

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 301**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12P 7/46 (2006.01)

C12P 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.12.2011 PCT/US2011/064598**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2012 WO12082720**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.12.2011 E 11849379 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2652122**

54 Título: **Método de producción de ácido succínico y otros productos químicos utilizando una materia prima que contiene sacarosa**

30 Prioridad:

13.12.2010 US 459446 P

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

17.10.2018

73 Titular/es:

**MYRIANT CORPORATION (100.0%)
66 Cummings Park
Woburn, MA 01801, US**

72 Inventor/es:

**DOLE, SUDHANSHU;
YOCUM, R., ROGERS;
HERMANN, THERON y
YU, XIAOHUI**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 686 301 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

Método de producción de ácido succínico y otros productos químicos utilizando una materia prima que contiene sacarosa

5 La presente invención está en el campo de la producción de productos químicos orgánicos básicos y especializados utilizando biocatalizadores que se han modificado para aumentar su capacidad para utilizar una materia prima que contienen sacarosa. Más específicamente, la presente invención se refiere a bacterias alteradas genéticamente que producen productos químicos orgánicos seleccionados de entre un grupo que consiste en ácido succínico, ácido
10 fumárico, ácido málico, y 1,4-butanodiol, en un medio mínimo comprendiendo dichas bacterias un gen exógeno específico que codifica una sacarosa fosforilasa independiente de PTS, así como a los métodos respectivos de producción fermentativa de un producto químico orgánico seleccionado de entre un grupo que consiste en ácido succínico, ácido fumárico, ácido málico, y 1,4-butanodiol, en un medio mínimo utilizando dichas bacterias.

15 Un gran número de productos químicos orgánicos se derivan actualmente de materias primas petroquímicas. Hay un interés creciente por la producción de muchos de estos compuestos orgánicos derivados de petroquímicos mediante procesos de fermentación biológica utilizando materias primas renovables. La lista de compuestos orgánicos que se pueden derivar de materias primas renovables incluye 1,4-diácidos (succínico, fumárico, málico, glucárico, malónico, y maleico), ácido 2-5-furano dicarboxílico, ácido propiónico, ácido aspártico, ácido glucárico, ácido glutámico, ácido
20 itacónico, ácido levulínico, 3-hidroxi-butanolactona, glicerol, sorbitol, xilitol, arabinitol, y butanodiol tales como 1,4-butanodiol, 1,3-butanodiol, y 2,3-butanodiol. Además de estos compuestos, también se pueden producir muchos otros tipos de compuestos orgánicos que incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos, vitaminas, alcoholes (tales como etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, y alcoholes superiores), ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, hidrocarburos, isoprenoides, terpenos, carotenoides, y aminas utilizando materias primas renovables.
25 Se hace referencia a cualquiera de dichos compuestos en el presente documento como un "compuesto deseado". Sin embargo, para la mayoría de estos compuestos deseados, no se había desarrollado aún un proceso de fermentación comercialmente atractivo que utiliza sacarosa como fuente de carbono.

30 Entre estos compuestos orgánicos que se pueden derivar de materias primas renovables, el ácido succínico merece una especial mención. Se en modificado genéticamente varias especies microbianas incluyendo *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum* y *Brevibacterium flavum*, *Mannheimia succiniproducens*, *Basfia succiniproducens* y *Anaerobiospirillum succiniproducens* para su uso como biocatalizadores en la producción de ácido succínico utilizando materias primas renovables. Estos biocatalizadores en demostrado que producen ácido succínico con muy alto rendimiento y productividad. Actualmente, la producción de ácido succínico utilizando estos biocatalizadores se
35 lleva a cabo utilizando dextrosa como fuente de carbono orgánico.

Existe la necesidad de desarrollar procedimientos que utilicen materias primas renovables más baratas con el fin de hacer que la producción biológica de ácido succínico sea competitiva con la producción de ácido succínico de materias primas petroquímicas utilizando procesos puramente químicos. Están en camino los esfuerzos para utilizar
40 fuentes de carbono derivadas de la hidrólisis de materiales celulósicos como materia prima para la producción de ácido succínico utilizando un biocatalizador. Sin embargo, las técnicas para la producción de materias primas de materiales celulósicos por la fermentación biológica están lejos de perfeccionarse en este momento. Por lo tanto, existe la necesidad inmediata de una materia prima barata adecuada para la producción biológica de ácido succínico. El precio de los distintos azúcares varía con el tiempo y la localización geográfica. En muchas partes del
45 mundo la sacarosa es menos cara que la glucosa la mayor parte o todo el tiempo, especialmente en áreas tropicales en las que medran.

La melaza derivada del procesamiento de la caña de azúcar representa una materia prima barata para cualquier fermentación industrial. La melaza es barata, fácilmente disponible, y abundante. La melaza es rica en sacarosa y
50 existe la necesidad de desarrollar biocatalizadores con la capacidad de utilizar la sacarosa como fuente de carbono en la producción fermentativa de ácido succínico. En algunos casos, será preferible utilizar sacarosa purificada en la fermentación como fuente de carbono, por ejemplo, cuando el producto de fermentación de interés deba estar altamente purificado, y cuando sea más barata que retirar los compuestos no azúcares de la melaza antes de las fermentaciones. La sacarosa purificada en forma de "azúcar de mesa" se ha producido durante muchos años por
55 métodos bien conocidos, y también se puede utilizar un material equivalente a este como fuente de carbono en la presente invención. Además, la utilización de molasa o sacarosa por los biocatalizadores tiene una significación industrial amplia ya que se pueden utilizar la melaza o sacarosa para producir una amplia variedad de productos químicos orgánicos, así como mase celular completa. Por lo tanto, la presente invención tiene una aplicación más amplia en la industria de la fermentación en general detrás de la producción fermentativa de ácido succínico. Un
60 medio que contenga sacarosa puede comprender jugo o melaza derivada de la caña de azúcar, remolacha azucarera, sorgo dulce, o cualquier material vegetal que contenga sacarosa.

Un mecanismo para el transporte de sacarosa y otros azúcares que se encuentra frecuentemente en bacterias se basa en el sistema de fosfotransferasa (PTS=). El PTS está compuesto por dos proteínas de acoplamiento
65 energético, la Enzima I y Hpr, y la Enzima II proteicas específicas de varios azúcares o complejos proteicos, que normalmente consisten en tres dominios proteicos EIIA, EIIB y EIIC. La organización de los dominios EII difieren

entre las bacterias. Ell puede consistir en una única proteína fusionada o diferentes dominios fusionados y no fusionados. La translocación del azúcar específico a través de la membrana se facilita por el dominio integral de membrana. Sin embargo, es el complejo de los tres dominios enzimáticos o proteicos, funcionando juntos, el que lleva al transporte y fosforilación del sustrato de azúcar, dando como resultado en un agrupamiento intracelular de carbohidrato fosforilado (Neidhardt y Curtiss, 1996).

Existen mecanismos alternativos para el transporte bacteriano de sacarosa además del PTS. Estas permeasas de azúcar independientes del PTS facilitan la acumulación de sacarosa sin modificaciones químicas. Incluyen sistemas de simporte de catión de soluto, tal como el simportador ScrT en el operón de sacarosa en *Bifidobacterium lactis* y el transportador CscB de la cepa W de *E. coli*. Estos sistemas de transporte específicos de sacarosa se agrupan generalmente con los genes catabólicos y reguladores con distintas disposiciones en diferentes bacterias.

Existen varios ejemplos en la bibliografía que describen la clonación de los genes de utilización de la sacarosa y la instalación de dichos genes en los organismos que no contienen nativamente dichos genes. Existen ejemplos de clonación y transferencia de los genes de utilización de sacarosa dependientes de PTS e independientes de PTS. Sin embargo, cada uno de estos ejemplos tiene al menos una característica que los hacen indeseables para su uso en un entorno comercial. Por ejemplo, el mantenimiento de los genes de utilización de la sacarosa en plásmidos replicantes (tales como el pScr1 plasmídico descrito en la Publicación de solicitud de patente de EE. UU. N.º 2008/0274526 A1) no es deseable debido a que los plásmidos pueden ser inestables (Shukla et al., 2004) o se pierden durante las muchas generaciones de un cultivo a gran escala, y a menudo necesitan la presencia de antibiótico para el mantenimiento. También la expresión de un gen de un plásmido multicopia puede ser excesivo, dando lugar a la pérdida de energía y materiales, o inhibición del crecimiento.

Los genes cromosómicos de utilización de sacarosa independientes de PTS *cscAKB* de *E. coli* EC3132 se han integrado en el cromosoma de cepas derivadas de *E. coli* K-12 (Patente de EE. UU. 6.960.455). Pero se sabe que este operón en particular es relativamente ineficaz en conferir una utilización de la sacarosa, especialmente a bajas concentraciones de sacarosa, con los que el tiempo de doblaje era de 20 horas (1200 minutos) (Bockmann et al., 1992). Una comparación de homología de la secuencia de ADN de la región del operón *cscRAKB* de EC3132 con la de una *E. coli* ATCC 9637 eficaz utilizador de la sacarosa (Shukla et al., 2004) utilizando el programa Megalign del software de DNASTAR revelaba un índice de similitud de 98,1. Por lo tanto, existen muchas diferencias entre los dos operones *csc*, y estas diferentes están dispersas a lo largo del operón. Muchas de las mutaciones puntuales en el operón de EC3132 producen cambios no conservadores en las secuencias proteicas, y algunas de las mutaciones estaban en regiones promotoras, luego debe ser el caso de que el operón de EC3132 sea simplemente defectuoso debido a una o más de estas mutaciones. Se podrían aislar los mutantes espontáneos de rápido crecimiento con un tiempo de doblaje en sacarosa de bajo a 50 minutos de las EC3132, pero cuando los operones *cscAKB* se instalaban en una cepa K-12, el tiempo de doblaje en medio de sacarosa aumentaba hasta 75 minutos en el mejor de los casos (Jahreis et al., 2002). Ninguno de los operones *csc* mutados de EC3132 cambiaban la secuencia de ADN para que fuera más eficaz como el operón de la ATCC 9637. De por sí, parece que el operón desvelado por Jahreis et al (2002) no es tan deseable como el de la ATCC 9637.

Otra estrategia que se ha propuesto para hacer posible la utilización de la sacarosa es simplemente modificar una cepa para segregar invertasa (Lee et al., 2010 a). En este caso la invertasa de la *Mannheimia succiniproducens* demostró ser superior a la invertasa de *E. coli* W, enseñando que se evite el uso de la invertasa de *E. coli* W. Además, en las bacterias esta estrategia es inherentemente menos eficaz que importar la sacarosa antes de escindir la, ya que después de la escisión en glucosa y fructosa por la invertasa, se deben importar dos moléculas de azúcar más bien que solo una, y esto necesita más gasto de más energía. Además, en este ejemplo de la técnica anterior, durante el inicio de la fermentación con 20 g/l de sacarosa, la fructosa externa se acumulaba a más de 10 l/l, y tardaba 50 horas para que esta fructosa externa se consumiera completamente (Lee et al., 2010 b). Por lo tanto, aunque se desvelaba una cepa que utilizaba la sacarosa, el sistema tenía características de actuación que no eran atractivas comercialmente. La secreción de fructosa por las cepas de *E. coli* cultivadas en sacarosa es un problema general, y la fructosa que permanece al final de un tiempo de fermentación deseable, que es a menudo de 48 horas o menos no es deseable. Por lo tanto, existe la necesidad de microorganismos que puedan fermentar la sacarosa en un producto deseable con un título comercialmente atractivo, que normalmente es más de 20 gramos por litro, sin dejar más de 2 gramos por litro de fructosa remanente después de un tiempo de fermentación de 48 h o menos.

Las cepas SZ63 y SZ85 de *E. coli* se modificaron previamente para producir D-lactato ópticamente puro a partir de azúcares hexosas y pentosas. Para expandir el intervalo de sustrato para incluir la sacarosa, se clonó un operón *cscR'AKB* y se caracterizó a partir de *E. coli* KO11, un derivado de la *E. coli* W (Shukla et al., 2004). El plásmido cargado con el operón resultante se expresó funcionalmente en SZ63, pero era inestable en SZ85.

El documento US 6.960.455 desvela un método de producción de aminoácidos utilizando cepas derivadas de *E. coli* K-12 transducidas con el operón *cscRAKB* de la cepa EC3132 que se localiza en el locus *dsdA* del cromosoma. Como consecuencia de la inserción del operón *cscRAKB* en esta localización del cromosoma, las cepas resultantes no pueden catabolizar la D-serina. Como se ha puntualizado anteriormente, los genes *csc* utilizados en esta técnica anterior se derivaban de un operón EC3132 defectuoso, que crece pobremente a bajas concentraciones de sacarosa (Bockmann et al., 1992; Jahreis et al, 2002). Las cepas resultantes contienen el gen *cscR*, que codifica un

represor, de manera que se espera que las cepas sean subóptimas en la utilización de sacarosa, especialmente en presencia de glucosa, que se esperaría que produce represión de los genes *cscAKB* (Jahreis et al., 2002; Shukla et al., 2004). La melaza normalmente contiene algo de glucosa. No se mencionó ningún intento para corregir cualquiera de los defectos inherentes al operón *csc* de EC3132 en el documento 6.960.455. Además, no se menciona en esta patente la producción de productos químicos distintos de aminoácidos, tales como el succinato.

El documento US 7.179.623 desvela una cepa construida a partir de una cepa no asimilativa de sacarosa en la que dicha cepa alberga genes PTS de sacarosa de *E. coli* VKPM B-7915 (genes *scrKYABR*), pero de nuevo, esta patente no menciona la producción de productos químicos distintos de aminoácidos, y el sistema dependiente de PTS en la presente divulgación no es óptimo para la producción de productos químicos que se derivan del fosfoenolpiruvato (PEP).

En el contexto de lo anterior, el documento WO 2009/078687 A2 describe un microorganismo recombinante capaz de metabolizar sacarosa.

La presente invención se refiere a los siguientes artículos:

1. Una bacteria genéticamente alterada que produce un producto químico orgánico seleccionado de entre un grupo que consiste en ácido succínico, ácido fumárico, ácido málico, y 1,4-butanodiol, en un medio mínimo, comprendiendo dicha bacteria un gen exógeno que codifica sacarosa fosforilasa independiente de PTS derivada de *Bifidobacterium longum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pseudobutyrvibrio ruminis*, o *Bifidobacterium lactis*, donde la bacteria alterada genéticamente se selecciona de entre un grupo que consiste en *Escherichia coli*, *Gluconobacter oxydans*, *Gluconobacter asaii*, *Achromobacter delmarvae*, *Achromobacter viscosus*, *Achromobacter lacticum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Alcaligenes faecalis*, *Arthrobacter citreus*, *Arthrobacter tumescens*, *Arthrobacter paraffineus*, *Arthrobacter hydrocarboglutamicus*, *Arthrobacter oxydans*, *Aureobacterium saperdae*, *Azotobacter indicus*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *divaricatum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium globosum*, *Brevibacterium fuscum*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, *Brevibacterium helcolum*, *Brevibacterium pusillum*, *Brevibacterium testaceum*, *Brevibacterium roseum*, *Brevibacterium immariophilum*, *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium protopharmiae*, *Corynebacterium acetophilum*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium callunae*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Enterobacter aerogenes*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia chrysanthemi*, *Flavobacterium peregrinum*, *Flavobacterium fucatum*, *Flavobacterium aurantium*, *Flavobacterium rhenanum*, *Flavobacterium sewanense*, *Flavobacterium breve*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Micrococcus* sp. CCM825, *Morganella morganii*, *Nocardia opaca*, *Nocardia rugosa*, *Planococcus eucinatus*, *Proteus rettgeri*, *Propionibacterium shermanii*, *Pseudomonas synxantha*, *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas ovalis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas acidovolans*, *Pseudomonas mucidolens*, *Pseudomonas testosteroni*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus rhodochrous*, *Rhodococcus* sp. ATCC 15592, *Rhodococcus* sp. ATCC 19070, *Sporosarcina ureae*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio metschnikovii*, *Vibrio tyrogenes*, *Actinomadura madurae*, *Actinomyces violaceochromogenes*, *Kitasatosporia parulosa*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces flavelus*, *Streptomyces griseolus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces olivaceus*, *Streptomyces tanashiensis*, *Streptomyces virginiae*, *Streptomyces an-tibioticus*, *Streptomyces cacaoui*, *Streptomyces lavendulae*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Aeromonas salmonicida*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus thiaminolyticus*, *Escherichia freundii*, *Microbacterium ammoniaphilum*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella schottmulleri*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Basfia succiniciproducens* y *Xanthomonas citri*.

2. La bacteria genéticamente alterada del artículo 1 que comprende adicionalmente una o más enzimas seleccionadas de entre un grupo que consiste en sacarosa permeasa, glucocinasa, fructocinasa y fosfofructocinasa.

3. La bacteria genéticamente alterada del artículo 1 que comprende adicionalmente una azúcar permeasa independiente de PTS que facilita la acumulación de sacarosa sin una modificación química.

4. La bacteria genéticamente alterada del artículo 1, en el que dicho gen exógeno está contenido en un plásmido replicante.

5. La bacteria genéticamente alterada del artículo 1, en el que dicho gen exógeno está integrado en el cromosoma del huésped.

6. La bacteria genéticamente alterada del artículo 1, en el que la bacteria es una cepa bacteriana PTS⁺.

7. La bacteria genéticamente alterada del artículo 1, en el que la bacteria tiene un nivel reducido de actividad de PTS en comparación con una cepa de tipo silvestre relacionada.

8. La bacteria genéticamente alterada del artículo 1, en el que la bacteria es una cepa bacteriana PTS⁻.

9. Un método para la producción fermentativa de un producto químico orgánico seleccionado de entre un grupo que consiste en ácido succínico, ácido fumárico, ácido málico, y 1,4-butanodiol, en un medio mínimo que comprende:

- (a) la provisión de un microorganismo que expresa un gen de sacarosa fosforilasa independiente de PTS derivado de *Bifidobacterium longum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pseudobutyrylvibrio ruminis*, o *Bifidobacterium lactis*, en el que el microorganismo se selecciona de entre un grupo que consiste en *Escherichia coli*, *Gluconobacter oxydans*, *Gluconobacter asaii*, *Achromobacter delmarvae*, *Achromobacter viscosus*, *Achromobacter lacticum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Alcaligenes faecalis*, *Arthrobacter citreus*, *Arthrobacter tumescens*, *Arthrobacter paraffineus*, *Arthrobacter hydrocarboglutamicus*, *Arthrobacter oxydans*, *Aureobacterium saperdae*, *Azotobacter indicus*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *divaricatum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium globosum*, *Brevibacterium fuscum*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, *Brevibacterium helcolum*, *Brevibacterium pusillum*, *Brevibacterium testaceum*, *Brevibacterium roseum*, *Brevibacterium immariophilum*, *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium protopharmiae*, *Corynebacterium acetophilum*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium callunae*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Enterobacter aerogenes*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia chrysanthemi*, *Flavobacterium peregrinum*, *Flavobacterium fucatum*, *Flavobacterium aurantium*, *Flavobacterium rhenanum*, *Flavobacterium sewanense*, *Flavobacterium breve*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Micrococcus* sp. CCM825, *Morganella morganii*, *Nocardia opaca*, *Nocardia rugosa*, *Planococcus eucinatus*, *Proteus rettgeri*, *Propionibacterium shermanii*, *Pseudomonas synxantha*, *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas ovalis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas acidovolans*, *Pseudomonas mucidolens*, *Pseudomonas testosteroni*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus rhodochrous*, *Rhodococcus* sp. ATCC 15592, *Rhodococcus* sp. ATCC 19070, *Sporosarcina ureae*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio metschnikovii*, *Vibrio tyrogenes*, *Actinomadura madurae*, *Actinomyces violaceochromogenes*, *Kitasatosporia parulosa*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces flavelus*, *Streptomyces griseolus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces olivaceus*, *Streptomyces tanashiensis*, *Streptomyces virginiae*, *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces cacaoi*, *Streptomyces lavendulae*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Aeromonas salmonicida*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus thiaminolyticus*, *Escherichia freundii*, *Microbacterium ammoniaphilum*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella schottmulleri*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Basfia succiniciproducens* y *Xanthomonas citri*;
- b) el cultivo del microorganismo de la etapa (a) en un medio que contiene sacarosa, de manera que el microorganismo utiliza sacarosa para producir dicho producto químico orgánico; y
- c) opcionalmente la recuperación de dicho producto orgánico a partir del caldo de fermentación.

10. El método de producción fermentativa de un producto químico orgánico seleccionado de entre un grupo que consiste en ácido succínico, ácido fumárico, ácido málico, y 1,4-butanodiol del artículo 9, en el que dicho microorganismo es un organismo PTS⁻.

11. El método de la producción fermentativa de un producto químico orgánico seleccionado de entre un grupo que consiste en ácido succínico, ácido fumárico, ácido málico, y 1,4-butanodiol del artículo 9, en el que dicho microorganismo es un organismo PTS⁺.

Se describen en el presente documento biocatalizadores y un método para utilizar una materia prima biológica renovable que contiene sacarosa en la producción fermentativa de productos comercialmente importantes, por ejemplo, pero no limitado a productos químicos básicos y especializados. Específicamente, la presente invención es útil en la producción fermentativa de ácidos orgánicos utilizando materias primas renovables que contienen sacarosa. Más específicamente, la presente invención es útil en la producción fermentativa de ácido succínico de una materia prima renovable que contiene sacarosa utilizando biocatalizadores que se han construido para que tengan una utilización mejorada de sacarosa. Los principios de la presente divulgación se pueden aplicar a muchos otros compuestos químicos deseados que se puedan producir por fermentación, particularmente ácido fumárico y ácido málico.

Como se describe en el presente documento, los genes que codifican las proteínas implicadas en el transporte y metabolismo de la sacarosa se pueden introducir en una amplia variedad de biocatalizadores que confieren una nueva capacidad al biocatalizador para utilizar la sacarosa como fuente de carbono y energía en el medio de fermentación, o para aumentar o mejorar una capacidad que ya existe del biocatalizador para el transporte y metabolismo de sacarosa.

En una realización, la presente divulgación mejora la capacidad para importar y metabolizar sacarosa por un biocatalizador que se ha construido previamente para producir un producto químico tal como el ácido succínico en cantidades comercialmente significativas, en el que dicho biocatalizador no tenía originalmente la capacidad para utilizar eficazmente sacarosa como fuente de carbono orgánico para la producción fermentativa de un producto

químico de interés comercial tal como el ácido succínico. En un aspecto descrito en el presente documento, la incapacidad o poca capacidad del biocatalizador original para utilizar la sacarosa radica en la ausencia de genes que codifican el transporte y metabolismo de sacarosa. En otro aspecto, la incapacidad del biocatalizador para utilizar sacarosa es resultado de la consecuencia no intencionada de modificaciones genéticas con el fin de mejorar el rendimiento y productividad de ácido succínico en el medio de fermentación en el que la mayoría de las fuentes de carbono orgánico es distinta de sacarosa. En otro aspecto, la incapacidad del biocatalizador para utilizar la sacarosa resulta de uno o más defectos en el sistema de utilización de sacarosa nativa que hace al sistema incapaz de conseguir una utilización comercialmente atractiva de sacarosa para la fermentación utilizando un medio que contiene sacarosa. Se describe en el presente documento soluciones genéticas para superar cualquiera de estos aspectos de deficiencia genética en la utilización de sacarosa.

En otra realización, la presente divulgación tiene como objetivo aumentar la capacidad de utilización de la sacarosa de los biocatalizadores utilizados en la producción de ácido succínico. La presente invención aumenta la utilización de la sacarosa mediante la mejora de la capacidad del transporte y metabolismo de sacarosa por medio de modificaciones genéticas. En un aspecto descrito en el presente documento, la capacidad de transporte de sacarosa ya existente del biocatalizador se mejora mediante la introducción de genes que codifican las proteínas implicadas en un mecanismo de captación de sacarosa dependiente de PTS. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona genes adicionales que codifican las proteínas asociadas con un sistema de sacarosa permeasa independiente de PTS tal como el sistema de sacarosa permeasa de simporte de cationes para aumentar la capacidad de transporte de sacarosa ya existente del biocatalizador. En otro aspecto más, la presente divulgación aumenta la utilización de sacarosa mediante la provisión de genes que codifican el metabolismo de la sacarosa transportada en la célula.

En otro aspecto, se describe en el presente documento un procedimiento para la producción de ácido succínico en un medio que contiene sacarosa el cual utiliza un biocatalizador que ha mantenido un sistema funcional de fosfotransferasa dependiente de PEP para la captación de azúcares.

La utilización de sacarosa en la producción de ácido succínico por el biocatalizador implica la participación de varias proteínas responsables de la conversión de sacarosa en tres productos de carbono intermedios que puedan entrar en el ciclo del ácido tricarbóxico y en último término dar como resultado ácido succínico. En un aspecto, la presente divulgación aumenta genéticamente la actividad de una o más enzimas implicadas en la conversión de sacarosa en seis productos de carbono intermedios que puedan metabolizarse adicionalmente por las rutas bioquímicas normales. Además de los transportadores de sacarosa, las dianas enzimáticas adecuadas para la modificación genética se seleccionan de entre una lista que consiste en sacarosa fosforilasa, sacarosa hidrolasa (invertasa), sacarosa-6-fosfato hidrolasa, glucosa cinasa (glucocinasa), y fructosa cinasa (fructocinasa).

En otra realización, se describe en el presente documento un procedimiento para la producción de ácido succínico utilizando sacarosa como materia prima renovable. En un aspecto, se describe en el presente documento un procedimiento para la producción de ácido succínico en un medio que contiene sacarosa que utiliza un biocatalizador que tiene una disminución de la actividad del sistema de fosfotransferasa dependiente de PEP.

En un aspecto, se describe en el presente documento la adición de genes a un organismo de manera que se instala o aumenta la actividad de una o más proteínas y/o enzimas implicadas en la importación y conversión de sacarosa en productos metabólicos intermedios tales como fructosa 1,6-bifosfato y que se puedan metabolizar después por la célula. Los genes que codifican proteínas o enzimas relevantes adecuadas para la modificación genética en el presente documento son uno, o una combinación de más de un gen seleccionado de entre una lista que consiste en los genes que codifican un importador de sacarosa dependiente de PTS (una proteína PTS habitualmente llamada Enzima II^{scr}, o EII^{scr}, que funciona junto con otras proteínas PTS para conseguir la importación y fosforilación de la sacarosa para dar lugar a sacarosa-6-fosfato en el citoplasma), sacarosa-6-fosfato hidrolasa, sacarosa permeasa (una permeasa independiente de PTS que transporta la sacarosa en la célula sin fosforilación concomitante), invertasa o sacarosa hidrolasa, sacarosa fosforilasa, glucosa cinasa (glucocinasa), fructosa cinasa (fructocinasa), hexosa-fosfato isomerasa, y fosfofructocinasa (fructosa-1-fosfato cinasa).

En otra realización, se describe en el presente documento un procedimiento para la producción de ácido succínico u otros productos químicos utilizando sacarosa como materia prima renovable. En un aspecto, se describe en el presente documento un proceso de producción de ácido succínico en un medio que contiene sacarosa que utiliza un biocatalizador que tiene una disminución de la actividad de al menos una proteína del sistema PTS nativo del organismo con respecto al de la cepa parental o ancestral. En un aspecto, se describe en el presente documento un proceso para la producción de ácido succínico u otros productos químicos en un medio que contiene sacarosa que utiliza un biocatalizador que mantiene un sistema de fosfotransferasa dependiente de PTS completamente funcional para la captación de un azúcar.

Los nuevos aspectos de la presente divulgación son que los genes *cscABK* de un utilizador de sacarosa robusto no patógeno se han integrado en el cromosoma de una bacteria, de manera que la nueva bacteria construida pueda producir un producto comercial en un procedimiento viable comercialmente. El título del producto de la sacarosa es igual a al menos el título producido por el organismo parental a partir de la glucosa, y el rendimiento del producto es

mayor a 0,8 g/g de azúcar. El operón *cscABK* se integra en un sitio del cromosoma que no interfiera con ningún aspecto relevante en el crecimiento o producción de los productos deseados.

Las ventajas adicionales de la presente invención se volverán fácilmente evidentes de la descripción siguiente.

5

Las figuras muestran:

FIG. 1. Cinética de la utilización de sacarosa y producción de ácido succínico por la cepa SD14 de *E. coli* cultivada en un medio mínimo suplementado con un 10 % de sacarosa (p/p). Para las Figuras 1-5, las fermentaciones se hicieron en pequeños fermentadores microaeróbicos como se describe en Jantama et al. (2008 a), excepto que los volúmenes eran de 300 ml y la neutralización se conseguía con una solución que contenía 2,4 M de carbonato potásico y 1,2 M de hidróxido potásico.

10

FIG. 2. Cinética de la utilización de sacarosa en tres experimentos diferentes con la variación de concentración de las concentraciones de sacarosa. Se utilizaron concentraciones iniciales de sacarosa de 100 g/l, 150 g/l y 200 g/l. Se utilizó la cepa SD14 de *E. coli* en estos experimentos.

15

FIG. 3. Cinética del cambio de la concentración de glucosa en el medio de cultivo durante la producción fermentativa de ácido succínico. El medio de fermentación contenía sacarosa como fuente de carbono orgánico. Se utilizaron concentraciones iniciales de sacarosa de 100 g/l, 150 g/l y 200 g/l. Se utilizó la cepa SD14 de *E. coli* en estos experimentos.

20

FIG. 4. Cinética del cambio de la concentración de fructosa en el medio de cultivo durante la producción fermentativa de ácido succínico. El medio de fermentación contenía sacarosa como fuente de carbono orgánico. Se utilizaron concentraciones iniciales de sacarosa de 100 g/l, 150 g/l y 200 g/l. Se utilizó la cepa SD14 de *E. coli* en estos experimentos.

25

FIG. 5. Cinética de acumulación en el medio de cultivo. Se utilizaron concentraciones iniciales de sacarosa de 100 g/l, 150 g/l y 200 g/l. Se utilizó la cepa SD14 de *E. coli* en estos experimentos.

30

FIG. 6. Cinética de acumulación de ácido succínico durante el cultivo fermentativo de la cepa SD14 de *E. coli* en un biorreactor New Brunswick de 7.000 ml con un volumen de partida de 3.000 ml y microaireación a una velocidad de 0,005 litros de aire por minuto.

Se describe en el presente documento biocatalizadores para la producción de ácido succínico con alto título, rendimiento y productividad utilizando una materia prima que contiene sacarosa. La sacarosa es un disacárido también conocido como sacarosa, 1-O- α -D-glucopiranosil- β -D-fructofuranósido, y α -D-glucopiranosil-1,2- β -D-fructofuranósido. El término "rendimiento" como se define en el presente documento se refiere a una cantidad de gramos de producto (tal como ácido succínico) producido por gramo de azúcar (tal como glucosa o sacarosa) consumido. El término "productividad" como se define en el presente documento se refiere a la cantidad de gramos de producto (tal como ácido succínico) producido por litro de cultivo por hora. El término "título" se define como la concentración de producto (tal como el ácido succínico) en el caldo de fermentación en gramos por litro. El rendimiento deseable para el ácido succínico está en el intervalo de 0,7 – 1,2 gramos de ácido succínico producido por gramo de azúcar consumido. La productividad del ácido succínico está en el intervalo de 1 gramo o más de ácido succínico producido por litro por hora.

35

40

45

Para cualquier compuesto determinado, puede ser más apropiado producir una sal de dicho compuesto, como, por ejemplo, el ácido succínico se puede producir a un pH cercano a 7 como una sal de sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, etc., mientras que la lisina se puede producir como una sal cloruro, sulfato, bicarbonato, etc. De por sí, en cualquier momento que un compuesto se nombra en el presente documento, significa que está incluida cualquier sal de dicho compuesto, y en cualquier momento que se nombra una sal, significa que el ácido libre o base libre también están incluidos.

50

La velocidad de crecimiento bacteriano se mide en términos de aumento de la tasa de densidad óptica a 550 o 660 nanómetros del líquido de cultivo resultante de la multiplicación bacteriana. La velocidad de crecimiento bacteriano se expresa también en términos de tiempo necesario para doblar las células bacterianas. Las células bacterianas de *E. coli* de tipo silvestre se ha informado que se replican una vez cada 20 minutos. En las células bacterianas adecuadas para la presente investigación se espera que las células bacterianas tengan un tiempo de doblaje de al menos 20 minutos, pero menos de 20 horas.

55

60

De acuerdo con la presente divulgación, el biocatalizador para la producción de ácido succínico se puede desarrollar de dos maneras diferentes. En la primera estrategia, las especies bacterianas de tipo silvestre seleccionadas se modifican genéticamente para que crezcan con sacarosa como la única fuente de carbono. Es preferible que la cepa bacteriana modificada genéticamente, aunque adquiera la capacidad de crecer bien en un medio que contiene sacarosa como única fuente de carbono, siga manteniendo la capacidad de utilizar otras fuentes de carbono igualmente bien. Una vez que se identifica una cepa microbiana particular con la capacidad de crecer en sacarosa

65

como única fuente de carbono, se llevan a cabo modificaciones genéticas posteriores en las rutas metabólicas siguiendo los métodos de modificación genética conocidos en la técnica para obtener una cepa bacteriana que pueda crecer en medio que contiene sacarosa y produzcan ácido succínico con alto rendimiento y productividad. Por ejemplo, las solicitudes de patente publicadas bajo el Tratado de Cooperación de patentes con el N.º de publicación 5 WO 2010/115067 y la Publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º US 20100184171 proporcionan los detalles sobre las técnicas de modificación genética útiles en la generación de una cepa de *E. coli* con una capacidad mejorada de producción de ácido succínico.

En la segunda estrategia, se utiliza como cepa parental una cepa bacteriana que ya se ha desarrollado para que 10 tenga un rendimiento y productividad comercialmente atractivos de producción de ácido succínico como se describen en las publicaciones de solicitud de patente US 20100184171 y WO 2010/115067. Se llevan a cabo modificaciones genéticas adicionales con esta cepa para obtener una cepa bacteriana que tenga la capacidad para crecer en un medio que contenga sacarosa y produzca ácido succínico con un título, rendimiento y productividad 15 comercialmente atractivos.

Más específicamente, la presente divulgación se enfoca en el desarrollo de un biocatalizador que mantenga su capacidad original para producir ácido succínico con un título y productividad suficientes mientras que gana la nueva capacidad para crecer en un medio que contenga sacarosa como la fuente de carbono principal. Por ejemplo, la cepa KJ122 de *E. coli* descrita por Jantama et al. (2008 a, b) se puede seleccionar como cepa de partida. Se ha informado que la cepa KJ122 de *E. coli* tiene la capacidad para producir ácido succínico en un medio mínimo de 20 glucosa con un título y productividad altos. La expresión "medio mínimo" significaría un medio que contiene solo sales minerales, una fuente de carbono purificada (tal como glucosa o sacarosa) y betaína. Un "medio mínimo" no contiene cualquier componente rico o no definido químicamente tales como péptidos o nucleótidos, tales como los que se encuentran en el extracto de levadura, triptona, peptona, líquido de maceración de maíz, u otros hidrolizados o materiales biológicos complejos. Un medio mínimo puede estar en forma líquida o sólida, como en placas de agar. 25 Un medio mínimo puede tener uno o más compuestos purificados, tal como vitaminas o aminoácidos, que se añaden para satisfacer una necesidad de crecimiento específica de una cepa en particular. La cepa KJ122 de *E. coli* se derivaba de la cepa C de *E. coli* mediante eliminaciones genéticas y evolución metabólica como se describe en la Publicación de solicitud de patente de EE. UU. N.º US 20100184171 y la solicitud de patente publicada el 7 de octubre y 2 de abril de 2010 bajo el tratado de cooperación de patentes con el N.º de publicación WO 2010/115067 30 A1. Estos dos documentos de publicación de solicitud de patente proporcionan los detalles sobre los cambios genéticos que dan lugar al desarrollo de la cepa KJ122 de *E. coli*. La KJ122 no tiene una capacidad sustancial para utilizar sacarosa como fuente de carbono en la producción de ácido succínico. Esta deficiencia en la utilización de sacarosa apuntada en la KJ122 se atribuye a la deficiencia genética en la cepa parental, a saber, la cepa C de *E. coli*, que se sabe que es deficiente genéticamente en la utilización de sacarosa. 35

La expresión "utilización de sacarosa", como se utiliza en la presente solicitud incluye tanto el transporte de sacarosa desde el medio de cultivo a las células bacterianas como el metabolismo posterior de la sacarosa en la célula. La incapacidad sustancial de KJ122 para transportar y metabolizar sacarosa radica en la falta de genes que codifican 40 tanto el transporte como el metabolismo de sacarosa. Los inventores han descubierto estrategias genéticas que harían posible que la KJ122 utilice la sacarosa como fuente de carbohidratos mientras que mantiene su capacidad original para producir ácido succínico con título, rendimiento, y productividad altos.

El término "carbohidrato" como se utiliza en el presente documento incluye monosacáridos tales como glucosa, fructosa, xilosa, y arabinosa, disacáridos tales como sacarosa, melibiosa, maltosa y lactosa, trisacáridos tales como rafinosa, y maltotriosa, y oligosacáridos superiores, e hidrolizados derivados de la digestión enzimática o química de polisacáridos tales como el almidón, celulosa y hemicelulosa. 45

El transporte de sacarosa en las células bacterianas, y el metabolismo posterior de la sacarosa, puede medirse por al menos cuatro mecanismos diferentes, incluyendo el sistema de fosfotransferasa (PTS) dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP), y tres sistemas independientes del PTS, incluyendo un sistema de sacarosa permeasa de simporte de cationes. Como se ha descrito en el presente documento, es posible alterar cualquiera de estos sistemas de transporte y utilización de sacarosa con el objetivo de conferir una nueva capacidad para utilizar la 50 sacarosa o para aumentar la capacidad ya existente de utilización de sacarosa. La expresión "función de utilización de sacarosa" como se utiliza en el presente documento se refiere tanto a la función de captación de sacarosa como al metabolismo de sacarosa en la célula. El metabolismo de sacarosa en la célula implica la conversión de sacarosa en compuestos de tres carbonos que puedan entrar en la síntesis de compuestos orgánicos comercialmente importantes. 55

Las expresiones "organismo PTS⁺" o "bacteria PTS⁺" se refiere a una bacteria que tiene la capacidad para el transporte de sacarosa basándose en un PTS. La expresión "organismo no PTS" o "bacteria no PTS" se refiere a células bacterianas cuya capacidad de captación de sacarosa se basa en mecanismos de transporte distintos del PTS. De manera similar, la expresión "transporte de sacarosa no PTS" se refiere al transporte de sacarosa a través de la membrana bacteriana utilizando un mecanismo diferente del PTS dependiente de PEP. La expresión 60 "organismo PTS" significa un organismo que tiene una mutación en uno o más genes que codifican una proteína que funciona en el PTS, de manera que la actividad del PTS disminuye con respecto al del PTS de tipo silvestre. La 65

expresión “sacarosa permeasa” como se utiliza en el presente documento incluye las proteínas implicadas en la captación de sacarosa desde el medio a la célula. Las proteínas implicadas en la captación de sacarosa puede ser un componente del TPS o una proteína no asociada al PTS.

5 Un tipo de sistema comienza importando la sacarosa en la célula mediante un sistema de fosfotransferasa (PTS) que utiliza el fosfoenolpiruvato (PEP) como fuente de energía y fosfato, y que fosforila la sacarosa en el proceso de transporte. Los inventores llamarán a este tipo de sistema de importación y metabolismo de sacarosa un sistema o mecanismo “dependiente de PTS” En este primer tipo de sistema, existe un componente proteico que tiene una afinidad útil o específico por la sacarosa. Esta proteína se llama, entre otros nombres, Enzima II^{scr}. La enzima II^{scr}
10 funciona junto con otras dos proteínas que no son específicas para la sacarosa, llamadas subunidades del PTS comunes. Estas dichas otras proteínas (proteínas comunes a más de un PTS específico de un organismo en particular) incluye proteínas que se llaman, entre otros nombres, El y Hpr. En *Escherichia coli* (*E. coli*), los genes que codifican en estos componentes proteicos generales se llaman, entre otros nombres *ptsH* y *ptsI*. La mayoría de las bacterias tienen varias proteínas del PTS que son diferentes de la Enzima II^{scr}, que no son específicas para la
15 sacarosa, pero que son específicas para otros azúcares (tales como glucosa, manosa, etc.), y que pueden funcionar junto con las subunidades de PTS comunes en la importación de dichos otros azúcares. Los genes y proteínas que constituyen un PTS se encuentran en una amplia variedad de géneros y especies bacterianos. Muchos de dichos genes y proteínas son homólogos a los que se encuentran en *E. coli*, pero algunos no son muy homólogos, si los son, a sus equivalentes de *E. coli*. Un ejemplo de este primer tipo de sistema de transporte de sacarosa
20 (dependiente de PTS) es el sistema codificado por los genes *scrKYABR* de, por ejemplo, bacterias del género *Klebsiella* y el plásmido Gram-negativo pUR400 (Reid y Abratt, 2005). En estos operones, *scrK* codifica una fructocinasa, *scrY* codifica una porina de membrana externa específica de sacarosa, *scrA* codifica una proteína de transporte Enzima II^{scr} del PTS, *scrB* codifica un sacarosa-6-fosfato hidrolasa, y *scrR* codifica un represor.

25 Un segundo tipo de sistema de transporte de sacarosa no utiliza directamente el PEP como fuente de energía o donante de fosfato, si no que utiliza el simporte de protones (u otros cationes) como fuente de energía para llevar la sacarosa dentro de la célula sin fosforilación concomitante. Los inventores llamarán a este tipo de sistema de transporte y metabolismo de sacarosa un sistema “independiente de PTS”. Un ejemplo de este segundo tipo es el sistema codificado por los genes cromosómicos *cscRAKB* presentes en algunas, pero no todas, las cepas de *E. coli*
30 cerca del locus *dsdA* (de la D-serina desaminasa). Ejemplos de cepas de *E. coli* que contienen los genes *cscRAKB* son EC3132 (Bockman et al., 1992) y ATCC 9637, también conocidas como *E. coli* W o la cepa Waksman (Shukla et al., 2004). Nótese que hay algo de confusión en la bibliografía como para la identidad de la familia de cepas descritas en Shukla et al. (2004). En la publicación de Shukla et al (2004), la cepa parental llamada KO11 se describió como derivada de la ATCC 11303 o *E. coli* B, pero en realidad, la cepa se deriva de la ATCC 9637. En este
35 tipo de operón, *cscA* codifica una invertasa, *cscB* codifica un simportador de sacarosa, *cscK* codifica una fructocinasa, y *cscR* codifica un represor.

Un tercer mecanismo para la utilización de sacarosa, que también es independiente de PTS, puede utilizar en algunos casos algunos de los mismos genes o tipo de genes que uno de los otros sistemas. En este mecanismo, se libera invertasa (por ejemplo, codificada por *cscA*) en el medio, sea deliberadamente o por lisis celular, en donde escinde la sacarosa en glucosa y fructosa. Los dos monosacáridos se importan entonces en la célula y se fosforilan por las vías normales para los monosacáridos. Este tipo de sistema se utiliza por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en el que la invertasa se codifica por un gen, por ejemplo, *SUC2*, y la invertasa se secreta en el periplasma y el espacio extracelular. La glucosa más fructosa resultantes se importan entonces por difusores
45 facilitados y los azúcares se introducen en la célula por cinasas.

Un cuarto mecanismo para la utilización de sacarosa, que también es independiente de PTS, también puede en algunos casos utilizar alguno de los mismos genes o tipos de genes que uno de los otros sistemas. En este mecanismo, la sacarosa se importa, por ejemplo, mediante una permeasa codificada por *cscB*, después de lo cual se escinde por fosforólisis catalizada por una sacarosa fosforilasa. La glucosa-1-fosfato y fructosa citoplasmáticas resultantes se metabolizan entonces por las vías normales para estos metabolitos.

Un informe de la bibliografía (Alaeddinoglu y Charles, 1979) establece que los genes de utilización de la sacarosa codificados cromosómicamente de *E. coli* que están integrados cerca del locus *dsdA* (presumiblemente *cscRAKB*)
55 necesita un gen *ptsI* intacto con el fin de que funcionen. Esta declaración contradice la mayoría del resto de la bibliografía, que establece que los genes *cscRAKB* codifican un sistema independiente de PTS. Dada esta aparente contradicción, es posible que uno de los sistemas que los inventores definieron como el sistema “independiente de PTS” puede de hecho tener alguna dependencia del sistema PTS.

60 En un aspecto, se describe en el presente documento la adición de genes a un organismo con el fin de instalar o aumentar la actividad de una o más proteínas y/o enzimas implicadas en la importación y conversión de sacarosa en metabolitos intermedios tal como la fructosa 1,6-bifosfato que se puede metabolizar adicionalmente por la célula. Los genes que codifican proteínas o enzimas relevantes (llamadas en el presente documento una “función de utilización de sacarosa”) adecuados para la modificación genética se seleccionan de entre una lista de genes que codifican un
65 importador de sacarosa dependiente de PTS (una proteína PTS llamada habitualmente Enzima II^{scr} o EII^{scr} que funciona junto con otras proteínas PTS para conseguir la importación y fosforilación de sacarosa para dar sacarosa-

6-fosfato citoplasmática), sacarosa-6-fosfato hidrolasa, fructocinasa, sacarosa permeasa (una permeasa independiente de PTS que transporta sacarosa a la célula sin fosforilación concomitante), invertasa o sacarosa hidrolasa, sacarosa fosforilasa, glucosa cinasa (también conocida como glucocinasa), fructosa cinasa (también conocida como fructocinasa), hexosa-fosfato isomerasa, y fosfofructo cinasa (fructosa-1-fosfato cinasa).

5 En otra realización, se describe en el presente documento un proceso para la producción de ácido succínico u otros productos químicos utilizando sacarosa como materia prima renovable. En un aspecto, se describe un procedimiento para la producción de ácido succínico a partir de un medio que contiene sacarosa que utiliza un biocatalizador que tiene una actividad disminuida en al menos una proteína del sistema PTS nativo del organismo con respecto al de su cepa ancestral o parental. En otro aspecto, se describe en el presente documento un procedimiento para la producción de ácido succínico u otro producto químico en un medio que contiene sacarosa que utiliza un biocatalizador que mantiene un sistema dependiente de PTS nativo completamente funcional para la captación de azúcares.

15 El PTS se descubrió originalmente en *E. coli* y ahora se sabe que tiene un papel importante en el transporte de carbohidratos en una cantidad enorme de especies bacterianas. La organización molecular del PTS se conoce muy bien. A través de las especies bacterianas, el PTS está altamente conservado en su organización básica. Se describen en el presente documento biocatalizadores en los que los componentes del PTS se transfieren genéticamente de una segunda bacteria donante a una primera bacteria receptora con el fin de hacer posible que el biocatalizador utilice mejor una fuente de carbohidrato deseable en la fermentación. En particular, se describe en el presente documento biocatalizadores que pueden utilizar una materia prima renovable que contiene sacarosa en la producción fermentativa de productos tales como el ácido succínico. Más específicamente, se describen en el presente documento biocatalizadores que pueden utilizar sacarosas y melaza derivada del procesamiento de caña de azúcar en la producción de ácido succínico mediante fermentación biológica. Como el trisacárido rafinosa contiene sacarosa, todos los aspectos descritos en el presente documento que se aplican a la sacarosa se aplicarán también a la rafinosa, a condición de que esté presente en el biocatalizador un sistema de escisión de rafinosa.

La composición básica de PTS es similar en todas las especies bacterianas estudiadas hasta ahora. Contiene tres componentes principales, a saber, EI, HPr, y EII. Los componentes EI y HPr están en el citoplasma y se conocen como componentes "generales" ya que pueden trabajar en conjunción con una variedad de componentes EII específicos del carbohidrato.

El componente EII contiene tres subcomponentes, a saber, EIIA, EIIB, y EIIC. Las proteínas EIIB y EIIC están unidas a la membrana y el componente EIIA se localiza en el citoplasma o el lado citoplasmático de las proteínas de membrana. La enzima EII puede formar una única proteína con tres dominios (A, B y C) o puede dividirse en dos a cuatro proteínas distintas. EII es específica de carbohidratos y se ha informado que *E. coli* tiene al menos 15 complejos EII diferentes. Por lo tanto, el componente EII específico del transporte de glucosa a través de la membrana se denomina como $EIIA^{Glc}/EIICB^{Glc}$.

40 Todos los componentes del PTS son de naturaleza proteica. Los genes que codifican los distintos componentes de PTS se han identificado. El gen *ptsI* en *E. coli* codifica la proteína EI de 63 kDa. La proteína fosfoportadora HPr que contiene histidina de 10 kDa se codifica por el gen *ptsH* en *E. coli*. La proteína EIIA^{Glc} se codifica por el gen *crr* (resistente a la represión de resistencia de carbohidratos). La proteína EIICB^{Glc} se codifica por el gen *ptsG* en *E. coli*.

45 El sistema PTS no solo es responsable del transporte de distintos carbohidratos a través de la membrana celular, sino que también cataliza la conversión de carbohidratos en sus respectivos fosfoésteres durante el transporte. El transporte acoplado con fosforilación de carbohidratos por el PTS se consigue por la interacción entre los componentes proteicos EI, HPr, y EII.

50 Durante la glucólisis, se producen cuatro moles de PEP a partir de cuatro moles de glucosa, y la mitad del PEP se consume para proporcionar la energía de la captación de glucosa. En el caso de la importación de sacarosa, de dos moles de hexosa que aparecen de un mol de sacarosas también se producen cuatro moles de PEP, pero solo se consume un mol de PEP para el transporte de sacarosa, por lo tanto, se incrementa 1,5 veces la cantidad de PEP disponible como fuente de esqueletos de carbono para la biosíntesis en la célula cuando se utiliza la sacarosa como fuente de carbono. Es posible mejorar adicionalmente el rendimiento de ácido succínico y otros productos químicos proporcionando a la *E. coli* con un sistema de utilización de sacarosa independiente de PT que no consuma PEP para la importación de sacarosa. Esta estrategia es particularmente ventajosa para la producción de productos químicos que se derivan al menos en parte de o mediante PEP, tal como succinato, malato, fumarato, lactato, etanol, butanoles, propano dioles, ácido 3-hidroxipropiónico, ácido acrílico, ácido propiónico, ácido láctico, aminoácidos tales como glutamato, aspartato, metionina, lisina, treonina, e isoleucina, y muchos otros compuestos.

Se describen en el presente documento maneras para modificar un PTS y a su vez el patrón bacteriano de utilización de carbohidratos. Como las proteínas EI y HPr funcionan como "componentes generales" del sistema PTS, la inactivación de cualquiera de el gen *ptsI* que codifica la proteína EI o el gen *ptsH* que codifica la proteína HPr daría lugar a la inactivación completa del PTS. Habrá sustancialmente menos transporte de carbohidratos mediante el sistema PTS en células bacterianas cuando la actividad de *ptsH* o *ptsI* ha sido disminuida. Cuando el

PTS se ha inactivado parcial o completamente, la célula bacteriana tiene que depender de uno u otro sistema alternativo de permeasas para el transporte de carbohidratos. Por otra parte, cuando se inactiva el gen que codifica un componente EII particular específico de carbohidrato, solamente se bloquearía el transporte de ese carbohidrato dependiente del componente EII inactivado. Por lo tanto, la inactivación de genes *crr* o *ptsG* bloquearía solo el transporte de la glucosa mediante PTS, y el transporte de otros carbohidratos se produciría normalmente.

Cuando existe un transporte activo de glucosa mediante PTS, la EII^{Glc} se mantiene no fosforilada ya que hay un sustrato de carbohidratos para aceptar su grupo fosfato, cuando no hay glucosa en el medio, la forma fosforilada de EII^{Glc} no puede transferir su grupo fosfato a la glucosa y por lo tanto permanece en su estado fosforilado. La EII^{Glc} no fosforilada media en el fenómeno conocido en general como represión por catabolito de carbono (CCR). En la CCR, cuando existe glucosa en el medio de cultivo, el transporte y utilización de otros carbohidratos del medio se evita hasta que se utiliza completamente la glucosa del medio. La represión por catabolito de carbono se produce por el efecto inhibitorio de la EII^{Glc} no fosforilada sobre los sistemas permeasa. Se sabe que varias permeasas implicadas en el transporte de carbohidratos se inhiben por la EII^{Glc} no fosforilada. Además, se sabe que la EII^{Glc} no fosforilada tiene un efecto negativo sobre la transcripción de varios genes implicados en el transporte y metabolismo de carbohidratos mediante su influencia sobre el sistema de adenilato ciclasa. Por lo tanto, en ciertas circunstancias, es ventajoso disminuir la actividad del sistema PTS específico de glucosa con el fin de aliviar a la célula de la represión por catabolito de carbono.

En la producción fermentativa de ácido succínico, existe la necesidad de conservar el PEP dentro de la célula. El PEP puede actuar como el sustrato para las enzimas carboxilantes en la célula. La carboxilación del PEP da como resultado el ácido oxaloacético que entra en el ciclo del ácido tricarbóxico y contribuye a la producción de ácido succínico. La importancia de la carboxilación del PEP en la producción biológica de ácido succínico está muy bien reconocida como se prueba por el hecho de que algunos de los biocatalizadores más satisfactorios que se utilizan actualmente en la producción de ácido succínico, tales como KJ122, tienen un PTS que tiene reducida al menos parcialmente su actividad y el transporte de carbohidratos está mediado al menos parcialmente por un sistema de permeasa independiente del PTS. La reducción de la actividad del PTS ayuda a la conservación del PEP. Además, los biocatalizadores para la producción de ácido succínico tales como la KJ122 tienen modificaciones genéticas que dan lugar a un aumento en la tasa de carboxilación del PEP (Zhang et al., 2009 a, b). Por lo tanto, en la cepa KJ122 desarrollada para la producción de ácido succínico, el PTS está inactivado al menos parcialmente por una mutación en el gen *ptsI*. Además, el gen *pck* de PEP carboxilasa ha adquirido una mutación que produce un aumento en la actividad específica de carboxilación del PEP. Aunque es ventajoso reducir la actividad del PTS cuando se utiliza la glucosa como fuente de carbono orgánico en la producción fermentativa de ácido succínico, la misma estrategia puede que no sea la óptima para el desarrollo de una cepa para la producción de ácido succínico utilizando sacarosa como la fuente primaria de carbono orgánico.

En una realización, se describe en el presente documento un procedimiento para reactivar el "componente general" del sistema PTS en la cepa KJ122 y al mismo tiempo inactivar la captación de glucosa mediante el sistema PTS. El gen *ptsI* mutado en KJ122 se reemplaza por un gen *ptsI* de tipo silvestre y el gen *ptsG* se elimina. Estas modificaciones genéticas permiten el transporte de carbohidratos diferentes de glucosa mediante el PTS. Además, la eliminación del gen *ptsG* elimina la represión por catabolito de carbono que resulta de la proteína EIIA^{Glc} no fosforilada. Esta situación es la contraria a la situación en la que el gen *ptsI* está mutado. En la célula bacteriana con un gen *ptsI* intacto y eliminación del *ptsG*, se espera que la proteína EIIA^{Glc} esté en su estado fosforilado. Cuando la proteína EIIA^{Glc} está en su estado fosforilado, no se produce ninguna actuación inhibitoria en otras permeasas ni sobre la transcripción de los genes implicados en el metabolismo de carbohidratos.

Cuando se transporta la sacarosa mediante un PTS, entra en la célula en forma fosforilada como sacarosa-6-fosfato. El metabolismo adicional de sacarosa-6-fosfato en la célula implica las siguientes reacciones bioquímicas. En la primera etapa, la sacarosa-6-fosfato se hidroliza mediante la enzima hidrolizante apropiada tal como la sacarosa-6-fosfato hidrolasa para liberar glucosa-6-fosfato y fructosa. La glucosa-6-fosfato se convierte en fructosa-6-fosfato mediante la acción de una enzima isomerasa. En las siguientes etapas, la fructosa-6-fosfato se fosforila adicionalmente para formar fructosa 1-6 bifosfato que a su vez se escinde en fosfogliceraldehído y dihidroxiacetona fosfato. Estos tres compuestos de carbono derivados de la fructosa-1,6-bifosfato entrarán en el ciclo del ácido tricarbóxico y proporcionarán la matriz de carbono para la producción de ácido succínico.

La fructosa liberada de la hidrólisis de la sacarosa-6-fosfato necesita fosforilarse antes de que entre en la ruta glicolítica. La fosforilación de fructosa está mediada por la fructocinasa. Cuando no existe fructocinasa endógena o cuando la actividad de la enzima endógena es baja, es necesario proporcionar una fuente adicional de actividad de enzima fructocinasa mediante la introducción de un gen exógeno que codifique la actividad de la enzima fructosa cinasa.

Esta estrategia de inactivación del gen *ptsG* y el transporte de sacarosa mediante PTS es posible solamente en las cepas en las que exista un componente EIIA/CB específico de sacarosa del PTS. Esta proteína se llama entre otros nombres Enzima II^{scr}. Cuando no existe dicho componente EIIA/CB específico de sacarosa endógeno en la cepa ya desarrollada para la producción de ácido succínico, existe la necesidad de proporcionar genes exógenos que codifiquen los componentes EIIA/CB específicos de sacarosa, que puedan funcionar juntos con los "componentes

generales” del PTS ya presente en el biocatalizador de la producción de ácido succínico.

En otra realización descrita en el presente documento, cuando existe la necesidad de mantener el PTS en un estado de actividad reducida con el fin de mantener un agrupamiento de PEP suficiente como sustrato para la carboxilasa y/o carboxicinasa enzimáticas, se puede facilitar el transporte de sacarosa utilizando una sacarosa permeasa independiente del PTS. En la circunstancia en la que el biocatalizador ya desarrollado para la producción de ácido succínico no tenga un gen que codifique la permeasa específica de sacarosa no PTS, es necesario introducir un gen exógeno que pueda mediar en el transporte no PTS de sacarosa a la célula. Se ha informado que varias cepas bacterianas tales como la cepa W de *E. coli* tienen un operón que codifica proteínas implicadas en el transporte no PTS de sacarosa en la célula. Cualquiera de los operones de sacarosa permeasa de otras cepas bacterianas conocidos se pueden introducir en estas cepas bacterianas que carecen de la capacidad de transporte no PTS de sacarosa. Un ejemplo de esta captación no PTS de sacarosa es la que se codifica por los genes *cscRAKB* cromosómicos presentes cerca del locus *dsdA* (de la D-serina desaminasa) en algunas, pero no todas las cepas de *E. coli*. Ejemplos de cepas de *E. coli* que contienen genes *cscRAKB* son la cepa EC3132 de *E. coli* y la cepa ATCC 9637 de *E. coli*, también conocida por *E. coli* W o cepa Waksman, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella spp.*, *Erwinia amylovora*, y muchas otras.

Ciertas cepas de *E. coli* tales como la cepa W de *E. coli* (ATCC 9637) se sabe que poseen una ruta metabólica y de transporte de sacarosa independiente de PTS codificada cromosómicamente. Los tres genes diferentes implicados en el metabolismo y transporte de sacarosa independiente de PTS, a saber, *cscB*, *cscA*, y *cscK* se organizan en el ADN cromosómico como un operón. El gen *cscB* codifica un simportador de sacarosa: H⁺. El gen *cscA* codifica una invertasa enzimática que escinde la sacarosa transportada en la célula en glucosa y fructosa. El gen *cscK* codifica una fructocinasa. El operón *csc* está bajo el control de una proteína represora codificada por el gen *cscR*. En una realización específica descrita en el presente documento, los genes *cscA*, *cscB* y *cscK* se introdujeron en una cepa KJ122 productora de succinato, sin un gen *cscR* regulador de control intacto. Estos tres genes *cscABK*, se pueden introducir en la cepa KJ122 sobre un plásmido auto-replicante o, preferentemente, se pueden integrar en el cromosoma del huésped. En una realización preferida, los tres genes *cscABK*, se integran en una región no esencial del cromosoma del huésped (una región en la que la inserción de los genes añadidos no tenga una influencia significativamente negativa en ningún aspecto relevante del crecimiento o producción del producto deseado tal como el succinato en un proceso comercial) y los genes añadidos se expresan a partir de uno o más promotores constitutivos apropiados.

El título del producto de la sacarosa es igual a al menos el título producido por el organismo parental a partir de la glucosa, y el rendimiento del producto es mayor de 0,8 gramos de ácido succínico producido /gramo de sacarosa consumida. Los genes exógenos introducidos en la célula se pueden mantener en la célula sobre un plásmido auto-replicante. Un plásmido se puede mantener mediante la selección con antibióticos o la complementación de una mutación cromosómica. Preferentemente, los genes exógenos se integran en el cromosoma del huésped de manera que no haya necesidad de añadir antibióticos para mantener los plásmidos en la célula. Existen varias localizaciones posibles en la célula para la integración de los genes exógenos. Las localizaciones preferenciales para la integración de los genes exógenos en el ADN cromosómico de *E. coli* incluye regiones con funciones no esenciales para el crecimiento y la formación del producto en condiciones de fermentación comerciales.

Estas permeasas de azúcares independientes de PTS facilitan el transporte de sacarosa en la célula sin ninguna modificación química. El sistema de sacarosa permeasa independiente de PTS incluyen sistemas de simporte de catión de soluto, tal como el simportador ScrT en el operón de sacarosa de *Bifidobacterium lactis* y el transportador CscB de *E. coli*. Estos sistemas de transporte específicos de sacarosa están agrupados en general con los genes catabólicos y reguladores en distintas disposiciones en las diferentes bacterias.

Cuando los genes exógenos se obtienen como un operón, se prefiere eliminar cualquiera de los genes reguladores negativos o proteínas del operón. Es ideal tener solo los genes y proteínas que funcionan positivamente en el transporte y metabolismo de sacarosa. Por lo tanto, la expresión de los genes de utilización de la sacarosa no está inhibida preferentemente por un represor o por represión por catabolito de carbono.

Cuando se utiliza un sistema de transporte de sacarosa no PTS como mecanismo de transporte, la sacarosa que entra en la célula está aún en forma no fosforilada y es necesario fosforilar la sacarosa antes de que entre en la ruta metabólica de la célula. La sacarosa se puede fosforilar utilizando una sacarosa cinasa endógena ya presente en la célula. En el caso en el que no haya una sacarosa cinasa endógena en la célula, se puede introducir un ADN exógeno que codifique la sacarosa cinasa en la célula. Una vez que la sacarosa está fosforilada, la sacarosa-6-fosfato resultante se puede metabolizar por las acciones de las enzimas sacarosa-6-fosfato hidrolasa, glucosa-6-fosfato-isomerasa, fructocinasa, fosfofructocinasa, y fructosa 1,6-bifosfato aldolasa como se ha descrito anteriormente. De nuevo, si fuera necesario, los genes que codifican estas enzimas se pueden introducir en el biocatalizador que se desarrolle. Como alternativa, después de que la sacarosa entre en la célula, puede escindirarse en glucosa y fructosa por una invertasa. La glucosa y fructosa resultantes pueden entrar en el metabolismo por acciones de las enzimas glucocinasa y fructocinasa, respectivamente.

65

La fosforilación de la sacarosa también se puede conseguir por la sacarosa fosforilasa (SPasa). La sacarosa fosforilada cataliza la conversión de sacarosa (α -D-glucopiranosil-1,2- β -D-fructofuranósido) y fosfato en D- fructosa y α -G-1-P (α -D-glucosa-1-fosfato). Esta reacción de fosforólisis consigue las dos etapas necesarias para que los carbonos de sacarosa entren en el metabolismo central, 1) la escisión del disacárido en dos monosacáridos y 2) la fosforilación de al menos uno de los monosacáridos. Otro beneficio de esta fosforólisis es que no consume ATP para la fosforilación como la reacción de glucocinasa. En vez de esto, la energía para la formación del enlace fosfato se deriva de la energía liberada por la hidrólisis. Como tal, se puede realizar una mejora en la utilización de sacarosa introduciendo, por ejemplo, además de los genes *cscAKB* de la cepa W de *E. coli*, un gen que codifique una sacarosa fosforilasa en una célula bacteriana sin capacidad de utilización de la sacarosa. De manera alternativa, el gen de invertasa, *cscA*, se puede remplazar con un gen que codifique la sacarosa fosforilasa. Se han descrito varias sacarosa fosforilasas (Goedl et al., 2007). Cualquiera de dichos genes que codifican una sacarosa fosforilasa se puede clonar y expresar en una cepa receptora por medios bien conocidos en la técnica. En una realización preferida, se integra un casete de expresión que incluye un gen de sacarosa fosforilasa en el cromosoma de una cepa receptora.

Los sistemas de permeasa dependientes de PTS e independientes de PTS para el transporte de sacarosa no son mutuamente excluyentes entre ellos. Es posible tener un PTS funcionalmente activo junto con un sistema de permeasa independiente de PTS funcionalmente activo para el transporte de sacarosa en la misma célula bacteriana.

Se desvela en el presente documento la transferencia genética de sistemas de transporte y utilización de la sacarosa a partir de uno o más organismos donantes que contienen naturalmente los genes relevantes (por ejemplo, *scrKYABR*, *scrRAKB*, *cscRAKB*, *scrP*, *spl* o una combinación, o un subconjunto de los mismos) en un organismo receptor que no contienen naturalmente dichos genes relevantes, de tal manera que se confiera a dicho organismo receptor una nueva capacidad para utilizar la sacarosa o para aumentar la capacidad de utilización de la sacarosa ya existente. *ScrP* y *Spl* son genes que codifican la sacarosa fosforilasa. Ejemplos de dichos organismos que no contienen naturalmente los genes relevantes de transporte y utilización de sacarosa incluyen, pero no se limitan a, cepas de *E. coli* K-12 (tales como EMG2, MG1655, W3110, W3350, C600, y DH5 α), que es la cepa de fondo para la gran mayoría del trabajo de modificación genética hecho en *E. coli*, ATCC 8739 (*E. coli* C), ATCC 11303 (*E. coli* B), BL21 (véase el catálogo de New England Biolabs, 2007-2008) y derivados de estas cepas. Otros ejemplos de dichos organismos receptores incluyen una amplia variedad de otras bacterias y arqueas que no tienen la capacidad nativa para utiliza sacarosa, o que utilizan poco la sacarosa. La única limitación es que el organismo receptor debe ser capaz de alterarse genéticamente (por modificación genética, emparejamiento, transducción, transformación, etc.), de manera que los genes de utilización de sacarosa descritos en el presente documento se puedan instalar en la cepa receptora. El organismo receptor también puede ser de un tipo que ya ha sido construido, seleccionado, explorado, reproducido, o alterado de otra manera de manera que puede ya producir un producto químico de interés. Un ejemplo de este tipo de cepa receptora es la KJ122 (Jantama et al., 2008 a, b) y un ejemplo del producto químico de interés es el ácidos succínico.

Otros ejemplos de organismos receptores incluyen, pero no se limitan a: *Gluconobacter oxydans*, *Gluconobacter asaii*, *Achromobacter delmarvae*, *Achromobacter viscosus*, *Achromobacter lacticum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Alcaligenes faecalis*, *Arthrobacter citreus*, *Arthrobacter tumescens*, *Arthrobacter paraffineus*, *Arthrobacter hydrocarboglutamicus*, *Arthrobacter oxydans*, *Aureobacterium saperdae*, *Azotobacter indicus*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *divaricatum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium globosum*, *Brevibacterium fuscum*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, *Brevibacterium helcolum*, *Brevibacterium pusillum*, *Brevibacterium testaceum*, *Brevibacterium roseum*, *Brevibacterium immariophilum*, *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium protopharmiae*, *Corynebacterium acetophilum*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium callunae*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Enterobacter aerogenes*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia chrysanthemi*, *Flavobacterium peregrinum*, *Flavobacterium fucatum*, *Flavobacterium aurantinum*, *Flavobacterium rhenanum*, *Flavobacterium sewanense*, *Flavobacterium breve*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Micrococcus* sp. CCM825, *Morganella morgani*, *Nocardia opaca*, *Nocardia rugosa*, *Planococcus eucinatus*, *Proteus rettgeri*, *Propionibacterium shermanii*, *Pseudomonas synxantha*, *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas ovalis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas acidovolans*, *Pseudomonas mucidolens*, *Pseudomonas testosteroni*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus rhodochrous*, *Rhodococcus* sp. ATCC 15592, *Rhodococcus* sp. ATCC 19070, *Sporosarcina ureae*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio metschnikovii*, *Vibrio tyrogenes*, *Actinomyces madurae*, *Actinomyces violaceochromogenes*, *Kitasatosporia parulosa*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces flavulus*, *Streptomyces griseolus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces olivaceus*, *Streptomyces tanashiensis*, *Streptomyces virginiae*, *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces cacaoi*, *Streptomyces lavendulae*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Aeromonas salmonicida*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus thiaminolyticus*, *Escherichia freundii*, *Microbacterium ammoniaphilum*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella schottmulleri*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Basfia succiniciproducens* y *Xanthomonas citri*.

La presente invención se explicará en detalle posteriormente. La bacteria que pertenece al género *Escherichia* como se describe en el presente documento es una cepa que se construye a partir de una *Escherichia coli* no asimilativa

de sacarosa como cepa parental, y que después de la construcción alberga genes de sacarosa, preferentemente genes independientes de PTS de sacarosa y que tiene la capacidad para producir ácido succínico.

5 Los materiales genéticos para conferir la capacidad de utilización de sacarosa a una cepa bacteriana receptora puede obtenerse a partir de varias cepas bacterianas donantes. Dependiendo de la cepa de bacteria donante que sirva como fuente del material genético para conferir la capacidad de utilización de sacarosa, la cepa receptora adquiere la capacidad de utilización de sacarosa dependiente de PTS o una capacidad de utilización de sacarosa independiente de PTS.

10 Se sabe que el *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 y *Clostridium beijerinickii* transportan sacarosa mediante un PTS. Se comunicó que el operón para el transporte y metabolismo de sacarosa en cada uno de estos organismos codifica tres proteínas funcionales y una proteína reguladora. Por lo tanto, en el *Clostridium acetobutylicum*, el operón de transporte y metabolismo de sacarosa contiene los genes *scrA*, *scrB*, *scrK* y *scrT* que codifican la Enzima II del PTS, la sacarosa-6-fosfato hidrolasa, fructocinasa, y una proteína reguladora antiterminadora, respectivamente.

15 el caso de *Clostridium beijerinickii*, el operón de transporte y metabolismo de sacarosa contiene los genes *scrA*, *scrB*, *scrK*, y *scrR* que codifican la Enzima II del PTS, sacarosa-6-fosfato hidrolasa, fructocinasa, y una proteína reguladora, respectivamente. Cuando se necesita convertir una cepa bacteriana incapaz de utilizar sacarosa en una cepa que utiliza sacarosa, solamente los genes *scrA*, *scrB* y *scrK* obtenidos de cualquiera de las especies de *Clostridium* se introducen en la cepa negativa al PTS de sacarosa. Estos tres genes se pueden derivar de una única especie de *Clostridium*. De manera alternativa, uno o dos genes se pueden derivar de una especie y el resto de los genes puede derivarse de otras especies.

20

El *Staphylococcus xylosus* puede ser una fuente de un gen *scrA* que codifica una proteína de PTS específico de sacarosa y un gen *scrB* que codifica una sacarosa fosfato hidrolasa.

25

La *Mannheimia succiniproducens* es otra fuente de un gen que codifica una proteína de PTS específico de sacarosa. Se ha demostrado recientemente que el gen MS0784 de *M. succiniproducens* codifica una proteína con una función PTS específica de sacarosa. Se ha demostrado recientemente que el gen MS0909 codifica una proteína con actividad sacarosa 6-fosfato hidrolasa. El *Corynebacterium glutamicum* es otra fuente más de genes útiles en el presente documento. El gen de PTS de sacarosa que codifica la proteína EIIBC^A de sacarosa también como la sacarosa-6-fosfato hidrolasa se pueden obtener del operón del PTS de sacarosa de *C. glutamicum*. El operón del PTS de fructosa de *C. glutamicum* se puede utilizar como la fuente de un gen de fructosa-1-fosfato cinasa. Tanto el *Corynebacterium glutamicum* como *Mannheimia succiniproducens* carecen del gene para fructocinasa y la fructosa liberada de la hidrólisis de la sacarosa-6-fosfato se libera en el medio y se capta mediante un PTS de fructosa. Una forma para mejorar la utilización de sacarosa en las cepas que carecen de actividad de enzima fructosa cinasa es introducir un gen exógeno que codifica la enzima fructosa cinasa.

30

35

Otras fuentes de genes y proteínas de utilización de sacarosa son las siguientes: La proteína ScrA del PTS específico de sacarosa se pueden derivar de *Erwinia chrysanthemi* 3937. De manera similar, el *Bacillus subtilis* puede ser la fuente de la proteína SacP del PTS específico de sacarosa. El gen *sacP* de *B. subtilis* codifica la proteína EIIBC^{scr} que funciona presumiblemente con la EIIA^{glu} para transportar la sacarosa. El gen *sacA* codifica la sacarosa-6-fosfato hidrolasa que hidroliza la sacarosa-6-fosfato intracelular.

40

En el operón *scrARBK* de las especies de *Clostridium*, *scrA* codifica el dominio EIIBC^{scr} del PTS de sacarosa, que está complementada probablemente por la proteína EIIA^{glu}. El *scrB* codifica la sacarosa hidrolasa y el *scrK* codifica la fructocinasa. En el *Staphylococcus xylosus*, el *scrA* está separado del *scrB* y *scrK*. El gen *scrA* codifica la EIIBC^{scr}. El gen *scrB* codifica la sacarosa hidrolasa y *scrK* codifica fructocinasa. En la bacteria acidoláctica Gram-positiva *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, y *Streptococcus mutans* el *scrA* codifica una proteína del PTS de sacarosa. El *scrB* codifica la sacarosa-6-P hidrolasa. El *scrK* codifica la fructocinasa. En las bacterias entéricas de Salmonella spp. el plásmido conjugativo y el transposón conjugativo tiene un operón *scrKYABR*. El *scrK* codifica fructocinasa, *scrY* codifica una porina de membrana externa, *scrA* codifica la proteína de transporte EI^{scr}, y *scrB* codifica una sacarosa-6-P hidrolasa. La *Erwinia amylovora* tiene el mismo agrupamiento genético de *scrKYABR* que en la *Klebsiella pneumoniae* y pUR400. El *Vibrio alginolyticus* tiene el operón *scrRAKB*. El gen *scrA* codifica una proteína EIIBC^{scr} que está complementada por la subunidad EIIA^{glu} de *E. coli* y *scrB* codifica la sacarosa hidrolasa.

45

50

55

El aislado EC3132 de *E. coli* de tipo silvestre puede utilizar la sacarosa mientras que la cepa K12 de *E. coli* no puede utilizar la sacarosa. Los genes no PTS implicados en la utilización y metabolismo de sacarosa a saber *cscB*, *cscK*, *cscA* y *cscR* están localizadas cromosómicamente en EC3132. Estos genes *cscB*, *cscK*, *cscA* y *cscR* de la cepa EC3132 de *E. coli* se pueden introducir en la cepa K12 de *E. coli* para conferir la capacidad de utilización de sacarosa a la cepa K12 de *E. coli*.

60

El gen de la sacarosa fosforilasa se puede obtener en el ADN de *Bifidobacterium longum*, *Leuconostoc mesenteroides* (por ejemplo, la cepa DSM 20193), *Pseudobutyrvibrio ruminis*, o *Bifidobacterium lactis*. El gen *scrP* de *B. lactis* y el gen *spl* de *B. longum* codifican la sacarosa fosforilasa.

65

El *B. longum* puede ser una fuente de genes de permeasa, fosforilasa y fructocinasa. En el *B. longum*, los genes de la permeasa (*scrT*) y fosforilasa (*scrP*) existen en un operón junto con un gen que codifica un regulador transcripcional (*scrR*). también está presente en el *B. longum* un gen de la fructocinasa (*frk*) que es inducible por la fructosa y está sometido a represión mediada por glucosa. Mediante el uso de conjuntos de cebadores específicos, las fases de lectura abierta de estos genes se pueden obtener y expresarse en el biocatalizador utilizando promotores adecuados.

Los genes que codifican la glucocinasa y fructocinasa pueden obtenerse de *Zymomonas mobilis*. Una glucocinasa con amplia especificidad por hexosa se puede obtener de *Bacillus sphaericus* C3-41. La glucocinasa de estas especies bacterianas se ha demostrado también para fosforilasa fructosa y manosa también. La glucocinasa codificada por *glk* genómico de *E. coli* sola o en combinación con la glucocinasa codificada por *glk* de *Zymomonas mobilis* localizado en un plásmido también cataliza la fosforilación de la glucosa. Además de la copia del *glk* ya presente en el ADN genómico de *E. coli*, se proporcionan copias adicionales del gen *glk* en un plásmido de baja copia ajo el control de ciertos promotores constitutivos, o integrado en el cromosoma.

Los genes exógenos introducidos en la célula pueden mantenerse en la célula en un plásmido auto-replicante. Un plásmido se puede mantener mediante selección con antibióticos o complementación de una mutación cromosómica. Sin embargo, cuando se mantienen genes exógenos en el biocatalizador en un plásmido auto-replicante en la célula, es necesario asegurarse que no habrá un gasto innecesario de energía y materiales que den lugar a la inhibición del crecimiento y una disminución del rendimiento o productividad del material orgánico que se va a fabricar utilizando el biocatalizador. Preferencialmente, los genes exógenos se integran en el cromosoma del huésped de manera que no existe la necesidad de añadir antibióticos para mantener los plásmidos en la célula. Existen varias localizaciones posibles en la célula para la integración de los genes exógenos. Las localizaciones preferenciales para integrar los genes exógenos en el ADN cromosómico de *E. coli* incluye regiones sin funciones esenciales para el crecimiento y formación de productos en condiciones de fermentación comerciales.

Cuando se obtienen los genes exógenos como un operón, es preferible eliminar cualquier posible gen regulador negativo o proteínas del operón. Es ideal tener solo los genes y proteínas que funcionan positivamente en el transporte y metabolismo de sacarosa. Por lo tanto, la expresión de genes de utilización de sacarosa es preferible que no se inhiba por un represor o por represión por catabolito de carbono.

Los genes necesarios para la utilización de sacarosa se pueden derivar a partir de dos organismos donantes distintos. Por ejemplo, el gen *scrK* para la fructocinasa se podría derivar de *K. pneumoniae*, y los genes *cscA* y *cscB* se podrían derivar de la cepa W de *E. coli*, y los tres genes se podrían combinar en una cepa receptora. Como otro ejemplo, un gen que codifica la sacarosa fosforilasa de *Leuconostoc mesenteroides* se podría instalar junto con los genes *cscB* y *cscK* de la cepa W de *E. coli*, sea con o sin el gen *cscA*.

Cualquier bacteria que no sea asimilativa para sacarosa y tiene la capacidad para producir ácido succínico puede mejorarse de acuerdo con la presente divulgación.

La bacteria descrita en el presente documento se puede obtener mediante la introducción de genes que utilizan la sacarosa por un sistema de utilización de sacarosa dependiente de PTS o un sistema que utiliza sacarosa independiente de PTS en una cepa productora de ácido succínico tal como la KJ122. De manera alternativa, la bacteria descrita en el presente documento se puede obtener confiriendo la capacidad para producir ácido succínico a una bacteria en la cual ya está presente un sistema que utiliza la sacarosa dependiente de PTS o un sistema que utiliza la sacarosa independiente de PTS. Esta última alternativa se puede conseguir, por ejemplo, siguiendo todas las etapas utilizadas para la construcción de la KJ122 (desvelado en Janatama et al., 2008), pero comenzando con la cepa ATCC 9637 en vez de comenzar con la cepa ATCC 8739.

La fuente del sistema de utilización de sacarosa dependiente de PTS o un sistema de utilización de sacarosa independiente del PTS no está particularmente limitado a condición de que los genes relevantes puedan funcionar o hacer que funcionen en la célula bacteriana de interés.

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración de la presente invención y no como limitación.

Ejemplo 1

Construcción de SD14, un derivado de KJ122 que contiene el agrupamiento genético *cscBKA* de *E. coli* W

El agrupamiento genético *cscBKA* que codifica los genes para la utilización de sacarosa, captación y utilización, se amplificaron desde el ADN genómico de la cepa W de *Escherichia coli* (ATCC 9637) utilizando una reacción en cadena de la polimerasa. Los cebadores de la PCR se diseñaron de tal manera que el producto de la PCR resultante contenía solo los genes *cscB*, *cscK*, y *cscA* del operón *csc* original de la cepa W y no un gen *cscR* funcional que codifica una proteína represora. Además de las secuencias homólogas del operón *csc*, los cebadores para la amplificación por PCR incluían 50 bases (pb) en el extremo 5' de secuencias que son homólogas con el sitio para la integración en el cromosoma de *E. coli* KJ122. Las secuencias de los cebadores de la PCR utilizados en el presente

ejemplo se enumeran en la Tabla 1. El sitio diana para la integración está a 291 pb corriente arriba del gen *rrnC*. Este sitio no codifica ningún gen conocido minimizando de esta manera la posibilidad de alterar una función genética importante de *E. coli*.

5 El producto de la PCR obtenido utilizando los cebadores SD032 y SD033 y el ADN cromosómico de la ATCC 9673 como matriz se purificó utilizando Kits de Purificación de PCR QIAquick de Qiagen como instruye el fabricante. Los fragmentos purificados se transformaron entonces en KJ122 que contenía el plásmido auxiliar pKD46 de acuerdo con el método descrito por Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner, 2000). El pKD46 está disponible en *E. coli* Genetic Stock Center, Yale University, New Haven, CT. La selección era por el crecimiento en placas mínimas con sacarosa. Las cepas resultantes se ensayaron en cuanto a la integración correcta de los genes *csc* en el sitio diana que se pretendía corriente arriba del *rrnC* por PCR diagnóstica utilizando los cebadores del SD033 al SD036 en distintas combinaciones apropiadas. Las cepas correctas crecían bien en un medio mínimo con sacarosa y daba lugar a colonias rojas en las placas de sacarosa MacConkey. Para todos los medios de cultivo, la sacarosa era ultrapura (por ejemplo, el número de catálogo de Sigma S 7903). Las soluciones de reserva de sacarosa se hicieron al 50 % (peso/volumen) en agua desionizada y se esterilizaron por filtración a través de unidades de filtro Nalgene de membrana de nilón desechable de 0,2 micrómetros. Un aislado particular llamado SD14 se utilizó para el trabajo posterior.

20 En una manera similar a la descrita anteriormente, se puede amplificar cualquier secuencia de ADN que codifica los genes de utilización de sacarosa (sean independientes de PTS o dependientes de PTS, por ejemplo, un operón *scrKYBA* de *Klebsiella pneumoniae* o pUR500) por PCR e integrarse en el cromosoma de una cepa receptora en la misma diana descrita anteriormente o en cualquier otra diana. Por ejemplo, utilizando los cebadores SD038 y SD039, el operón *cscbBAK* de *E. coli* W se puede integrar justo corriente arriba del gen *dnaA* en KJ122.

25 Las Figuras 1 – 5 proporcionan los resultados de los experimentos hechos con la cepa SD14 en fermentadores microaeróbicos a pequeña escala. La Figura 1 proporciona los datos de la cinética de utilización de sacarosa, y la cinética para la acumulación de glucosa, fructosa, y ácido succínico. También se muestra en la Figura 1 la cinética de crecimiento bacteriano. Las Figuras 2 – 5 muestran la cinética de utilización de sacarosa, la cinética de acumulación de glucosa, la cinética de acumulación de fructosa, y la cinética de acumulación de ácido succínico, respectivamente. En los experimentos descritos en las Figuras 2- 5 se utilizaron tres concentraciones diferentes de sacarosa (100 g/l, 150 g/l y 200 g/l).

Ejemplo 2

35 Análisis de crecimiento y utilización de sacarosa en la cepa recombinante SD14 en un fermentador de 7 litros

La cepa SD14 se cultivó en un medio mínimo suplementado con un 10 % de sacarosa. Se utilizó una solución madre que contenía tanto hidróxido amónico como bicarbonato amónico (NH_4OH 7 N y NH_4HCO_3 3M) para neutralizar el ácido succínico producido en los fermentadores a 39 °C. El volumen de partida de 3 litros contenía sulfato potásico monobásico (18 mM), sulfato magnésico (2 mM), betaína (1,33 mM), elementos traza (Jantama et al., 2008 a, b), antiespumante 204 (8 ppm) y sacarosa por lotes a 98 g/l. Se ajustó el pH inicialmente a un pH de 7,0 y a continuación se mantuvo a un pH de 6,5 por la adición de la solución de hidróxido amónico/bicarbonato amónico descrita anteriormente. Se suministró aire a 5 ml/minuto. El inóculo de 150 ml se cultivó aeróbicamente y contenía un medio mínimo con un 2 % de sacarosa y suplementado con un 0,1 mM de cloruro cálcico.

45 Por comparación, se fermentó la KJ122 en el mismo medio con la misma solución de neutralización, excepto en la fuente de carbono era glucosa, en lotes de 25 g/l y entonces se suministró en modo semi-continuo desde una concentración de 220 g/l. Se ensayaron los azúcares, succinato y productos secundarios por HPLC, como se había descrito (Zhang et al., 2009 a, b; Jantama et al., 2008 a, b).

50 Los resultados se compararon con una operación semi-continua de la cepa parental KJ122 cultivada en glucosa en la Tabla 2. La cinética de utilización de sacarosa, acumulación de glucosa, acumulación de fructosa y producción de succinato durante la fermentación con SD14 se muestra en la Figura 6. La sacarosa se consumió completamente en unas 50 horas y la concentración de ácido succínico en el medio alcanzaba un valor de 83,08 gramos por litro de caldo de fermentación a las 50 horas. Las concentraciones de glucosa y fructosa en el medio alcanzaban su pico sobre las 25 horas.

Ejemplo 3

60 Clonación y expresión de una sacarosa fosforilasa en SD14

El gen de sacarosa fosforilasa de la cepa DSM 20193 de *Leuconostoc mesenteroides* (Goedl et al., 2007) se clonó por amplificación por PCR utilizando los cebadores BY107 y BY108 (véase la Tabla 1) y el ADN genómico como matriz. El producto de la PCR resultante de 1594 pb se purificó en la columna de purificación PCR QIAquick de Qiagen, se escindió con las enzimas de restricción XbaI y BamHI (New England Biolabs), y se purificaron por electroforesis en gel de agarosa. El fragmento resultante se ligó en la estructura XbaI a BamHI de pOM324 (Solicitud

de Patente de EE. UU. 2009/0311756) para dar el plásmido pRY801, que coloca el gen de sacarosa fosforilasa bajo el control de un promotor constitutivo fuerte. El casete promotor-gen de sacarosa fosforilasa- terminador se escinde del pRY801 cortando con XhoI y BamHI, y los extremos pegajosos del casete resultante se hacen truncan con el Kit Blunting Quick (New England Biolabs), y el fragmento truncado se ligó en el pMH17F (SEQ ID NO. 13) que se
5 habían cortado con BsrBI y se trató con fosfatasa de intestino de ternera (New England Biolabs), para dar el plásmido pRY802F (SEQ ID NO. 14). En el pRY802F, el casete de expresión de sacarosa fosforilasa está flanqueado en cada extremo con aproximadamente 500 pb de secuencia de ADN que es homóloga a una secuencia justo corriente abajo del gen *thrV* de la cepa SD14. El casete y la secuencia circundante se amplifica por PCR utilizando pRY802F como matriz y los cebadores BY83 y BY84 (véase la Tabla 1). El fragmento resultante de 2,7
10 kilobases se purificó en la columna de purificación PCR QIAquick Qiagen. Este fragmento se instaló entonces en la SD14 cerca del locus *thrV* por el método de remplazo genético de dos etapas de Hantama et al. (2008 a, b), utilizando un casete *cat-sacB* de selección y contra selección con las misas secuencias flanqueantes homólogas de la región *thrV* para la primera etapa. Para la primera etapa, el casete *cat-sacB* se obtiene como un fragmento truncado EcoICRI a partir de pCA2 y se liga en el BsrBI escindido, y tratado con fosfatasa de intestino de ternera, pMH17F como se ha descrito anteriormente, para dar el plásmido pRY803F (SEQ ID NO. 15). El casete *cat-sacB*
15 con las secuencias circundantes homólogas de la región *thrV* se amplifica por PCR utilizando los cebadores BY83 y BY84. El producto de ADN lineal de 4 kb se utiliza para transformar la SD14 para la resistencia al cloranfenicol para dar la cepa RY863. En la segunda etapa, el producto de ADN lineal de 2,7 kb descrito anteriormente (que contiene el casete de expresión de sacarosa fosforilada de pRY802F) se utilizó para transformar la RY803 para resistencia a la sacarosa (Jantama et al., 2008 a, b) para dar la cepa RY864. La cepa correcta se verificó utilizando una PCR diagnóstica con el ADN cromosómico como matriz y BY83 y BY84 como cebadores. La cepa resultante, RY864, tiene el casete de sacarosa fosforilasa integrado cerca de *thrV*, y expresa un nivel significativo de sacarosa fosforilasa, que mejora la eficacia de utilización de sacarosa ahorrando un ATP por mol de sacarosa escindida.

25 Referencias

- Patente de EE. UU. 6.960.455
Patente de EE. UU. 7.179.623
Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N.º 20080275426
30 Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N.º 20090047719
Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N.º 20090253192
Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N.º 20090311756
Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. N.º 20100184171
Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.º WO2010/032698
35 Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.º WO2010/053052
Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.º WO2010/115067
Alaeddinoglu, N. G., y Charles, H. P. (1979) Transfer of a gene for sucrose utilization into *Escherichia coli* K12, and consequent failure of expression of genes for D-serine utilization, *J Gen Microbiol* 110, 47-59.
Bachmann, B. J. (1972) Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12, *Bacteriol Rev* 36, 525-557.
40 Becker, J., Klopprogge, C., Zelder, O., Heinzele, E., y Wittmann, C. (2005) Amplified expression of fructose 1,6-Bisphosphatase in *Corynebacterium glutamicum* increases *in vivo* flux through the pentose phosphate pathway and lysine production on different carbon sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 8587-8596.
Bockmann, J., Heuel, H., y Lengeler, J. W. (1992) Characterization of a chromosomally encoded, non-PTS metabolic pathway for sucrose utilization in *Escherichia coli* EC3132, *Mol Gen Genet* 235, 22-32.
45 Caescu, C., Vidal, O., Krzewinski, F., Artenie, V., y Bouquelet, S. (2004) *Bifidobacterium longum* requires a fructokinase (Frk; ATP:D-fructose 6-phosphotransferase, EC 2.7.1.4) for fructose catabolism. *J. Bacteriol.* 186: 6515-6525. Datsenko, K. A., y Wanner, B. L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6640-6645.
Deutscher, J., Francke, C., y Postma, PW. (2006) How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbio. Mol. Bio. Rev.* 70: 939-1031.
50 Doelle, HW. (1982) Kinetic characteristics and regulatory mechanisms of glucokinase and fructokinase from *Zymomonas mobilis*. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 14: 241-246.
Dominquez, H., y Lindley, ND. (1996) complete sucrose metabolism requires fructose phosphotransferase activity in *Corynebacterium glutamicum* to ensure phosphorylation of liberated fructose. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3878-3880.
55 Engels, V., Linden, SN., y Wendisch, VF. (2008) The global repressor SugR controls expression of genes of glycolysis and of the L-lactate dehydrogenase LdHA in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* 190: 8033-8044.
Goedl, C., Schwarz, A., Minani, A., y Nidetzky, B. (2007) Recombinant sucrose phosphorylase from *Leuconostoc mesenteroides*: characterization, kinetic studies of transglucosylation, and application of immobilised enzyme for production of alpha-D-glucose 1-phosphate, *J Biotechnol* 129, 77-86.
60 Han, B., Liu, H., Hu, X., Cai, Y., Zheng, D., Yuan, Z. (2007) Molecular characterization of a glucokinase with broad hexose specificity from *Bacillus sphaericus* strain C3-41. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 3581-3586.
Hernandez_Montalvo, V., Martinez, A., Hernandez-Chavez, G., Bolivar, F., Valle, F., Gosset, G. (2003) Expression of galp and glk in a *Escherichia coli* PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products. *Biotechnol. Bioengineer.* 83: 6897-694.
65 Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., y Charaoui-Boukerzaza, S. (2009) Catabolism of raffinose, sucrose, and melibiose in

Erwinia chrysanthemi 3937. J. Bacteriol. 191: 6960-6967.

Jahreis, K., Bentler, L., Bockmann, J., Hans, S., Meyer, A., Siepelmeyer, J., y Lengeler, JW. (2002) Adaptation of sucrose metabolism in the *Escherichia coli* wild type strain EC3132. J. Bacteriol. 184: 5307-5316.

Jankovic, I., y Bruckner, R. (2007) Carbon catabolite repression of sucrose utilization in *Staphylococcus xylosum*: Catabolite control protein CcpA ensures glucose preference and autoregulatory limitation of sucrose utilization. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 12: 114-120.

Jantama, K., Haupt, MJ., Svoronos, SA., Zhang, X., Moore, JC. Shanmugam, KT., y Ingram, LO. (2008a) Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate. Biotechnol. Bioeng. 99: 1140-1153.

Jantama, K., Zhang, X., Moore, J. C., Shanmugam, K. T., Svoronos, S. A., y Ingram, L. O. (2008b) Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C, Biotechnol. Bioeng. 101, 881-893.

Jiang, L., Cai, J., Wang, J., Liang, S., Xu, Z. y Yang, ST. (2010) Phosphoenolpyruvate-dependent phosphorylation of sucrose by clostridium tyrobutyricum ZJU 8235: evidence for the phosphotransferase transport system. Bioresour. Technol. 101: 304-9.

Lee, J., Mitchell, WJ., Tangney, M., y Blaschek, HP (2005) Evidence for the presence of an alternative glucose transport system in clostridium beijerinckii NCIMB 8052 and the solvent-hyperproducing mutant BA101. Appl. Environ. Microbiol. 71: 3384-3387.

Lee, J. W., Choi, S., Park, J. H., Vickers, C. E., Nielsen, L. K., y Lee, S. Y. (2010a) Development of sucrose-utilizing *Escherichia coli* K-12 strain by cloning beta-fructofuranosidases and its application for L-threonine production, Appl Microbiol Biotechnol 88, 905-913.

Lee, JW., Choi, S., Kim, JM., y Lee, SY. (2010 b) Mannheimia succiniproducens phosphotransferase system for sucrose utilization. 76: 1699-1703.

Moon, M-W., Kim, H-J., Oh, T-K., Shin, C-S., Lee, J-S., Kim, S-J., y Lee, J-K. (2005) Analyses of enzyme II gene mutants for sugar transport and heterologous expression of fructokinase gene in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. FEMS Microbiol. Lett. 244: 259-266.

Neidhardt, F. C., y Curtiss, R. (1996) *Escherichia coli* and Salmonella: cellular and molecular biology, 2nd ed., ASM Press, Washington, D.C.

Reid, SJ., y Abratt, VR. (2005) Sucrose utilization in bacteria: genetic organization and regulation. 67: 312-321.

Reizer, J., Bachem, S., Reizer, A., Arnaud, M., Saier Jr., MH., y Stulke, J. (1999) Novel phosphotransferase system genes revealed by genome analysis - the complete complements of PTS proteins encoded within the genome of *Bacillus subtilis*. Microbiology 145: 3419-3429.

Scholten, E., Renz, T, y Thomas, J. (2009) Continuous cultivation approach for fermentative succinic acid production from crude glycerol by *Basfia succiniciproducens* DD1. Biotechnol Lett 31:1947-1951.

Shukla, VB, Zhou, S., Yomano, LP., Shanmugam, KT, Preston, JF., Ingram, LO. (2004) Production of D(-)-lactate from sucrose and molasses. Biotechnol. Lett. 26: 689-693.

Tanaka, Y. Okai, N., Termoto, H., Inui, M., y Yukawa, H. (2008) Regulation of the expression of phosphoenolpyruvate: Carbohydrate phosphotransferase system (PTS) genes in *Corynebacterium glutamicum* R. Microbiol. 154: 264-274.

Tangney, M., Yazdarian, M., y Mitchell, WJ. (1998) Sucrose transport and metabolism in *Clostridium beijerinckii*. J. Appl. Microbiol. 84: 914-9.

Tangney, M. y Mitchell WJ (2002) Analysis of a catabolic operon for sucrose transport and metabolism in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2: 71-80.

Trindale, MI., Abratt, VR., y Reid, SJ. (2003) Induction of sucrose utilization genes from *bifidobacterium lactis* by sucrose and raffinose. Appl. Environ. Microbiol. 69: 24-32.

Wang, J., Zhu, J., Bennett, G. N. y San, K-Y. (2011) Succinate production from different carbon sources under anaerobic conditions by metabolic engineered *Escherichia coli* strains. Metab. Eng. 13: 328-335.

Yi, J., Draths, KM., Li, K., y Frost JW. (2003) Altered glucose transport and shikimate pathway product yields in *E. coli*. Biotechnol. Prog. 19: 1450-1459.

Zhang, X. Jantama, K., Moore JC, Jarboe, LR., Shanmugam, KT., y Ingram, O. (2009a) Metabolic evolution of energy-conserving pathway for succinate production of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106: 20180-20185.

Zhang, X., Jantama, K., Shanmugam, K. T., Ingram, L. O. (2009b) "Re-engineering *Escherichia coli* for succinate production in mineral salts medium." App Environ Microbiol 75: 7807-7813.

55

Tabla 1 Cebadores utilizados en la PCR		
SEQ ID NO.	Cebador N.º	Secuencia del cebador (5' a '3')
SEQ ID NO. 1	SD032	taaattcctctgtcaggccggaataactccctataatgcccaccact aggcgttggattagcgatt
SEQ ID NO. 2	SD033	ctcaggagaaccccgctgaccggcgcggtgttgcggtgtccggtgc gatccggtgtccacgatatt
SEQ ID NO. 3	SD034	ttagtatgccaccaggaagt cebadores en la inserción flanqueante de <i>rnc</i> (tiene 1 falta de coincidencia con la secuencia de KJ122)

Tabla 1 Cebadores utilizados en la PCR		
SEQ ID NO.	Cebador N.º	Secuencia del cebador (5' a '3)
SEQ ID NO. 4	SD035	atgctcaaagaattaactt cebadores en la inserción flanqueante de <i>rnc</i> (tiene 1 falta de coincidencia con la secuencia de KJ122)
SEQ ID NO. 5	SD036	cagtttctcgcaattcg cebador interno a <i>cscB</i>
SEQ ID NO. 6	SD037	gacacgctcgcctaaggat cebador interno a <i>cscA</i>
SEQ ID NO. 7	SD038	tggaaagtctgtggataaatcgggaaaatctgtgagaaacagaagatct gagcgactgtaccagaacatga
SEQ ID NO. 8	SD039	agatcctgcaaacgatcgggaccgcatagcctaaactcgcaag tcgccgtaatgggcttga
SEQ ID NO. 9	BY83	ttacctagagagggtgagaattgccgaacat
SEQ ID NO. 10	BY84	gatgagagaagatttcagcctgatacagatt
SEQ ID NO. 11	BY107	gggtctagaatagtgagggaataataatggaaattcaaaacaaag
SEQ ID NO. 12	BY108	cgcgatcctgtctgcaatataatattcccactatcagca
SEQ ID NO. 13	pMH17F	Plásmido clon de la región <i>thrV</i> , resistencia a espectinomicina
SEQ ID NO. 14	pRY802F	Gen de sacarosa fosforilasa de la cepa DSM 20193 de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> dirigido por un promotor constitutivo, para la integración en el locus <i>thrV</i>
SEQ ID NO. 15	pRY803F	Casete <i>cat-sacB</i> para la integración en el locus <i>thrV</i>

Tabla 2. Ejemplos de fermentación					
Cepa	Fuente de carbono	Título de succinato g/l	Rendimiento de succinato g/g	Título de fructosa g/l	Tiempo
SD14	Sacarosa 98 g/l discontinua	83,1	0,85	1,80	45 h
KJ122	Glucosa 106 g/l semicontinua	82,6	0,86	0	48 h

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Myriant Corporation
Dole, Sudhanshu
Yocum, R. Rogers
Hermann, Theron
Yu, Xiaohui
- 10 <120> Método de producción de ácido succínico y otros productos químicos utilizando una materia prima que contiene sacarosa.
<130> MT2011-05PCT
<150> US 61/459.446
- 15 <151> 13-12-2010
<160> 15
<170> PatentIn versión 3.5
- 20 <210> SEQ ID NO. 1
<211> 71
<212> ADN
<213> ADN sintético
<220> Característica: Cebador de PCR SD032
<400> Secuencia
- 25

	taaatttctt cttgtcaggc cggaataact ccctataatg cgccaccact aggcgtttgg	60
	attaggcgat t	71
5	<210> SEQ ID NO. 2 <211> 73 <212> ADN <213> ADN sintético <220> Característica: Cebador de PCR SD033 <400> Secuencia	
	ctcaggagaa ccccgctgac cggcgggcgt gtttgccggt gttecggtgc gatccggtgt	60
10	tccacctgat att	73
15	<210> SEQ ID NO. 3 <211> 20 <212> ADN <213> ADN sintético <220> Característica: Cebador de PCR SD034 <400> Secuencia ttagtatgcc accaggaagt 20	
20	<210> SEQ ID NO. 4 <211> 20 <212> ADN <213> ADN sintético <220> Característica: Cebador de PCR SD035 <400> Secuencia atgctcaaag aatataact 20	
25	<210> SEQ ID NO. 5 <211> 20 <212> ADN <213> ADN sintético <220> Característica: Cebador de PCR SD036 <400> Secuencia cagttttctt cgcaattcg 20	
30	<210> SEQ ID NO. 6 <211> 20 <212> ADN <213> ADN sintético <220> Característica: Cebador de PCR SD037 <400> Secuencia gacaogctcg ccctaaggat 20	
35	<210> SEQ ID NO.7 <211> 72 <212> ADN <213> ADN sintético <220> Característica: Cebador de PCR SD038 <400> Secuencia	
40	tggaagtc tgtggataaa tcgggaaaat ctgtgagaaa cagaagatct gagcgactgt	60
45	accagaacat ga	72
50	<210> SEQ ID NO. 8 <211> 69 <212> ADN <213> ADN sintético <220> Característica: Cebador de PCR SD039 <400> Secuencia	
55		

ES 2 686 301 T3

agatcctgca aaacgatcgg gaccgcggat catagcctaa actgcgcaag tgcgccgtaat 60
gggctttga 69
 <210> SEQ ID NO. 9
 <211> 31
 5 <212> ADN
 <213> ADN sintético
 <220> Característica: Cebador de PCR BY83
 <400> Secuencia
 ttacctagag aggtgagaa ttgccgaaca t 31
 10 <210> SEQ ID NO. 10
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> ADN sintético
 <220> Característica: Cebador de PCR BY84
 15 <400> Secuencia
 gatgagagaa gatttcagc ctgatacaga tt 32
 <210> SEQ ID NO. 11
 <211> 45
 <212> ADN
 20 <213> ADN sintético
 <220> Característica: Cebador de PCR BY107
 <400> Secuencia
 gggctagaa tagtgagga ataataatgg aaattcaaaa caaag 45
 25 <210> SEQ ID NO. 12
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> ADN sintético
 <220> Característica: Cebador de PCR BY108
 <400> Secuencia
 30 ccggatcct tctctgcaa tataatatt cccactatca gca 43
 <210> SEQ ID NO. 13
 <211> 5772
 <212> ADN
 <213> ADN plasmídico pMH17F
 35 <220> Característica: Clon plasmídico de la región thrV, resistencia a espectinomicina
 <400> Secuencia

ES 2 686 301 T3

gttgacagta agacgggtaa gcctgttgat gataccgctg ccttactggg tgcattagcc 60
 agtctgaatg acctgtcacg ggataatccg aagtggtcag actggaaaat cagagggcag 120
 gaactgctga acagcaaaaa gtcagatagc accacatagc agaccgcca taaaacgcc 180
 tgagaagccc gtgacgggct tttcttgat tatgggtagt ttccttgcat gaatccataa 240
 aaggcgctg tagtgccatt taccgccatt cactgccaga gccgtgagcg cagcgaactg 300
 aatgtcacga aaaagacagc gactcaggtg cctgatggtc ggagacaaaa ggaatattca 360
 gcgatttgcg cgagcttgcg aggggtgctac ttaagccttt agggttttaa ggtctgtttt 420
 gtagaggagc aacagcgctt tgcgacatcc ttttgtaata ctgoggaact gactaaagta 480
 gtgagttata cacagggctg ggatctattc tttttatctt tttttattct ttctttattc 540
 tataaattat aaccacttga atataaaca aaaaaacaca caaaggtcta gcggaattta 600
 cagagggctc agcagaattt acaagttttc cagcaaaggt ctagcagaat ttacagatac 660
 ccacaactca aaggaaaag actagtaatt atcattgact agcccatctc aattggtata 720
 gtgattaana tcacctagac caattgagat gtatgtctga attagttggt ttcaaagcaa 780
 atgaactagc gattagtgcg tatgacttaa cggagcatga aaccaagcta attttatgct 840
 gtgtggcact actcaacccc acgattgaaa acctacaag gaaagaacgg acggtatcgt 900
 tcaattataa ccaatacgtc cagatgatga acatcagtag ggaaaatgct tatggtgtat 960
 tagctaaagc aaccagagag ctgatgacga gaactgtgga aatcaggaat cctttggtta 1020
 aaggctttga gatthccag tggacaaact atgccaagtt ctcaagcga aaattagaat 1080
 tagthtttag tgaagagata ttgcottatc thttccagtt aaaaaattc ataaaatata 1140
 atctggaaca tgttaagtct thtgaaaaca aatactctat gaggatttat gagtggttat 1200
 taaaagaact aacacaaaag aaaactcaca aggcaaatat agagattagc cttgatgaat 1260
 ttaagttcat gttaatgctt gaaaataact accatgagtt taaaaggctt aaccaatggg 1320
 thttgaaacc aataagtaa gatttaaca cttacagcaa tatgaaattg gtggttgata 1380
 agcgaggcgg cccgactgat acgttgattt tccaagttga actagataga caaatggatc 1440

ES 2 686 301 T3

tcgtaaccga	acttgagaac	aaccagataa	aatgaatgg	tgacaaaata	ccaacaacca	1500
ttacatcaga	ttcctaccta	cgtaacggac	taagaaaaac	actacacgat	gctttaactg	1560
caaaaattca	gctcaccagt	tttgaggcaa	aatttttgag	tgacatgcaa	agtaagcatg	1620
atctcaatgg	ttcgttctca	tggtcacgc	aaaaacaacg	aaccacacta	gagaacatac	1680
tggttaaata	cggaaggatc	tgaggttctt	atggctcttg	tatctatcag	tgaagcatca	1740
agactaacia	acaaaagtag	aacaactggt	caccgtaga	tatcaaaggg	aaaactgtcc	1800
atatgcacag	atgaaaacgg	tgtaaaaaag	atagatacat	cagagctttt	acgagttttt	1860
ggtgcattta	aagctgttca	ccatgaacag	atcgacaatg	taacagatga	acagcatgta	1920
acacctaata	gaacaggtga	aaccagtaaa	acaaagcaac	tagaacatga	aattgaacac	1980
ctgagacaac	ttgttacagc	tcaacagtca	cacatagaca	gcctgaaaca	ggcgtgctg	2040
cttatcgaat	caaagctgcc	gacaacacgg	gagccagtga	cgctcccgt	ggggaaaaaa	2100
tcatggcaat	tctggaagaa	atagcgcttt	cagccggcaa	acctgaagcc	ggatctgcga	2160
ttctgataac	aaactagcaa	caccagaaca	gcccgtttgc	gggcagcaaa	accggttatg	2220
cttgtaaacc	gttttgtgaa	aaaattttta	aaataaaaaa	ggggacctct	agggtcccca	2280
attaattagt	aatataatct	attaaaggtc	attcaaaagg	tcatccaccg	gatcaattcc	2340
cctgctcgcg	caggctgggt	gccaagctct	cgggtaacat	caaggcccga	tccttgagac	2400
ccttgccctc	cgcacgatg	atcgtgccgt	gatcgaaatc	cagatccttg	accgcagtt	2460
gcaaaccctc	actgatccgc	atgccggttc	catacagaag	ctgggcgaac	aaacgatgct	2520
cgcttccag	aaaaccgagg	atgcgaacca	cttcatccgg	ggtcagcacc	accggcaagc	2580
gccgcgacgg	ccgaggtctt	ccgatctcct	gaagccaggg	cagatccgtg	cacagcacct	2640
tgcogtagaa	gaacagcaag	gocgccaatg	cctgacgatg	ogtggagacc	gaaaccttgc	2700
gctcgttcgc	cagccaggac	agaaatgcct	cgacttcgct	gctgcccaag	gttgccgggt	2760
gacgcacacc	gtggaaacgg	atgaaggcac	gaaccagtg	gacataagcc	tgttcggttc	2820
gtaagctgta	atgcaagtag	cgtatgcgct	cacgcaactg	gtccagaacc	ttgaccgaac	2880
gcagcggtag	taaccggcga	gtggcggttt	tcatggcttg	ttatgactgt	ttttttgggg	2940
tacagtctat	gctcgggca	tccaagcagc	aagcgcgtta	cgccgtgggt	cgatgtttga	3000
tgttatggag	cagcaacgat	gttacgcagc	agggcagtcg	ccctaaaaca	aagttaaaca	3060
tcatgagggg	agcgtgatc	gocgaagtat	cgactcaact	atcagaggta	gttgccgtca	3120
tcgagcgcca	tctcgaaccg	acgttgctgg	cgctacattt	gtacggctcc	gcagtggatg	3180
goggcctgaa	gccacacagt	gatattgatt	tgctggttac	ggtgaccgta	aggcttgatg	3240
aaacaacgcg	gcgagctttg	atcaacgacc	ttttggaac	ttcggcttcc	cctggagaga	3300

ES 2 686 301 T3

gcgagattct cgcgcctgta gaagtcacca ttgttgtgca cgacgacatc attccgtggc 3360
 gttatccagc taagcgcgaa ctgcaatttg gagaatggca gcgcaatgac attcttgacg 3420
 gtatcttcga gccagccacg atcgacattg atctggctat cttgctgaca aaagcaagag 3480
 aacatagcgt tgccttggtg ggtccagcgg cggaggaact ctttgatccg gttcctgaac 3540
 aggatctatt tgaggcgcta aatgaaacct taacgctatg gaactcgccg cccgactggg 3600
 ctggcgatga gcgaaatgta gtgcttacgt tgtcccgcac ttggtacagc gcagtaaccg 3660
 gcaaaatcgc gccgaaggat gtcgctgccc actgggcaat ggagcgcctg cgggccagc 3720
 atcagcccgt catacttgaa gctagacagg cttatcttgg acaagaagaa gatcgcttgg 3780
 cctcgcgccg agatcagttg gaagaatttg tccactacgt gaaaggcgag atcaccaagg 3840
 tagtcggcaa ataatgtcta acaattcgtt caagccgacg ccgcttcgcg gcgcggtta 3900
 actcaagcgt tagatgcact aagcacataa ttgctcacag ccaaactatc aggtcaagtc 3960
 tgcttttatt attttaagc gtgcataata agccctacac aaattgggag atatatcatg 4020
 aaaggctggc tttttcttgt tatcgcaata gttggcgaag taatcgcaac atccgatta 4080
 aaatctagcg agggctttac taagctgacg cgggtggatga ccttttgaat gacctttaat 4140
 agattatatt actaattaat tggggaccct agaggtcccc ttttttattt taaaaatttt 4200
 ttcacaaaac ggtttacaag catacgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacag 4260
 tttcccgact ggaaagcggg cagtggagcg aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat 4320
 taggcacccc aggctttaca ctttatgctt cgggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagt 4380
 tacctagaga gggtgagaat tgccgaacat gcgcataagt ttcccgaca gatttcaggt 4440
 ggtcagcagc aacgcgttgc cattgcgcgt tcgctgtgta tgaagccgaa aattatgttg 4500
 tttgatgagc caacgtcggc gctcgatcct gagatggtga aagaggtgct ggatacgatg 4560
 attgggctgg cgcagtcggg tatgacaatg ttgtgtgtaa cacatgagat ggggtttgca 4620
 cgaaccgtcg ctgaccgggt aatttttatg gatcgtgggg aaatagtgga gcaagctgca 4680
 cctgatgaat tttttgcgca tcctaaatca gagcgtacga gggcattttt atcgcaggtg 4740
 atocattaat tgaatgtag ttcgaaaagc aaaaggcca tcctttogga tggcctttcg 4800
 cttgatttga tgtctggcag tttatggcgg gcgctcctgc cgcaccctc cgggcccgtg 4860
 cttcgcaacg ttcaaatccg ctcccggcgg atttgtccta ctgggagag tgttcaccga 4920
 caaacaacag ataaaacaaa aggccagtc ttccgactga gccttttgtt ttatttgatg 4980
 totggcagtt cctactctc gcatggggag accccacact accatggcg ctacggcggt 5040
 ttcacttctg agttcggcat ggggtcaggt gggaccaccg cgctaactgcc gccagacaaa 5100
 ttcttttcta atctgccgaa ctttaacctg aaaagtgggt ctgataccca gagtgcgaact 5160
 ggggacctca cccttaccga ggggtgcgctc taccaactga gccatatcag cacgctaaat 5220

ES 2 686 301 T3

ttgatgctg gcagttccct actctogcat ggggagaccc cacactacca tcggcgctac 5280
 ggcgtttcac ttctgagttc ggcatggggt cagggtggac caccgcgcta cggccgccag 5340
 gcaaattctg ttttatcaga ccgcttctgc gttctgattt aatctgtatc aggctgaaaa 5400
 tcttctctca tccggataac aatttcacac aggaaacagc tatgaccatg attacgccaa 5460
 gctgtaccga gctogaattc actggccgtc gttttacaac gtcgtgactg ggaaaaacct 5520
 ggcgttacc aacttaatcg ccttgcagca catccccctt tcgccagctg gcgtaatagc 5580
 gaagaggccc gcaccgatcg cccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg cgaatggcgc 5640
 ctgatgcggt attttctcct tacgcatctg tgcggtattt cacaccgat atggtgact 5700
 ctcagtacaa tctgctctga tgccgatag ttaagccagc cccgacacc gccaacacc 5760
 gctgacgaat tc 5772

<210> SEQ ID NO. 14

<211> 7558

<212> ADN

<213> ADN plasmídico pRY802F

<220> Característica: gen de sacarosa fosforilasa de la cepa DSM 20913 de *Leuconostoc mesenteroides* dirigida por el promotor constitutivo para la integración en el locus thrV.

<400> Secuencia

gttgacagta agacgggtaa gcctgttgat gataccgctg cttactggg tgcattagcc 60
 agtctgaatg acctgtcacg ggataatccg aagtggtcag actggaaaat cagagggcag 120
 gaactgctga acagcaaaaa gtcagatagc accacatagc agacccgcca taaaacgccc 180
 tgagaagccc gtgacgggct tttcttgtat tatgggtagt ttoccttgcac gaatccataa 240
 aaggcgctg tagtgccatt taccoccat cactgccaga gccgtgagcg cagcgaactg 300
 aatgtcacga aaaagacagc gactcaggtg cctgatggtc ggagacaaaa ggaatattca 360
 gcgatttgcc cgagcttgcg agggtgctac ttaagccttt agggttttaa ggtctgtttt 420
 gtagaggagc aaacagcggt tgcgacatcc ttttgaata ctgcggaact gactaaagta 480
 gtgagttata cacagggctg ggatctattc tttttatctt tttttattct ttctttattc 540
 tataaattat aaccaactga atataaaca aaaaaacaca caaaggtcta gcggaattta 600
 cagagggctc agcagaattt acaagttttc cagcaaaggt ctagcagaat ttacagatac 660
 ccacaactca aaggaaaagg actagtaatt atcattgact agcccatctc aattggtata 720
 gtgattaataa tcacctagac caattgagat gtatgtctga attagttgtt ttcaaagcaa 780
 atgaactagc gattagtcgc tatgacttaa cggagcatga aaccaagcta attttatgct 840
 gtgtggcact actcaacccc acgattgaaa accctacaag gaaagaacgg acggtatcgt 900
 tcacttataa ccaatagct cagatgatga acatcagtag ggaaaatgct tatggtgtat 960
 tagctaaagc aaccagagag ctgatgacga gaactgtgga aatcaggaat cctttggtta 1020

ES 2 686 301 T3

aaggctttga gattttccag tggacaaact atgccaagtt ctcaagcgaa aaattagaat 1080
tagtttttag tgaagagata ttgccttata ttttccagtt aaaaaattc ataaaatata 1140
atctggaaca tgtaagtct tttgaaaaca aatactctat gaggattat gagtggttat 1200
taaaagaact aacacaaaag aaaactcaca aggcaaatat agagattagc cttgatgaat 1260
ttaagttcat gtaaatgctt gaaaataact accatgagtt taaaaggctt aaccaatggg 1320
ttttgaaacc aataagtaaa gatttaaaca cttacagcaa tatgaaattg gtggttgata 1380
agcgaggccg ccgactgat acgttgattt tccaagttga actagataga caaatggatc 1440
tcgtaaccga acttgagaac aaccagataa aatgaatgg tgacaaaata ccaacaacca 1500
ttacatcaga ttctaccta cgtaacggac taagaaaaac actacacgat gctttaactg 1560
caaaaattca gctcaccagt tttgaggcaa aatttttgag tgacatgcaa agtaagcatg 1620
atctcaatgg ttcgttctca tggctcacgc aaaaacaacg aaccacacta gagaacatac 1680
tggctaaata cggaaggatc tgaggttctt atggctcttg tatctatcag tgaagcatca 1740
agactaacia acaaaagtag aacaactggt caccgtaga tatcaaaggg aaaactgtcc 1800
atatgcacag atgaaaacgg tgtaaaaaag atagatacat cagagctttt acgagttttt 1860
ggtgcattta aagctgttca ccatgaacag atcgacaatg taacagatga acagcatgta 1920
acacctataa gaacaggtga aaccagtaaa acaaagcaac tagaacatga aattgaacac 1980
ctgagacaac ttgttacagc tcaacagtca cacatagaca gcctgaaaca ggcatgctg 2040
cttatogaat caaagctgcc gacaacacgg gagccagtga cgcctccgtt ggggaaaaaa 2100
tcatggcaat tctggaagaa atagcgcttt cagccggcaa acctgaagcc ggatctgcga 2160
ttctgataac aaactagcaa caccagaaca gcccgtttgc gggcagcaaa acccgttatg 2220
cttgtaaacc gttttgtgaa aaaattttta aaataaaaaa ggggacctct agggccccca 2280
attaattagt aatataatct attaaaggtc attcaaaagg tcatccaccg gatcaattcc 2340
cctgctcgcg caggctgggt gccaaagctct cgggtaacat caaggccoga tccttgagc 2400
ccttgccctc ccgcaogatg atcgtgcogt gatogaaatc cagatccttg accgcagtt 2460
gcaaaccctc actgatccgc atgcccgttc catacagaag ctgggcgaac aaacgatgct 2520
cgccttccag aaaaccgagc atgcgaacca ctcatccgg ggtcagcacc accggcaagc 2580
gccgcgacgg ccgaggtctt ccgatctcct gaagccaggc cagatccgtg cacagcacct 2640
tgccgtagaa gaacagcaag gccgccaatg octgacgatg cgtggagacc gaaaccttgc 2700
gctcgttcgc cagccaggac agaaatgcct cgacttcgct gctgcccaag gttgccgggt 2760
gacgcacacc gtggaaacgg atgaaggcac gaaccagtg gacataagcc tgttcggttc 2820
gtaagctgta atgcaagtag cgtatgcgct cagcgaactg gtccagaacc ttgaccgaac 2880

ES 2 686 301 T3

gcagcggtag taacggcgca gtggcggttt tcatggcttg ttatgactgt ttttttgggg 2940
tacagtctat gctcgggca tccaagcagc aagcgggta cgccgtgggt cgatgtttga 3000
tgttatggag cagcaacgat gttacgcagc agggcagtcg ccctaaaaca aagttaaaca 3060
tcatgagggga agcggtgatc gccgaagtat cgactcaact atcagaggta gttggcgtca 3120
tcgagcgcca tctcgaaccg acgttgctgg cgttacattt gtacggctcc gcagtggatg 3180
gcggcctgaa gccacacagt gatattgatt tgctggttac ggtgaccgta aggcttgatg 3240
aaacaacgcg gcgagctttg atcaacgacc ttttgaaaac ttcggcttcc cctggagaga 3300
gcgagattct ccgcctgta gaagtcacca ttgttggtca cgacgacatc attccgtggc 3360
gttatccagc taagcgcgaa ctgcaatttg gagaatggca gcgcaatgac attcttgcat 3420
gtatcttcga gccagccaag atcgacattg atctggctat cttgctgaca aaagcaagag 3480
aacatagcgt tgccttggtg ggtccagcgg cggaggaact cttgatccg gttcctgaac 3540
aggatctatt tgaggcgcta aatgaaacct taacgctatg gaactcgcg cccgactggg 3600
ctggcgatga gcgaaatgta gtgcttacgt tgtcccgcac ttggtacagc gcagtaaccg 3660
gcaaaatcgc gccgaaggat gtcgctgccg actgggcaat ggagcgcctg ccggcccagt 3720
atcagcccgt catacttgaa gctagacagg cttatcttgg acaagaagaa gatcgttgg 3780
cctcgcgcgc agatcagttg gaagaatttg tccactacgt gaaaggcgag atcaccaagg 3840
tagtcggcaa ataatgtcta acaattcgtt caagccgacg ccgcttcgcg gcgcggetta 3900
actcaagcgt tagatgcaact aagcacataa ttgctcacag ccaaactatc aggtcaagtc 3960
tgcttttatt atttttaagc gtgcataata agccctacac aaattgggag atatatcatg 4020
aaaggctggc tttttcttgt tatcgcaata gttggcgaag taatcgcaac atccgcatta 4080
aaatctagcg agggctttac taagctgatc cggtgatga ctttttgaat gacctttaat 4140
agattatatt actaattaat tggggaccct agaggtcccc ttttttattt taaaaatttt 4200
ttcacaaaac ggtttacaag catacgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg 4260
tttcccact ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta atgtgagta gctcactcat 4320
taggcacccc aggctttaca ctttatgctt ccggctcgta tggtgtgtgg aattgtgagt 4380
taoctagaga gggtgagaat tgccgaacat gcgcataagt ttcccgaca gatttcaggt 4440
ggtcagcagc aacgcgttgc cattgcgctg tcgctgtgta tgaagccgaa aattatggtg 4500
tttgatgagc caacgtcggc gctcgatcct gagatggtga aagaggtgct ggatacgatg 4560
attgggctgg cgcagtcggg tatgacaatg ttgtgtgtaa cacatgagat ggggtttgca 4620
cgaaccgtcg ctgaccgggt aatttttatg gatcgtgggg aatatgtgga gcaagctgca 4680
cctgatgaat tttttgcgca tccataatca gagcgtacga gggcattttt atcgcaggta 4740
atccattaat tgaatgtag ttcgaaaagc aaaaaggcca tcctttcgga tggcctttcg 4800

ES 2 686 301 T3

cttgatttga tgtctggcag tttatggcgg gcgtcctgcc cggccaccctc cgggccgttg 4860
 cttcgcaacg ttcaaatccg togaggctat tgaogacagc tatggttcac tgtccaccaa 4920
 ccaaaactgt gctcagtacc gccaatatth ctccttgag ggttacaag aggtgtccct 4980
 agaagagatc cacgctgtgt aaaaatttta caaaaaggta ttgactttcc ctacagggtg 5040
 tgtaataatt taattacagg cgggggcaac cccgcctgtt ctagaatagt ggaggaataa 5100
 taatggaaat tcaaaacaaa gcaatgttga tcaactatgc tgattcgttg ggcaaaaact 5160
 taaaagatgt tcatcaagtc ttgaaagaag atattggaga tgcgattggt ggggttcatt 5220
 tgttgccttt cttcccttca acaggtgatc gcggttttgc gccagccgat tatactcgtg 5280
 ttgatgccgc atttggatgat tgggcagatg tcaagcatt ggtgaagaa tactatttga 5340
 tgtttgactt catgattaac catatthctc gtgaatcagt gatgtatcaa gattttaaga 5400
 agaatcatga cgattcaaag tataaagatt tctttattcg ttgggaaaag ttctgggcaa 5460
 aggccggcga aaaccgtcca acacaagccg atgttgactt aatttacaag cgtaaagata 5520
 aggcaccaac gcaagaaatc acttttgatg atggcacaac agaaaacttg tgaataactt 5580
 ttggtgaaga acaaattgac attgatgta attcagccat tgccaaggaa tttattaaga 5640
 caacccttga agacatggta aaacatggtg ctaacttgat tcgtttgat gcctttgcgt 5700
 atgcagttaa aaaagttgac acaaatgact tcttcgttga gccagaaatc tgggacactt 5760
 tgaatgaagt acgtgaaatt ttgacacat taaaggctga aattttacca gaaattcatg 5820
 aacattactc aatccctaaa aagatcaatg atcatggta cttcacctat gactttgcat 5880
 taccaatgac aacgctttac acattgtatt caggtaagac aaatcaattg gcaaagtgtg 5940
 tgaagatgtc accaatgaag caattcacia cattggacac gcatgatggt attggtgtcg 6000
 ttgatgcccg tgatattcta actgatgatg aaattgacta cgttctgaa caactttaca 6060
 aggttggcgc gaatgtcaaa aagacatatt catctgcttc atacaacaac cttgatattt 6120
 accaaattaa ctcaacttat tattcagcat tgggaaatga tgatgcagca tacttgttga 6180
 gtcgtgtcct ccaagtcttt ggcctggaa ttccacaaat ttattacgtt ggtttgttg 6240
 caggtgaaaa cgatctcgcg cttttggagt caactaaaga aggtcgtaat attaaccgtc 6300
 attactatac gogtgaagaa gtttaagtcag aagtttaagc accagttggt gctaacttat 6360
 tgaagctatt gtcatggcgt aatgaaagcc ctgcatttga tttggctggc tcaatcacag 6420
 ttgacacgcc aactgatata acaattgtgg tgacacgtca agatgaaaat ggtcaaaaca 6480
 aagctgtatt aacagccgat gggccaaca aaacttttga aatcgttgag aatggtcaaa 6540
 ctgttatgag cagtataat ttgactcaga actaaactat atttgaatca atttctaaga 6600
 actgtttcct gagggaaagca gtttttttgc tgatagtggg aaatattata ttgacagaca 6660

ES 2 686 301 T3

aggatcctcc cggoggattt gtccactcog ggagagtgtt caccgacaaa caacagataa 6720
 aacaaaaggc ccagtcctcc gactgagcct tttgttttat ttgatgtctg gcagttccct 6780
 actctcgcat ggggagaccc cacactacca tgggcgctac gggcggttca cttctgagtt 6840
 cggcatgggg tcaggtggga ccaccgcgct actgcccgca gacaaattct tttctaactc 6900
 gccgaacttt aacctaaaaa gtggtgctga taccagaggt cgaactgggg acctcaccct 6960
 taccaagggc gcgctctacc aactgagcca taccagcagc ctaaatttga tgccctggcag 7020
 ttccctactc tcgcatgggg agaccccaca ctaccatogg ogctacggcg tttcacttct 7080
 gagttcggca tggggtcagg tgggaccacc gcgctacggc cggcaggcaa attctgtttt 7140
 atcagaccgc ttctgogttc tgatttaatc tgtatcaggc tgaaaatctt ctctcatccg 7200
 gataacaatt tcacacagga aacagctatg accatgatta cgccaagctg taccgagctc 7260
 gaattcactg gcgctcgttt tacaacgctg tgactgggaa aaccctggcg ttaccaact 7320
 taatgcctt gcagcacatc cccctttcgc cagctggcgt aatagcgaag aggcccgcac 7380
 cgatcgccct tcccaacagt tgcgcagcct gaatggcgaa tggcgcctga tgcggtattt 7440
 tctccttacg catctgtgcg gtatttcaca ccgcatatgg tgcactctca gtacaatctg 7500
 ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg acaccgcgca acaccgcgctg acgaattc 7558

<210> SEQ ID NO. 15

<211> 8998

5 <212> ADN

<213> ADN plasmídico pRY803F

<220> Característica: casete cat-sacB para la integración en el locus teh thrV

<400> Secuencia

<221> misc_feature

10 <222> (5979)..(5979)

<223> n es a, c, g o t

<400> Secuencia

gttgacagta agacgggtaa gcctgttgat gataccgctg ccttactggg tgcattagcc 60
 agtctgaatg acctgtcagc ggataatccg aagtggtcag actggaaat cagagggcag 120
 gaactgctga acagcaaaaa gtcagatagc accacatagc agaccgcgca taaaacgccc 180
 tgagaagccc gtgacgggct tttcttgtat tatgggtagt ttcccttgcag gaatccataa 240
 aaggcgctg tagtgccatt taacccatt cactgocaga gccgtgagcg cagcgaactg 300
 aatgtcacga aaaagacagc gactcaggtg cctgatggc ggagacaaaa ggaatattca 360
 gcgatttgcc cgagcttgcg aggggtgctac ttaagccttt agggttttaa ggtctgtttt 420
 gtagaggagc aacagcgtt tgcgacatcc ttttgaata ctgcggaact gactaaagta 480
 gtgagttata cacagggctg ggatctatc tttttatctt tttttattct ttctttattc 540
 tataaattat aaccacttga atataaaca aaaaaacaca caaaggtcta gcggaattta 600
 cagagggctc agcagaattt acaagttttc cagcaaaggt ctagcagaat ttacagatac 660

ES 2 686 301 T3

ccacaactca aaggaaaagg actagtaatt atcattgact agcccatctc aattgggtata 720
 gtgattaanaa tcacctagac caattgagat gtatgtctga attagttggt ttcaaagcaa 780
 atgaactagc gattagtcgc tatgacttaa cggagcatga aaccaagcta attttatgct 840
 gtgtggcaact actcaacccc acgattgaaa accctacaag gaaagaacgg acggtatcgt 900
 tcacttataa ccaatacgcct cagatgatga acatcagtag ggaaaatgct tatgggtgat 960
 tagctaaagc aaccagagag ctgatgacga gaactgtgga aatcaggaat cctttgggta 1020
 aaggctttga gattttccag tggacaaaact atgccaagtt ctcaagcgaa aaattagaat 1080
 tagtttttag tgaagagata ttgccttata ttttccagtt aaaaaattc ataaaatata 1140
 atctggaaca tgtaagtct tttgaaaaca aatactctat gaggatttat gagtggttat 1200
 taaaagaact aacacaaaag aaaactcaca aggcaaata agagattagc cttgatgaat 1260
 ttaagttcat gttaatgctt gaaaataact accatgagtt taaaaggctt aaccaatggg 1320
 ttttgaaacc aataagtaaa gatttaaaca cttacagcaa tatgaaattg gtgggtgata 1380
 agcgaggccg cccgactgat acgttgattt tccaagttga actagataga caaatggatc 1440
 togtaaccga acttgagaac aaccagataa aatgaatgg tgacaaaata ccaacaacca 1500
 ttacatcaga ttctactcta cgtaacggac taagaaaaac actacacgat gctttaactg 1560
 caaaaattca gctcaccagt tttgaggcaa aatttttgag tgacatgcaa agtaagcatg 1620
 atctcaatgg ttctgtctca tggctcagc aaaaacaacg aaccacacta gagaacatac 1680
 tggctaataa cggaaggatc tgaggttctt atggctcttg tatctatcag tgaagcatca 1740
 agactaacia acaaaagtag aacaactggt caccgttaga tatcaaaggg aaaactgtcc 1800
 atatgcacag atgaaaacgg tgtaaaaaag atagatacat cagagctttt acgagttttt 1860
 ggtgcattta aagctgttca ccatgaacag atcgacaatg taacagatga acagcatgta 1920
 acacctataa gaacaggtga aaccagtaaa acaaagcaac tagaacatga aattgaacac 1980
 ctgagacaac ttgttacagc tcaacagtca cacatagaca gcctgaaaca ggcgatgctg 2040
 cttatcgaat caaagctgcc gacaacacgg gagccagtga cgcctcccgt ggggaaaaaa 2100
 tcatggcaat tctggaagaa atagcgcttt cagccggcaa acctgaagcc ggatctgcga 2160
 ttctgataac aaactagcaa caccagaaca gcccgtttgc gggcagcaaa acccgttatg 2220
 cttgtaaacg gttttgtgaa aaaattttta aaataaaaaa ggggacctct agggctccca 2280
 attaattagt aatataatct attaaaggtc attcaaaagg tcatccaccg gatcaattcc 2340
 cctgctogcg caggctgggt gccaaagctct cgggtaacat caaggccoga tccttgagc 2400
 ccttgcoctc cogcaogatg atcgtgcogt gatcgaaatc cagatccttg acccgcagtt 2460
 gcaaacctc actgatccgc atgcccgttc catacagaag ctgggcgaac aaacgatgct 2520

ES 2 686 301 T3

cgccctccag aaaaccgagg atgcgaacca cttcatccgg ggtcagcacc accggcaagc 2580
 gcccgacagg ccgaggtctt cogatctcct gaagccaggg cagatccgtg cacagcacct 2640
 tgccgtagaa gaacagcaag gccgccaatg cctgacgatg cgtggagacc gaaaccttgc 2700
 gctcgttcgc cagccaggac agaaatgcct cgacttcgct gctgcccaag gttgccgggt 2760
 gacgcacacc gtggaaacgg atgaaggcac gaaccagtg gacataagcc tgttcggttc 2820
 gtaagctgta atgcaagtag cgtatgcgct cacgcaactg gtccagaacc ttgaccgaac 2880
 gcagcgggtg taacggcgca gtggcggttt tcatggcttg ttatgactgt ttttttgggg 2940
 tacagtctat gcctcgggca tccaagcagc aagcgcgta ccgcgtgggt cgatgtttga 3000
 tgttatggag cagcaacgat gttacgcagc agggcagtcg cctaataaca aagttaaaca 3060
 tcatgagggg agcgggtgat gccgaagtat cgactcaact atcagaggta gttggcgtca 3120
 tcgagcgcca tctcgaaccg acgttgctgg ccgtacattt gtacggctcc gcagtggatg 3180
 gcggcctgaa gccacacagt gatattgatt tgctggttac ggtgaccgta aggcttgatg 3240
 aaacaacggc gcgagctttg atcaacgacc ttttggaac ttccgcttcc cctggagaga 3300
 gcgagattct ccgcctgta gaagtcacca ttgttggtga cgacgacatc attccgtggc 3360
 gttatocagc taagcgcgaa ctgcaatttg gagaatggca gcgcaatgac attcctgcag 3420
 gtatcttcga gccagccagc atcgacattg atctggctat cttgctgaca aaagcaagag 3480
 aacatagcgt tgccctggta ggtccagcgg cggaggaact ctttgatccg gttcctgaac 3540
 aggatctatt tgaggcgcta aatgaaacct taacgctatg gaactcgcgc cccgactggg 3600
 ctggcgatga gcgaaatgta gtgcttacgt tgtcccgcct ttggtacagc gcagtaaccg 3660
 gcaaaatcgc gccgaaggat gtcgctgcgc actgggcaat ggagcgcctg cccggcccagt 3720
 atcagcccggt catacttgaa gctagacagg cttatcttgg acaagaagaa gatcgccttg 3780
 cctcgcgcgc agatcagttg gaagaatttg tccactacgt gaaaggcgag atcaccaagg 3840
 tagtgggcaa ataatgtcta acaattcgtt caagccgacg ccgcttcgcg gcgcggtta 3900
 actcaagcgt tagatgcact aagcacataa ttgctcacag ccaaactatc aggtcaagtc 3960
 tgcttttatt atttttaagc gtgcataata agccctacac aaattgggag atatatcatg 4020
 aaaggtggc tttttcttgt tatcgcaata gttggcgaag taatcgcaac atccgcatta 4080
 aaatctagcg agggctttac taagctgatc cggtggtatg ccttttgaat gacctttaat 4140
 agattatatt actaattaat tggggaccct agaggctccc ttttttattt taaaaatttt 4200
 ttcacaaaac ggtttacaag catacgttgg ccgattcatt aatgcagctg gcacgcaggg 4260
 tttcccgact ggaaagcggg cagtgagcgc aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat 4320
 taggcacccc aggctttaca ctttatgctt ccggctcgta tgttggtggg aattgtgagt 4380
 tacctagaga gggtgagaat tgccgaacat gcgcataagt ttcccggaca gatttcaggt 4440

ES 2 686 301 T3

ggtoagcagc aacgogttgc cattgocgct tcgctgtgta tgaagccgaa aattatggtg 4500
 tttgatgagc caacgtcggc gctcgatcct gagatggtga aagaggtgct ggatacgatg 4560
 attgggctgg cgcagtcggg tatgacaatg ttgtgtgtaa cacatgagat ggggtttgca 4620
 cgaaccgtcg ctgaccgggt aatTTTTatg gatcgtgggg aaatagtgga gcaagctgca 4680
 cctgatgaat tttttgcgca toctaaatca gagcgtacga gggcattttt atcgcaggtg 4740
 atocattaat tgaatgtag ttcgaaaagc aaaaaggcca toctttcggg tggcctttcg 4800
 cttgatttga tgtctggcag tttatggcgg gcgtcctgcc ogccaccctc ogggcogttg 4860
 cttogcaacg ttcaaatccg ctogaattcc cgcgccgat gaattgatcc gaagttocta 4920
 ttctctagaa agtataggaa cttcgaattg tcgacaagct agcatgtgac ggaagatcac 4980
 ttgcgagaat aaataaatcc tgggtgcctt gttgataccg ggaagccctg ggccaacttt 5040
 tggcgaaaat gagacgttga tcggcacgta agaggtcca actttcacca taatgaata 5100
 agatcactac cgggcgtatt ttttgagtta tcgagatTTT caggagctaa ggaagctaaa 5160
 atggagaaaa aatcactgg atataccacc gttgatatat cccaatggca tcgtaaagaa 5220
 cattttgagg catttcagtc agttgctcaa tgtacctata accagaccgt tcagctggat 5280
 attacggcct ttttaaagac cgtaaagaaa aataagcaca agttttatcc ggcttttatt 5340
 cacattcttg cccgcctgat gaatgctcat ccggaattcc gtatggcaat gaaagacggg 5400
 gagctgggta tatgggatag tgttcacct tgttacaccg ttttccatga gcaaaactgaa 5460
 acgttttcat cgtctggag tgaataccac gacgatttcc ggcagtttct acacatatat 5520
 tcgcaagatg tggcgtgta cggtgaaaac ctggcctatt tocctaaagg gtttattgag 5580
 aatatgtttt tcgtctcagc caatccctgg gtgagtttca ccagttttga tttaaacgtg 5640
 gccaatatgg acaacttctt ogccccggt ttcaccatgg gcaaatatta tacgcaaggc 5700
 gacaaggtgc tgatgccgct ggcgattcag gttcatcatg ccgtttgtga tggcttccat 5760
 gtoggcagaa tgcttaatga attacaacag tactgcgatg agtggcaggg cggggcgtaa 5820
 tttttttaag gcagttattg gtgcccttaa acgocctgtg ctacgcctga ataagtgata 5880
 ataagcggat gaatggcaga aattcgaaag caaattcgac cgggtcgtcg gttcagggca 5940
 gggtcgtaa atagccgctt atgtctattg ctggtttant cggtaaccgg ggatcgcggc 6000
 cgcggaccgg atcccatcac atatacctgc cgttcactat tatttagtga aatgagatat 6060
 tatgatattt tctgaattgt gattaaag gcaactttat goccatgcaa cagaaactat 6120
 aaaaaataca gagaatgaaa agaaacagat agatttttta gttctttagg ccogtagtct 6180
 gcaaatcctt ttatgatttt ctatcaaca aaagaggaaa atagaccagt tgcaatccaa 6240
 acgagagtct aatagaatga ggtcgaaaag taaatcgcgc gggtttgta ctgataaagc 6300

ES 2 686 301 T3

aggcaagacc taaaatgtgt aaagggcaaa gtgtatactt tggcgtcacc ccttacatat 6360
 tttaggtcct tttttattgt gcgtaactaa cttgccatct tcaaacagga gggctggaag 6420
 aagcagaccg ctaacacagt acataaaaaa ggagacatga acgatgaaca tcaaaaagtt 6480
 tgcaaaaaca gcaacagtat taacotttac taccgcactg ctggcaggag ggcgaactca 6540
 agcgtttgcg aaagaaacga accaaaagcc atataaggaa acatacggca tttcccatat 6600
 tacacgccat gatatgctgc aaatccctga acagcaaaaa aatgaaaaat atcaagttcc 6660
 tgaattcgat tcgccacaa ttaaaaatat ctcttctgca aaaggcctgg acgtttggga 6720
 cagctggcca ttacaaaacg ctgacggcac tgtcgcaaac tatcacggct accacatcgt 6780
 ctttgcatta gccggagatc ctaaaaatgc ggatgacaca tcgatttaca tgttctatca 6840
 aaaagtgggc gaaacttcta ttgacagctg gaaaaacgct ggcgcgtct ttaaagacag 6900
 cgacaaattc gatgcaaatg attctatcct aaaagaccaa acacaagaat ggtcaggttc 6960
 agccacattt acatctgacg gaaaaatcog tttattctac actgatttct cgggtaaca 7020
 ttacggcaaa caaacactga caactgcaca agttaacgta tcagcatcag acagctcttt 7080
 gaacatcaac ggtgtagagg attataaatc aatctttgac ggtgacggaa aaacgtatca 7140
 aatgtacag cagttcatcg atgaaggcaa ctacagctca ggcgacaacc atacgctgag 7200
 agatcctcac tacgtagaag ataaaggcca caaataactta gtatttgaag caaacactgg 7260
 aactgaagat ggctaccaag gogaagaatc tttatttaac aaagcatact atggcaaaag 7320
 cacatcattc ttccgtcaag aaagtcaaaa acttctgcaa agcgataaaa aacgcacggc 7380
 tgagttagca aacggcgctc tcggtatgat tgagctaaac gatgattaca cactgaaaaa 7440
 agtgatgaaa ccgctgattg catctaacac agtaacagat gaaattgaac gcgcgaacgt 7500
 ctttaaaatg aacggcaaat ggtacctggt cactgactcc cgcggatcaa aaatgacgat 7560
 tgacggcatt acgtctaacg atatttacat gottggttat gtttctaatt ctttaactgg 7620
 cccatacaag ccgctgaaca aaactggcct tgtgttaaaa atggatcttg atcctaacga 7680
 tgtaaccttt acttactcac acttcgctgt acctcaagcg aaaggaaaca atgtcgtgat 7740
 tacaagctat atgacaaaca gaggattcta cgcagacaaa caatcaacgt ttgcgccgag 7800
 cttcctgctg aacatcaaag gcaagaaaac atctgttgtc aaagacagca tccttgaaca 7860
 aggacaatta acagttaaca aataaaaaac caaaagaaaa tgccaatata ctattggcat 7920
 tttcttttat ttcttcatt taaatggatg catgcgctag cggagtgtat actggcttac 7980
 tatgttggca ctgatgaggg tgtcagtga gtgcttcag tggcaggaga aaaaaggctg 8040
 caccggtgcg tcagcagaat atgtgatata ggatatatto cgcttcctcg ctactgact 8100
 gctgagctcc cggcggattt gtctactcog ggagagtgtt caccgacaaa caacagataa 8160
 aacaaaaggc ccagtcttc gactgagcct tttgttttat ttgatgtctg gcagttccct 8220

ES 2 686 301 T3

actctcgcat	ggggagacco	cacactacca	tgggcgctac	ggcggtttca	cttctgagtt	8280
cggcatgggg	tcaggtggga	ccaccgcgct	actgcgcgca	gacaaattct	tttctaactct	8340
gccgaacttt	aacctaaaa	gtggtgctga	taccagaggt	cgaaactggg	acctcacct	8400
taccaaggt	gcgctctacc	aactgagcca	tatcagcacg	ctaaatttga	tgcttggcag	8460
ttcctactc	tcgcatgggg	agaccccaca	ctaccatcgg	cgctaogggc	tttcacttct	8520
gagttcggca	tggggtcagg	tgggaccacc	gcgctacggc	cgccaggcaa	attctgtttt	8580
atcagaccgc	ttctgcgttc	tgatttaatc	tgtatcaggc	tgaaaatctt	ctctcatocg	8640
gataacaatt	tcacacagga	aacagctatg	accatgatta	cgccaagctg	tacogagctc	8700
gaattcactg	gccgtcgttt	tacaacgtcg	tgaotgggaa	aaacctggcg	ttacccaact	8760
taatgcctt	gcagcacatc	cccctttcgc	cagctggcgt	aatagcgaag	aggcccgcac	8820
cgatcgccct	tcccacaggt	tgccgagcct	gaatggcgaa	tggcgccctga	tgccggtattt	8880
tctccttacg	catctgtgcg	gtatttcaca	ccgcatatgg	tgcaactctca	gtacaactctg	8940
ctctgatgcc	gcatagttaa	gccagccccg	acaccgcgca	acaccgcctg	acgaattc	8998

REIVINDICACIONES

1. Una bacteria genéticamente alterada que produce un producto químico orgánico seleccionada de entre un grupo que consiste en ácido succínico, ácido fumárico, ácido málico, y 1,4-butanodiol, en un medio mínimo, comprendiendo dicha bacteria un gen exógeno que codifica una sacarosa fosforilasa independiente del PTS derivado de *Bifidobacterium longum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pseudobutyrvibrio ruminis*, o *Bifidobacterium lactis*, en el que el microorganismo se selecciona de entre un grupo que consiste en *Escherichia coli*, *Gluconobacter oxydans*, *Gluconobacter asaii*, *Achromobacter delmarvae*, *Achromobacter viscosus*, *Achromobacter lacticum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Alcaligenes faecalis*, *Arthrobacter citreus*, *Arthrobacter tumescens*, *Arthrobacter paraffineus*, *Arthrobacter hydrocarboglutamicus*, *Arthrobacter oxydans*, *Aureobacterium saperae*, *Azotobacter indicus*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *divaricatum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium globosum*, *Brevibacterium fuscum*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, *Brevibacterium helcolum*, *Brevibacterium pusillum*, *Brevibacterium testaceum*, *Brevibacterium roseum*, *Brevibacterium immariophilium*, *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium protopharmiae*, *Corynebacterium acetophilum*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium callunae*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Enterobacter aerogenes*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia chrysanthemi*, *Flavobacterium peregrinum*, *Flavobacterium fucatum*, *Flavobacterium aurantium*, *Flavobacterium rhenanum*, *Flavobacterium sewanense*, *Flavobacterium breve*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Micrococcus* sp. CCM825, *Morganella morganii*, *Nocardia opaca*, *Nocardia rugosa*, *Planococcus eucinatus*, *Proteus rettgeri*, *Propionibacterium shermanii*, *Pseudomonas synxantha*, *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas ovalis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas acidovolans*, *Pseudomonas mucidolens*, *Pseudomonas testasteroni*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus rhodochrous*, *Rhodococcus* sp. ATCC 15592, *Rhodococcus* sp. ATCC 19070, *Sporosarcina ureae*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio metschnikovii*, *Vibrio tyrogenes*, *Actinomadura madurae*, *Actinomyces violaceochromogenes*, *Kitasatosporia parulosa*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces flavelus*, *Streptomyces griseolus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces olivaceus*, *Streptomyces tanashiensis*, *Streptomyces virginiae*, *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces cacaoi*, *Streptomyces lavendulae*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Aeromonas salmonicida*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus thiaminolyticus*, *Escherichia freundii*, *Microbacterium ammoniaphilum*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella schottmulleri*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Basfia succiniciproducens* y *Xanthomonas citri*.
2. La bacteria alterada genéticamente de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente una o más enzimas seleccionadas de entre un grupo que consiste en sacarosa permeasa, glucocinasa, fructocinasa, y fosfofructocinasa.
3. La bacteria alterada genéticamente de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente una permeasa de azúcares independiente de PTS que facilita la acumulación de sacarosa sin modificación química.
4. La bacteria alterada genéticamente de la reivindicación 1, donde dicho gen exógeno está contenido en un plásmido replicante.
5. La bacteria alterada genéticamente de la reivindicación 1, donde dicho gen exógeno está integrado en el cromosoma del huésped.
6. La bacteria alterada genéticamente de la reivindicación 1, donde la bacteria es de una cepa bacteriana PTS⁺.
7. La bacteria alterada genéticamente de la reivindicación 1, donde la bacteria tiene un nivel reducido de actividad del PTS en comparación con una cepa relacionada de tipo silvestre.
8. La bacteria alterada genéticamente de la reivindicación 1, donde la bacteria es de una cepa bacteriana PTS⁻.
9. Un método para la producción fermentativa de un producto químico orgánico seleccionado de entre un grupo que consiste en ácido succínico, ácido fumárico, ácido málico, y 1,4-butanodiol, en un medio mínimo que comprende:
- (a) proporcionar un microorganismo que expresa un gen exógeno de sacarosa fosforilasa independiente del PTS derivado de *Bifidobacterium longum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pseudobutyrvibrio ruminis*, o *Bifidobacterium lactis*, en el que el microorganismo se selecciona de entre un grupo que consiste en *Escherichia coli*, *Gluconobacter oxydans*, *Gluconobacter asaii*, *Achromobacter delmarvae*, *Achromobacter viscosus*, *Achromobacter lacticum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium radiobacter*, *Alcaligenes faecalis*, *Arthrobacter citreus*, *Arthrobacter tumescens*, *Arthrobacter paraffineus*, *Arthrobacter hydrocarboglutamicus*, *Arthrobacter oxydans*, *Aureobacterium saperae*, *Azotobacter indicus*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *divaricatum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium globosum*, *Brevibacterium fuscum*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, *Brevibacterium helcolum*, *Brevibacterium pusillum*, *Brevibacterium testaceum*, *Brevibacterium roseum*, *Brevibacterium immariophilium*, *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium protopharmiae*, *Corynebacterium acetophilum*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium callunae*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Enterobacter aerogenes*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia carotovora*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia chrysanthemi*, *Flavobacterium peregrinum*,

- 5 *Flavobacterium fucatum*, *Flavobacterium aurantium*, *Flavobacterium rhenanum*, *Flavobacterium sewanense*,
Flavobacterium breve, *Flavobacterium meningosepticum*, *Micrococcus* sp. CCM825, *Morganella morganii*,
Nocardia opaca, *Nocardia rugosa*, *Planococcus eucinatus*, *Proteus rettgeri*, *Propionibacterium shermanii*,
Pseudomonas synxantha, *Pseudomonas azotoformans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas ovalis*,
10 *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas acidovorans*, *Pseudomonas mucidolens*, *Pseudomonas testosteroni*,
Pseudomonas aeruginosa, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus rhodochrous*, *Rhodococcus* sp. ATCC
15592, *Rhodococcus* sp. ATCC 19070, *Sporosarcina ureae*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio metschnikovii*, *Vibrio*
tyrogens, *Actinomadura madurae*, *Actinomyces violaceochromogenes*, *Kitasatosporia parulosa*, *Streptomyces*
coelicolor, *Streptomyces flavelus*, *Streptomyces griseolus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces olivaceus*,
10 *Streptomyces tanashiensis*, *Streptomyces virginiae*, *Streptomyces antibioticus*, *Streptomyces cacaoi*,
Streptomyces lavendulae, *Streptomyces viridochromogenes*, *Aeromonas salmonicida*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus*
circulans, *Bacillus thiaminolyticus*, *Escherichia freundii*, *Microbacterium ammoniaphilum*, *Serratia marcescens*,
Salmonella typhimurium, *Salmonella schottmulleri*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus*
15 *amyloliquefaciens*, *Basfia succiniciproducens* y *Xanthomonas citri*.
- (b) cultivar el microorganismo de la etapa (a) en un medio que contiene sacarosa, por lo que el microorganismo
utiliza sacarosa para producir dicho producto químico orgánico; y
(c) opcionalmente la recuperación de dicho producto químico orgánico del caldo de fermentación.
- 20 10. El método para la producción fermentativa de un producto químico orgánico seleccionado de entre un grupo que
consiste en ácido succínico, ácido fumárico, ácido málico, y 1,4-butanodiol de la reivindicación 9, donde dicho
microorganismo es un organismo PTS*.
- 25 11. El método para la producción fermentativa de un producto químico orgánico seleccionado de entre un grupo que
consiste en ácido succínico, ácido fumárico, ácido málico, y 1,4-butanodiol de la reivindicación 9, donde dicho
microorganismo es un organismo PTS*.

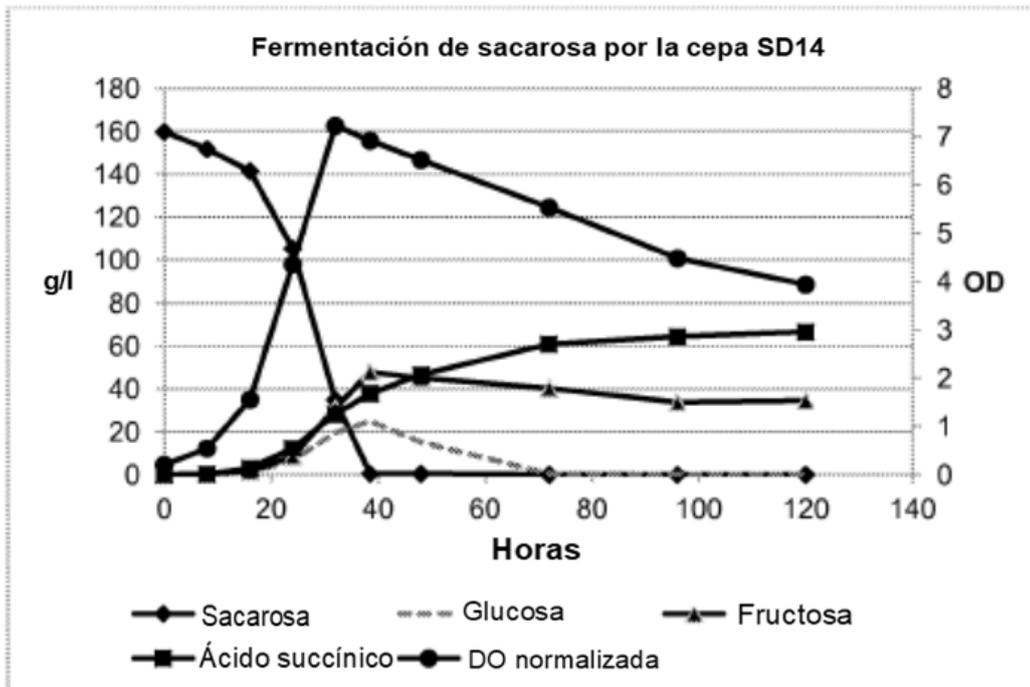


Figura 1

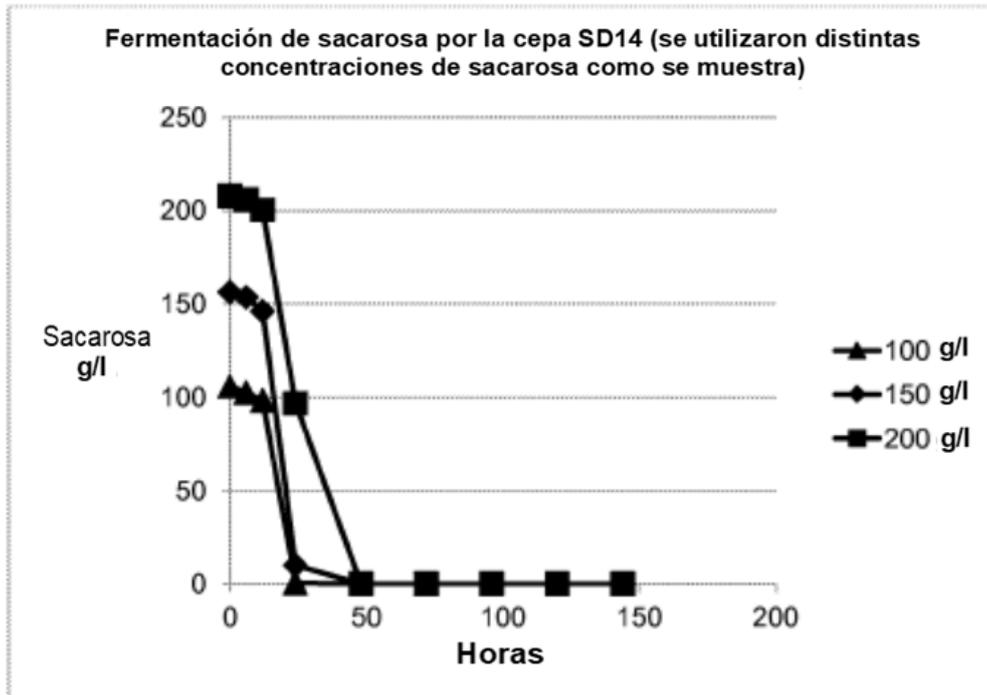


Figura 2

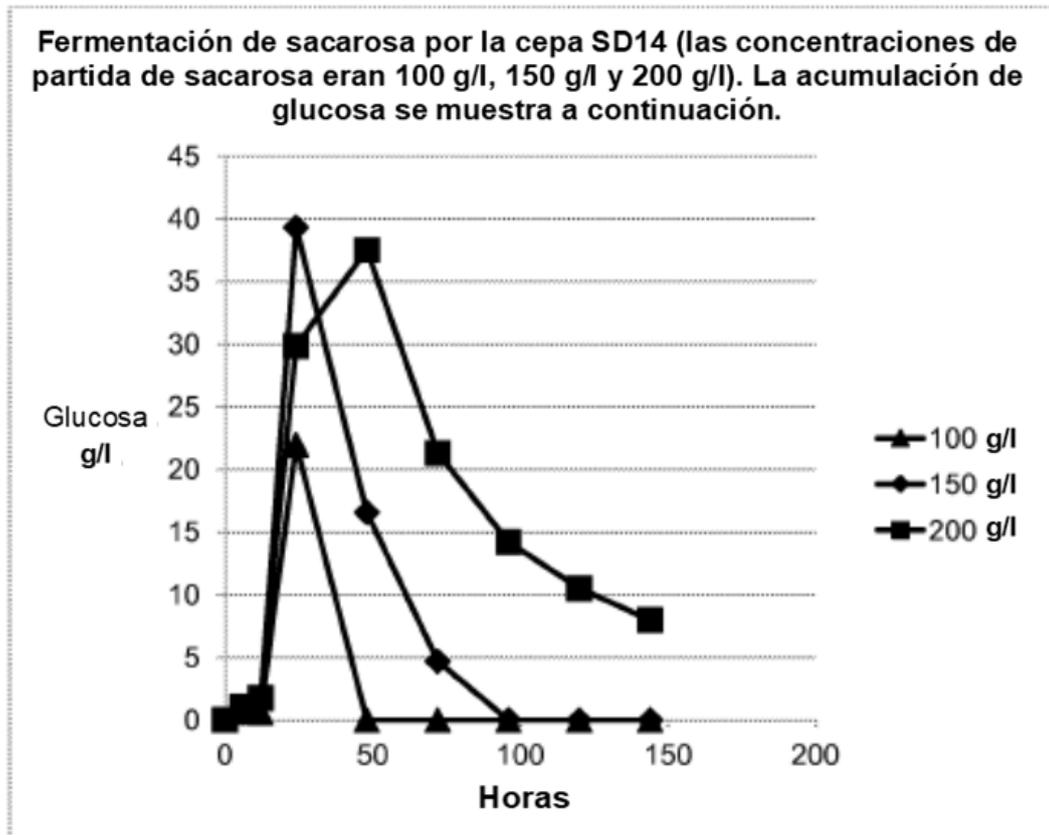


Figura 3



Figura 4

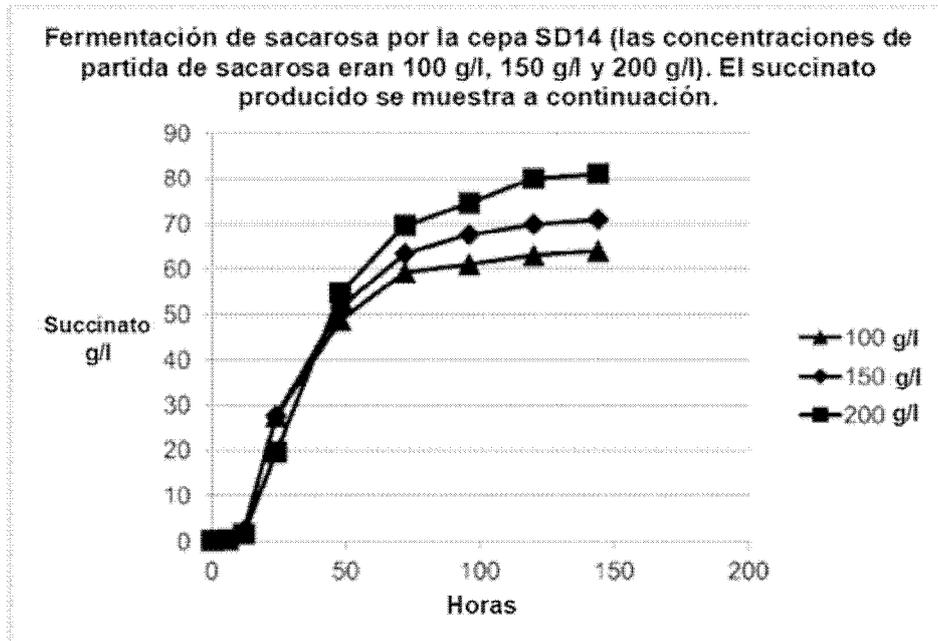


Figura 5

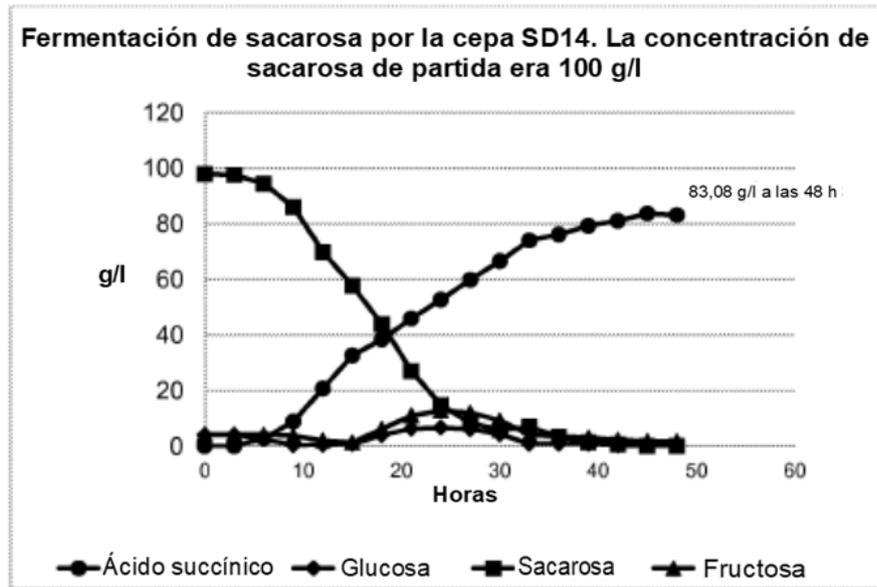


Figura 6