad de sacarosa mutasa se suspendió respectivamente 1 g de biomasa húmeda (BFM) del tipo natural y de las cepas autoclonadas según la presente invención en 50 g respectivamente de tampón de acetato de Ca 10 mmol/l que contenía 40% [p/v] de sacarosa. La suspensión celular se incubó durante 24 horas a 25°C bajo agitación y a diferentes intervalos se tomaron muestras que se analizaron por HPLC para determinar la sacarosa residual e isomaltulosa, trehalulosa, glucosa y fructosa.

40 En la figura 6 están representados los datos analíticos de formación de isomaltulosa a partir de una sacarosa al 40% en tampón de acetato de Ca 10 mmol/l a pH 5,5. Las muestras se tomaron a intervalos distintos y se analizaron para determinar la composición de hidratos de carbono. La figura presenta la transposición de una sacarosa del 40% a isomaltulosa mediante la sacarosa mutasa del tipo natural (WT) frente a la cepa de intercambio de promotores nº 3C1A elegida como ejemplo. Tras un tiempo de incubación de 5 horas, con la sacarosa mutasa del tipo natural se pudieron detectar 150 g de isomaltulosa, pero con la cepa de intercambio de promotores nº 3C1A ya se pudieron detectar 320 g de isomaltulosa.

45 Mediante las cinéticas de transposición se pudieron calcular las siguientes actividades específicas: actividad del tipo natural: 1020 ± 17,8 unidades/g de biomasa seca; actividad de las cepas (nº 3C1A y nº 3C1B): 3118 ± 86,2 unidades/g de biomasa seca. La actividad de sacarosa mutasa en las cepas de intercambio de la presente invención aumentó aproximadamente en un factor de 3 frente al tipo natural.

55

REIVINDICACIONES

- 5 1. Célula microbiana con una tasa de síntesis de isomaltulosa como mínimo 2 veces mayor que con el tipo natural, la cual presenta en el genoma un gen *smuA* que codifica una sacarosa mutasa SmuA, de manera que al menos un elemento promotor de *smuA* es reemplazado por al menos otro promotor (promotor sucedáneo) elegido entre:
- 10 a) un promotor endógeno del gen de la 3,4-dihidroxi-2-butanon-4-fosfato sintasa (*ribB*)
 b) un promotor homólogo del promotor endógeno según a) procedente de una cepa donante ajena y
 c) un fragmento funcional del promotor a) o b),
 donde el promotor sucedáneo está caracterizado por un polinucleótido elegido del grupo formado por moléculas polinucleótidas con una secuencia de nucleótidos según SEQ ID N°: 2 hasta SEQ ID N°: 3 y secuencias homólogas de las mismas con al menos un 85% de coincidencia.
- 15 2. Célula según la reivindicación 1 con una actividad volumétrica de sacarosa mutasa SmuA incrementada al menos 2 veces respecto al tipo natural.
- 20 3. Célula según la reivindicación 1 o 2 con expresión de sacarosa mutasa SmuA independiente del sustrato respecto al tipo natural.
4. Célula según una de las reivindicaciones 1 a 3, en la cual el promotor de *smuA* sustituido está localizado en la región intergenética entre *smuA* y un marco abierto de lectura (ORF) situado posteriormente.
- 25 5. Célula según una de las reivindicaciones precedentes que no contiene ni expresa información genética recombinante, genes heterólogos o fragmentos de genes.
- 30 6. Célula según una de las reivindicaciones precedentes, seleccionada del grupo formado por microorganismos de los géneros: *Escherichia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Rauoltella*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Pantoea*, *Leucanea* y *Protaminobacter*.
7. Célula según la reivindicación 6, seleccionada de organismos de la especie *Protaminobacter rubrum*.
- 35 8. Molécula polinucleótida aislada que contiene un elemento regulador de la expresión de la sacarosa mutasa, el cual está seleccionado del grupo de promotores sucedáneos caracterizados en la reivindicación 1, y además comprende un segmento expresable codificador de la sacarosa mutasa que está bajo el control de expresión del elemento regulador.
9. Vector que contiene una o más moléculas polinucleótidas según la reivindicación 8.
- 40 10. Célula que contiene la molécula polinucleótida según la reivindicación 8 o el vector según la reivindicación 9.
11. Método para preparar una célula caracterizada en una de las reivindicaciones 1 a 3, que incluye las etapas siguientes:
- 45 – preparación de una cepa de tipo natural de la célula y
 – puesta en contacto de la cepa con la molécula polinucleótida según la reivindicación 8 y/o con el vector según la reivindicación 9.
- 50 12. Uso de la molécula polinucleótida según la reivindicación 8 para preparar una célula microbiana caracterizada en una de las reivindicaciones 1 a 3.
- 55 13. Método de preparación biotecnológica de isomaltulosa o de una composición de isomaltulosa a partir de un sustrato de sacarosa que incluye la etapa siguiente: cultivo de la célula según una de las reivindicaciones 1 a 7 o 10 o de la célula producible según el procedimiento de la reivindicación 13 en un medio de cultivo que contiene el sustrato, bajo unas condiciones que permiten la transformación del sustrato en isomaltulosa o en una composición de isomaltulosa.
- 60 14. Uso de la célula según una de las reivindicaciones 1 a 7 o 10 para mejorar la producción biotecnológica de isomaltulosa o de una composición de isomaltulosa a partir de un sustrato de sacarosa.

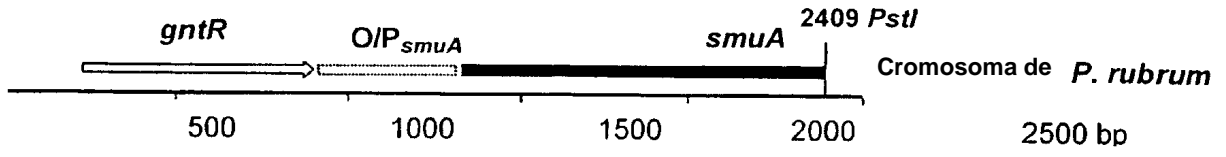


Fig. 1

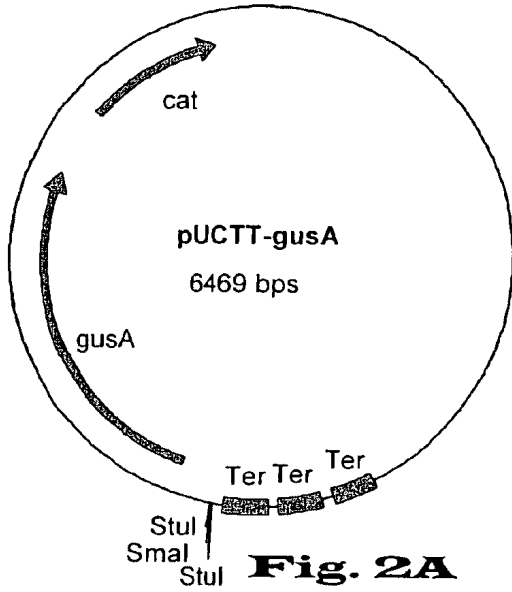


Fig. 2A

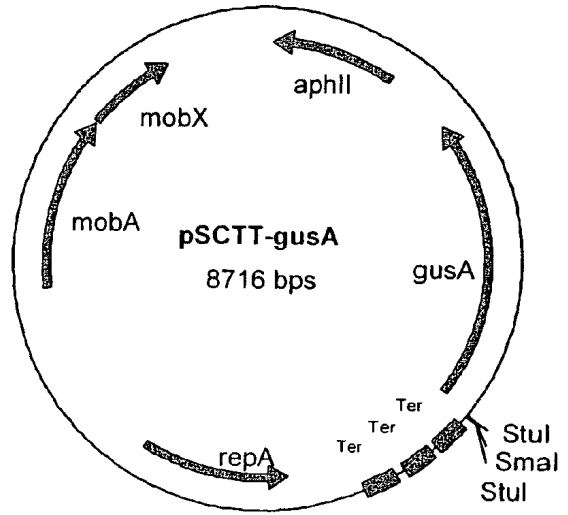


Fig. 2B

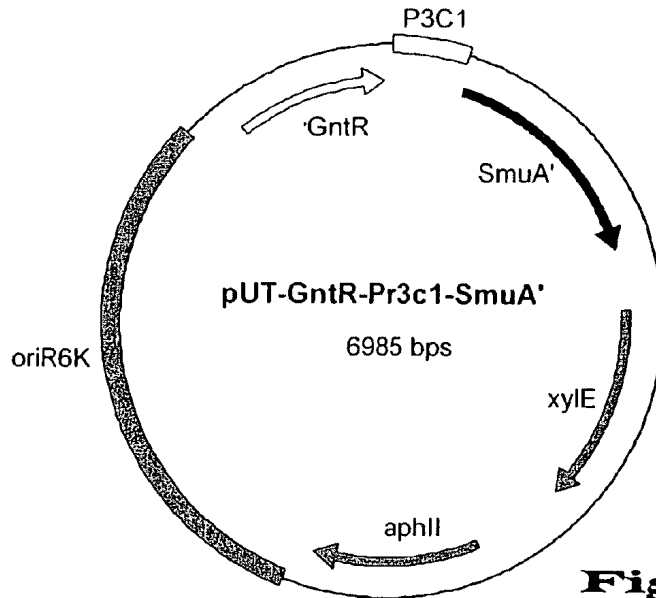


Fig. 4

```

ggccctgaca tgcctttctt acagtgatagc cggcgactat atcaactatt cggctgatatt cagaaatgcc aatgaatacc acgtggacta
cggggactgt agcgaagaagaa taccactatc dcccctcaca tadttdatata dccccctatasa nccccctatasa taccctatgg tgcacctgat
>.....>
i f l c s l s y s d v g d y i n y s v i f t n a n e y h v d

Muni
ccattcgaag aggaataaat agcggggcgaag agggagctac atccctacta tatagcaatt gcaataatc cagctcaat caccacgctg
ggtaaaacttc tcccttactta tgcgccgctt cccctcgcgt taagtgatgat atctcgttaa cgttattaaq ggcagatta gtagtgcac
>.....> | regulador potencial de transcripción de la familia GntR
y h l k r n k -

atcaactgaa tttcccgaag gataactatga aactgctttt ttttatctga aattatagt gttttagagc gttccgagcc cctctgctaa
tagttgcctt aaaggggcgt ccaattgtect ttácaaaaa aceatagcgt tcaattatca ccaaatctcg caagcgtcgg gegaacgatt

cagctttag cagggctatc taasaaacag ctgatttasa acgaatgctc ctcaaaact tctaatgctt tatatttacc ttaccagctc
gtgccaatc gtcccatagc attttttctc gactaaattt tctctacagt gaatttttta cagtctcga aatataatga aatgggtcag
segmento del promotor natural muλ

atctgtctggg aactatattc agaggcttct attagatctt gaaatattt cagctcaatc caactcaat cactcgaatc
taacaagccc tggatattac ttttcgaaqa taactctatga ctttttaatta gtcataattt aattattttaa ttgctaattt ataatttac

tcaagggaaa catgaaata ggtttatttt tggaaataga aacaggagag tattgtaatg ccccgtcag gattcgaaaa tgcactagcg
agccccctt gtaacccaat ccaaatataaa agcttattct tgtccctctc ataacattac ggggcagctc ctactctctg acgtgatcgc
>>.....Su-----sacarosa isomerasa ~ uλ.....>
m p r q g l k t a l a
atttttctaa ccacatcatt atgcatctca tgcagcaag ccttcggtac gcaacaaccc ttgcttaacg aaaaagatct cgaacagctcg
taaaaagatt ggtgtagtaa tacgtagagt acggctcctc ggaagccatg cgttcttggg aacgaatgc ttttctcata gcttctcagc
>.....> | i f l c s l c i s c q q a f g t q q p l l n e k s i e q s
sacarosa isomerasa ~ muλ.....>

```

Fig. 3A

```

catctggagg gttcaaagtt ttcgtatata gaagacgaat gccatatcaa taccgcaggg aattacgaaa gcttcagccc gatcttggca
gtagacctcc caagtttcaa aagcatatat ctctgctta cgttatagtt atagcgtccc ttaatgcttt cgaagtcggg ctagaaccgt
>>..... regulador potencial de transcripción de la familia GntR
h l e g s k f s y i e d e c h i n i a g n y e s f s p i l a
gacagcacga tcggcgcgct actgcacgct gccgaaggca cgcgcctgct gcgcctgaca tcgctttctt acagtgatc cggcgactat
ctgtcgtgct agccgcgcga tgacgtgcaa cggcttcctg gcggcgacga cgcggactgt agcgaagaa tgctactatg gccgctgata
>..... regulador potencial de transcripción de la familia GntR
d s t i g a l l h v a e g t p l l r l t s l s y s d t g d y
atcaactatt cggtgatatt cagaaatgcc aatgaatacc acgtggacta ccatttgaag aggaataaat agcgggcgaa ggggagctac
tagttgataa gccactataa gtctttacgg ttaactatgg tgcacctgat ggtaaacttc tctttattta tcgcccgctt cccctcgatg
>..... regulador potencial de transcripción de la familia GntR
i n y s v i f r n a n e y h v d y h l k r n k -
Munl
atccctacta tatagcaatt gcaatatttc ccagtttaac catcaatgty atcaagcga tttccgcgaa gataacatga aaatglttcaa
taaggatgat atatcgttaa cgttatttaag ggtcagatta gtagtgcaac tagttgcctt aaagggcgtt ctattgtact ttacaaatt
fragmento intermedio
acaggagagt attgtaatgc cccgtcaagg attgaaact gcactagcga ttttttaac cacatcatta tgcattctcat gccagcaagc
tgtcctctca taacattacg gggcagttcc taacttttga cgtgatcgcct aaaaagattg gtgtagtaac acgtagagta cggtcgcttcg
>>..... sacarosa isomerasa SmuA.....>
m p r q g l k t a l a i f l t t s l c i s c q q
cttcggtag caacaacct tgcctaacga aaagagtac gaacagtcga aaaccatacc taaatgggtg
gaagccatgc gttgttggga acgaattgct tttctcatag cttgtcagct ttggtatgg atttaccac
>..... sacarosa isomerasa SmuA.....>
a f g t q q p l l n e k s i e q s k t i p k w w

```

Fig. 3B


```

tccaaagttt tctgtatctag aagacgaatg ccatctcaat atcgagggga atacgaaag ctccagcccg accttggcag acgcaacgat
aagttcaga accatate
>>.....
s k i s y i e d e o h i n i a g n y e s f e s p i l a d s t
regulador potencial de transcripción de la familia GntR
-----
cggcgctta cggcaagctg cggaaaggca ggcgtgctg cggctgcat cggctctctta cagtgatagg ggcgactata tcaactatct
gcccgcgat gacggcgc
>.....
i g a l i h v a e g t p i l e i t s i s d t g d y i n y
regulador potencial de transcripción de la familia GntR
-----
gtgtatctt agaaatgcca atgaaatccc cgtggactac cttttggaga gaaatcaata gctggcgcaag gttgagctaca tccctactat
caactaaag tctttttttt tttttttttt tttttttt caaacctctt cttttttt cttttttt cttttttt cttttttt cttttttt
>.....potentiell regulador potencial de transcripción de la familia GntR e.....>
s v i f r n a n e y h v d y h l k r n k -
acagcaatg tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
taccgttaag acaacggatc acattaccct caacggcccg cctattttgt cctttttgtt cttttttgtcc cctttttttaa caacgaaacag
Mun1
-----
catttggctt gattatcat taggttata gcaatgatct tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt
gtccaaagga ccaactagta atcgcaacat cagtcttacc aataagagtc cggccctacc tccagctgtg tccagctgtg gctgtcaatt agtggaaagat
fragmento promotor ic 3c1
-----
cggcgaatg cggcgaatg cggcgaatg cggcgaatg cggcgaatg cggcgaatg cggcgaatg cggcgaatg cggcgaatg
gacctacct cttctattgc ctatagcggc cggaaacggg gcgaaagcaa taamaaaata tttttttttt tttttttttt tttttttttt
regulador potencial de transcripción de la familia GntR
-----
ggattgaaa ctgcacttagc gattttttta accaatcat tatgatctc atgcccagca gctttcggta cgcacaacacc ctgctttaa
cctaaacttt gacgttgatcg ctaaaaagat tggctgtaga atagcagag tagcgtctgt cggaaagccat gcttctgttg gaacgaatcg
>.....potentiell regulador potencial de transcripción de la familia GntR e.....>
g l k t a l a i f l l a c q q a f g t q q p l i n
regulador potencial de transcripción de la familia GntR
-----
gaaagagta tccaaacgctt gaaacccata cctaaatgct gaaagagagc tttttttttt
cctttttttt agcttctag ctttttggtt ggatttaca cttttttttt acaaaataata
>.....potentiell regulador potencial de transcripción de la familia GntR e.....>
e k a i e l a c a y i f y

```

Fig. 3C

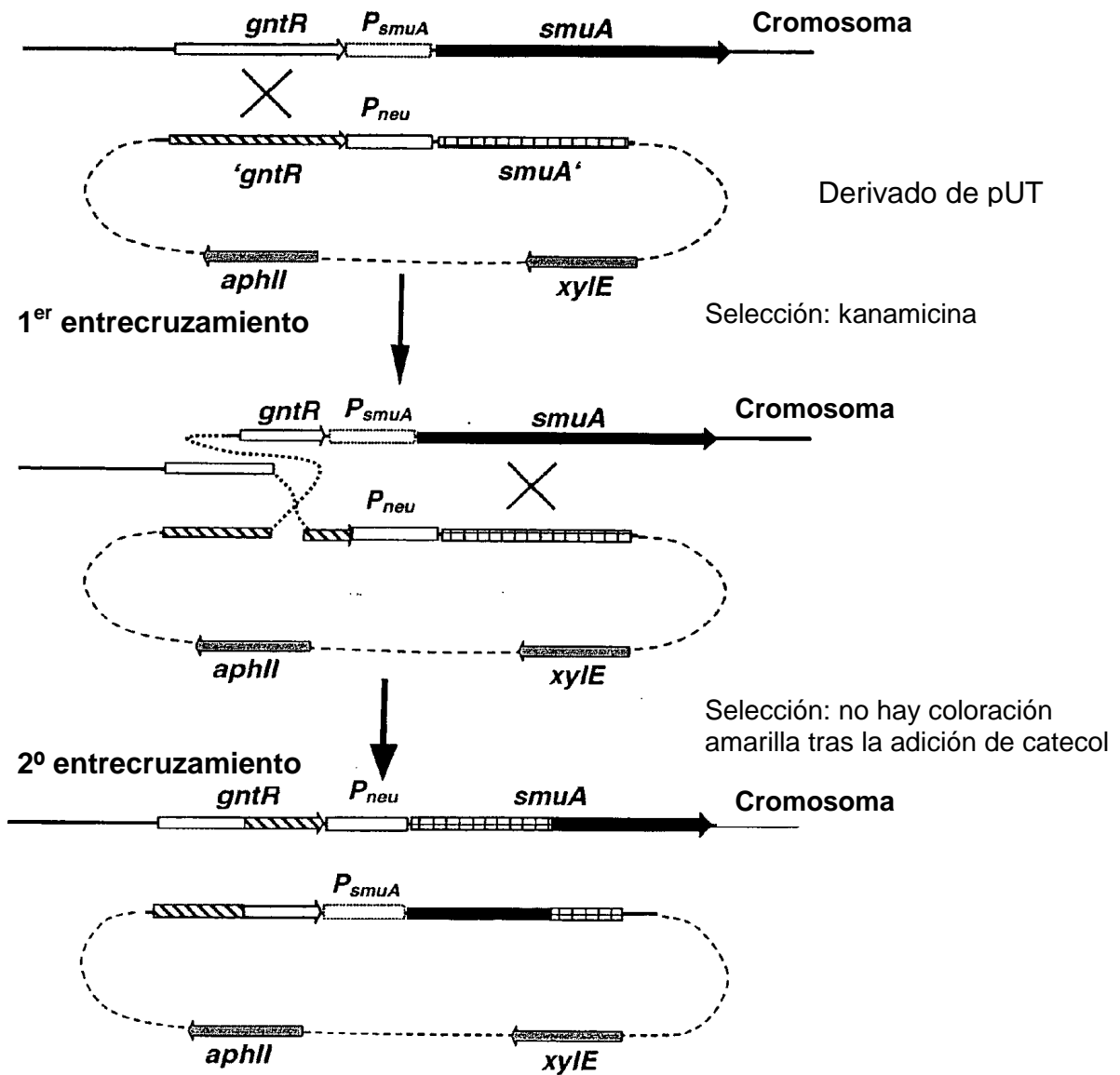


Fig. 5

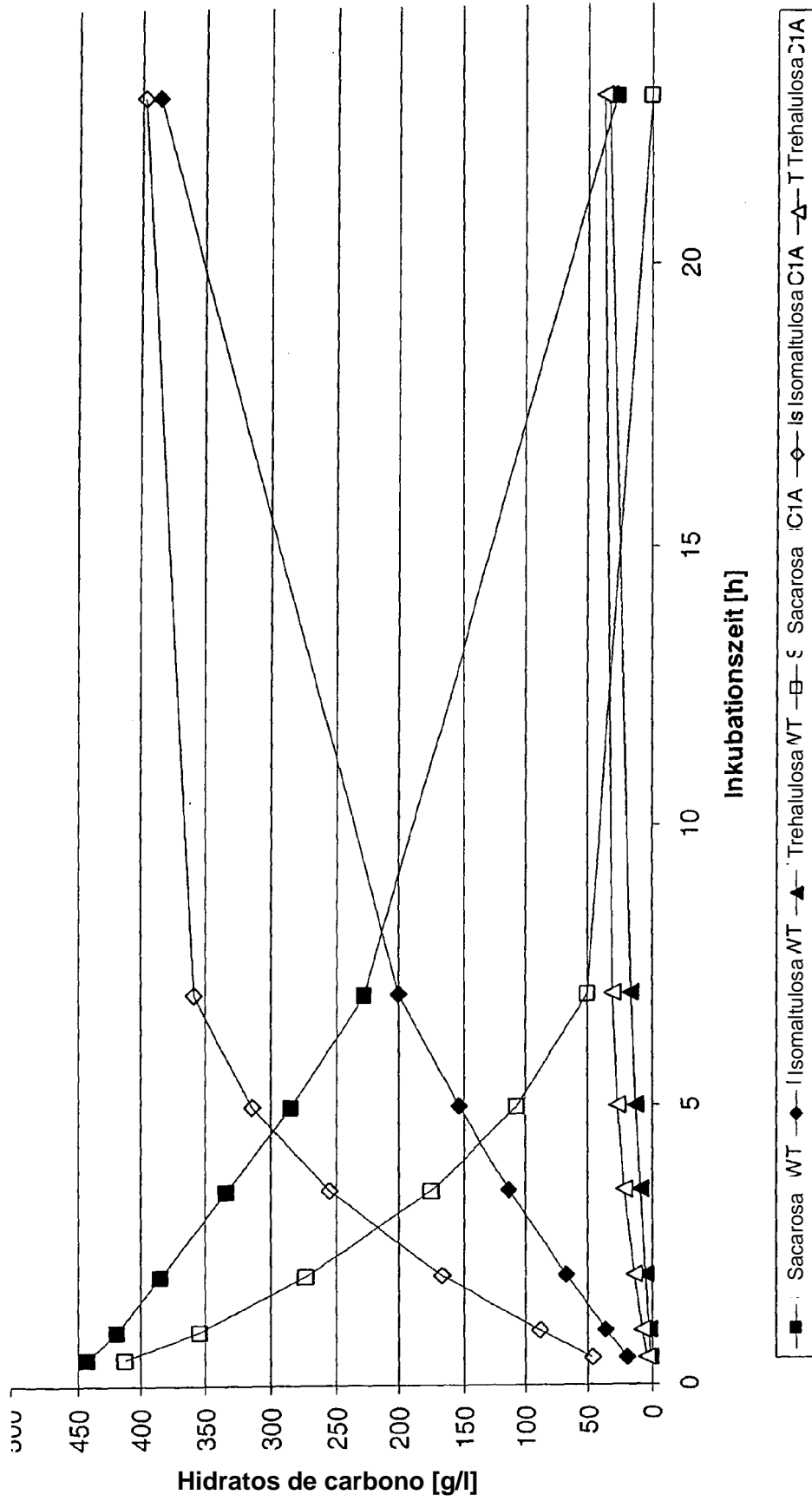


Fig. 6