

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 844 298**

21 Número de solicitud: 202030042

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C12P 19/12 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

21.01.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

21.07.2021

Fecha de concesión:

10.01.2022

45 Fecha de publicación de la concesión:

17.01.2022

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS (CSIC) (100.0%)
C/ Serrano, nº 117
28006 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**NOGALES ENRIQUE, Juan;
GARCÍA LÓPEZ, José Luis y
MARTÍNEZ SÁNCHEZ, Igor**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **CIANOBACTERIA RECOMBINANTE SOBREPRODUCTORA DE SACAROSA**

57 Resumen:

Cianobacteria recombinante sobreproductora de sacarosa.

La presente invención se refiere a una cianobacteria recombinante sobreproductora de sacarosa en ausencia de estrés osmótico, que comprende la sobreexpresión de un conjunto de genes, y el uso de la misma para la generación de consorcios sintéticos bacterianos compuestos por bacterias heterotróficas tanto halófilas como no halófilas.

ES 2 844 298 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

Cianobacteria recombinante sobreproductora de sacarosa

5 La presente invención se refiere a una cianobacteria recombinante sobreproductora de sacarosa en ausencia de estrés osmótico, y su uso en la producción de productos de valor añadido tales como biocombustibles y bioplásticos en consorcio con otros microorganismos. Por lo tanto, la presente invención se engloba dentro del campo de la biotecnología, en particular, en el uso de microorganismos recombinantes en procesos
10 industriales.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los avances en la ingeniería microbiana para la producción de biocombustibles, productos químicos y terapéuticos han estimulado la inversión en la producción de una
15 amplia variedad de productos a partir de fuentes biológicas. Los microbios heterotróficos comprenden la gran mayoría de los microorganismos utilizados actualmente para la generación de estos productos y requieren una fuente de carbohidratos para la obtención de carbono y energía que pueden representar una proporción significativa
20 ($\leq 60\%$) del coste de los insumos. Dichos carbohidratos se obtienen típicamente de cultivos agrícolas, principalmente caña de azúcar, remolacha azucarera y maíz, aunque los materiales lignocelulósicos se están investigando exhaustivamente como fuente de materia prima alternativa. Si bien los combustibles y productos químicos producidos biológicamente prometen una mayor sostenibilidad y menor huella de CO₂, las fuentes
25 actuales de materia prima colocan los procesos biotecnológicos a la altura del uso de las tierras de cultivo agrícola y la compraventa de alimentos. Por lo tanto, el desarrollo de alternativas biológicas a los combustibles y productos químicos estándar a base de petróleo han sido criticados por el aumento del coste que suponen y la inestabilidad de los alimentos que producen. De hecho, en los últimos años, los precios del azúcar han
30 aumentado y fluctuado enormemente en los alimentos a nivel mundial, debido en parte a la mayor su demanda en la producción de biocombustibles.

Los microorganismos fotosintéticos (cianobacterias y algas) se han propuesto como fuentes alternativas para la creación de compuestos similares a los biocombustibles o
35 las materias primas industriales, en parte porque poseen muchas ventajas sobre las plantas terrestres tradicionales con respecto a la producción de metabolitos específicos.

Por ejemplo, la eficiencia fotosintética de las cianobacterias es incluso mayor que la de las plantas, y las cianobacterias no requieren tejidos de soporte que reduzcan aún más el rendimiento y la productividad (por ejemplo, raíces / tallos). Además, las cianobacterias son genéticamente manejables, lo que permite una modificación rápida y la selección de las cepas deseables. Por último, las cianobacterias son microbios acuáticos con requisitos nutricionales mínimos y, por lo tanto, se pueden cultivar en lugares que no compiten con los cultivos agrícolas tradicionales. Aun así, solo se ha publicado un pequeño número de informes sobre la extracción de carbohidratos simples homogéneos de especies de cianobacterias.

Las anteriores estrategias que se han utilizado para conseguir altas tasas de producción de sacarosa con cianobacterias involucran la sobreproducción del transportador de sacarosa CscB [Ducat et al. (2012) Appl Environ Microbiol 78 (8): 2660 - 2668]. Otras estrategias incluyen la sobreexpresión simultánea de dicho transportador y el gen que codifica la sacarosa sintasa (Sps) bajo el control de un promotor inducible [Duan et al. (2016) J Ocean Univ China 15 (5): 890-896]. Para lograr una producción significativa de sacarosa, ambas estrategias requieren el cultivo de cianobacterias bajo estrés osmótico (concentración de NaCl > 150 mM). Se han publicado más informes que describen la producción de sacarosa, sin embargo, en todos estos casos la inducción de un estrés osmótico es obligatoria para que dicha producción se dé. Por lo tanto, los enfoques actuales presentan varias limitaciones que incluyen:

- i) cultivo de las cianobacterias en condiciones de cultivo subóptimas, incluyendo estrés osmótico de alto contenido de sal,
- ii) requerimiento del proceso en dos fases (primero acumulación de biomasa y después producción de sacarosa), y
- iii) la presencia obligada de bacterias halófitas como socios en consorcios artificiales microbianos, ya que las cianobacterias deben usarse como proveedores de sacarosa para facilitar el crecimiento de dichos consorcios artificiales microbianos.

Por lo tanto, existe en el estado de la técnica la necesidad de desarrollar un nuevo método de producción de sacarosa que supere los inconvenientes del estado de la técnica antes citados.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con una cianobacteria recombinante sobreproductora de sacarosa y no dependiente de estrés osmótico para desencadenar la producción de dicha sacarosa. La producción de sacarosa en esta cianobacteria se genera de forma acoplada al crecimiento. Esta característica permite que la bacteria pueda ser cultivada en presencia de microorganismos no-halófilos, formando consorcios de microorganismos útiles en los procesos industriales. Adicionalmente, dicha independencia de estrés osmótico permite que la cianobacteria pueda ser cultivada en un biorreactor, tanto de cultivo continuo como de cultivo discontinuo, manteniendo de forma simultánea el crecimiento y la producción de sacarosa durante todas las fases de crecimiento de la cianobacteria (fase de adaptación, fase exponencial y fase estacionaria), lo que evita tener que dividir el proceso de dos etapas: una de acumulación de biomasa y otra de producción de sacarosa.

Los inventores desarrollaron esta cianobacteria, en particular, *Synechococcus elongatus*, mediante la sobreexpresión de un conjunto de genes, algunos homólogos y otros heterólogos al genoma de la cianobacteria, a través de la introducción de dos operones comprendiendo los genes en cuestión en los sitios de inserción NSI y NSII del genoma de la cianobacteria (Ejemplo 1). Los genes sobreexpresados fueron los siguientes:

- (i) el gen que codifica la enzima glucosa-6-fosfato isomerasa (*pgi*) de *Escherichia coli*,
- (ii) el gen que codifica la enzima fosfoglucomutasa (*pgmT*), de *E. coli*
- (iii) el gen que codifica la enzima UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa (*galU*) de *E. coli*,
- (iv) el gen que codifica la enzima sacarosa fosfato sintasa (*sps*) de *S. elongatus*,
- (v) el gen que codifica la enzima permeasa de sacarosa (CSCB *cscB*) de *E. coli*, y
- (vi) el gen que codifica la proteína represora de un operón inducible por metabolito de *E. coli* (*lacI*).

De forma contraria a lo existente actualmente en el estado de la técnica, y para alcanzar mayores productividades, la cepa recombinante de la presente invención se puede usar adicionalmente:

- 1) Tanto en un cultivo discontinuo como continuo para la producción a largo plazo de

sacarosa en un biorreactor. Se pueden producir más de 4 g/L en 10 días a escala de laboratorio. Cuando se compara con las cepas del estado de la técnica, la cianobacteria recombinante de la presente invención mantiene tasas de producción similares pero durante períodos de tiempo más largos. Por lo tanto, la presente invención proporciona la primera cepa fotosintética sobreproductora de sacarosa acoplada al crecimiento, capaz de mantener altas tasas de producción de sacarosa durante al menos 12 días (ver Ejemplo 2).

2) Como una cepa sobreproductora de sacarosa en una asociación sintética con otros microorganismos sin la presencia de altas concentraciones de sal y, por lo tanto, sin la necesidad de utilizar microorganismos halófilos, altamente tolerantes a la sal, para crear consorcios microbianos industriales entre las cianobacterias recombinantes y los otros microorganismos (ver Ejemplo 3).

Por lo tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con una cianobacteria recombinante, de aquí en adelante “cianobacteria de la invención”, que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos

(i) la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima glucosa-6-fosfato isomerasa (PGI) o un fragmento de la misma,

(ii) la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima fosfoglucomutasa (PGMT) o un fragmento de la misma,

(iii) la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa (GalU), o un fragmento de la misma,

(iv) la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima sacarosa fosfato sintasa (SPS), o un fragmento de la misma; y

(v) la secuencia de nucleótidos que codifica un transportador de sacarosa, o un fragmento de la misma,

en donde:

- las secuencias de nucleótidos (i) a (v) están sobreexpresadas con respecto a una cianobacteria no recombinante o *wild type*, y
- las secuencias de nucleótidos (i), (ii), (iii) y (v) son heterólogas.

En la presente invención se entiende por “cianobacteria” a un organismo del dominio Bacteria que es capaz de realizar fotosíntesis oxigénica, es decir, es un organismo fotoautótrofo capaz de usar el CO₂ como única fuente de carbono y la luz como fuente

de energía. Las cianobacterias usan la misma ruta de fijación de CO₂ que las células eucariotas como las algas y las plantas superiores (el ciclo de Calvin, C3). Las cianobacterias también son conocidas como algas verdeazuladas.

5 Ejemplos de cianobacterias que pueden usarse en el contexto de la presente invención incluyen, sin limitarse a, cianobacterias pertenecientes al género *Chamaesiphon*, *Chroococcus*, *Cyanobacterium*, *Cyanobium*, *Dactylococcopsis*, *Gloeobacter*, *Gloeocapsa*, *Gloeotheca*, *Microcystis*, *Prochlorococcus*, *Prochloron*, *Synechococcus*, *Synechocystis*, *Chroococcidiopsis*, *Cyanocystis*, *Dermocarpella*, *Myxosarcina*,
10 *Pleurocapsis*, *Stanieria*, *Xenococcus*, *Arthrospira*, *Borzia*, *Crinalium*, *Geitlerinema*, *Halospirulina*, *Leptolyngbya*, *Limnothrix*, *Lyngbya*, *Microcoleus*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Prochlorothrix*, *Pseudanabaena*, *Spirulina*, *Starria*, *Symploca*, *Trichodesmium*, *Tychonema*, *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon*, *Calothrix*, *Cyanospira*, *Cylindrospermopsis*, *Cylindrospermum*, *Nodularia*, *Nostoc*,
15 *Chlorogloeopsis*, *Fischerella*, *Geitleria*, *Nostochopsis*, *Iyengariella*, *Stigonema*, *Rivularia*, *Scytonema*, and *Tolypothrix*. En una realización particular, la cianobacteria pertenece al género *Synechococcus* sp. que, en otra realización más particular, es *Synechococcus elongatus* que, en otra realización todavía más particular, es *Synechococcus elongatus* PCC 7942.

20

En la presente invención se entiende por “cianobacteria recombinante” a aquella cianobacteria que ha sido modificada genéticamente, distinguiéndose así de la cepa “madre”, “parental” o *wild type*. En el contexto de la presente invención, los términos “cianobacteria recombinante” y “cianobacteria transgénica” son términos equivalentes y
25 significan lo mismo.

25

La cianobacteria de la invención es sobreproductora de sacarosa y no dependiente de estrés osmótico gracias a que presenta insertado en su genoma varias secuencias de nucleótidos, de aquí en adelante “secuencias de nucleótidos de la invención”, que
30 codifican para distintas enzimas o proteínas:

30

- la enzima glucosa-6-fosfato isomerasa o fosfoglucosa isomerasa o PGI (en inglés GPI o *Glucose-6-phosphate isomerase*) es una enzima que cataliza la reacción reversible de glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato. En una realización particular, la
35 enzima PGI es la enzima PGI de *E. coli*. En otra realización particular, la enzima

35

PGI comprende una secuencia de aminoácidos que presenta, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. En otra realización particular, la enzima PGI comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos que presenta un 100% de identidad de secuencia con la secuencia SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 1:

MKNINPTQTAAWQALQKHFDEMKDVTIADLFAKDGDRFSKFSATFDDQMLVDYSKNRITEE
TLAKLQDLAKECDLAGAIKSMFSGEKINRTENRAVLHVALNRNNTPIILVDGKDVMPEVNA
VLEKMKTFSEAIISGEWKGYTGKAITDVVNIGIGGSDLGPYMVTEALRPYKNHLMHFVSN
VDGTHIAEVLKKVNPETTLFLVASKTFTTQETMTNAHSARDWFLKAAGDEKHKHFAALS
TNAKAVGEFGIDTANMFEFWDWVGGRYSLWSAIGLSIVLSIGFDNFVELLSGAHAMDKHFS
TTPAEKNLPVLLALIGIWYNNFFGAETAILPYDQYMHRFAAYFQQGNMESNGKYVDRNGN
VVDYQTGPPIIWGEPGTNGQHAFYQLIHQGTKMVPCDFIAPAITHNPLSDHHQKLLSNFFAQ
TEALAFGKSREVVQEYRDQGKDPATLDYVVPFKVFEGNRPTNSILLREITPFSLGALIAL
YEHKIFTQGVILNIFTFDQWGVELGKQLANRILPELKDDKEISSHDSSTNGLINRYKAWRG

En la presente invención, todas las secuencias de aminoácidos que presentan una identidad de secuencia de, al menos, un 70% con la secuencia SEQ ID NO: 1 se consideran variantes funcionalmente equivalentes de la proteína PGI, es decir, aunque comprenden distinta secuencia de aminoácidos, son capaces de catalizar la reacción reversible de glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato. Un ensayo para determinar si una proteína dada es una variante funcionalmente equivalente de PGI incluye, sin limitar a, un ensayo de monitorización de la reacción EC 5.3.1.9 (responsable de la isomerización reversible de glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato) por la proteína dada. Llevar a cabo la monitorización de la reacción EC 5.3.1.9 por una enzima es práctica de rutina para el experto en la materia.

En otra realización particular, la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima PGI comprende una secuencia de nucleótidos que presenta, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2. En otra realización particular, la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima PGI comprende, o consiste en, la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2. No obstante, como entiende el experto en la materia, en muchas ocasiones la secuencia de nucleótidos tiene que ser optimizada para su expresión en un sistema celular

distinto del de origen. Por este motivo, en otra realización particular, el gen que codifica la enzima PGI comprende, o consiste en, una secuencia de nucleótidos, optimizados para su correcta expresión en *Synechococcus* sp, en particular *S. elongatus*, más en particular, *S. elongatus* PCC7942, que presenta una identidad de secuencia del 100% con la secuencia SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 2:

atgaaaaacatcaatccaacgcagaccgctgcctggcaggcactacagaaacacttcgat
 gaaatgaaagacgttacgatcgccgatctttttgctaaagacggcgatcgtttttctaag
 10 ttctccgcaaccttcgacgatcagatgctggtggattactccaaaaaccgcatcactgaa
 gagacgctggcgaaattacaggatctggcgaaagagtgcgatctggcgggcgcgattaag
 tcgatgtttctctggcgagaagatcaaccgcactgaaaaccgcgccgtgctgcacgtagcg
 ctgcgtaaccgtagcaataccccgatTTTTGGTTGATGGCAAAGACGTAATGCCGGAAGTC
 aacgcggtgctggagaagatgaaaaccttctcagaagcgattatTTCCGGTGAGTGGA
 15 gggtataccggcaaagcaatcactgacgtagtgaaacatcgggatcggcggttctgacctc
 ggccatacatggtgaccgaagctctgcgtccgtacaaaaaccacctgaacatgcacttt
 gtttctaacgtcgatgggactcacatcgcggaagtgcgtgaaaaagtaaaccgcggaacc
 acgctgtttcttggtagcatctaaaaccttcaccactcaggaaactatgaccaacgccc
 agcgcgcgtgactgggttctgaaagcggcaggtgatgaaaaacacgttgcaaaacacttt
 20 gcggcgctttccaccaatgccaaagccgttggcgagtttggtattgatactgccaacatg
 ttcgagttctgggactgggttggcgccggttactctttgtggtcagcgattggcctgtcg
 attgttctctccatcggtttgataacttcgttgaaactgctttccggcgcacacgcgatg
 gacaagcatttctccaccacgcctgccgagaaaaacctgcctgtactgctggcgctgatt
 ggcatctggtacaacaatttctttggtgcggaaactgaagcgattctgccgtatgaccag
 25 tatatgcaccgtttcgcggcgacttccagcagggcaatatggagtccaacggtaagtat
 gttgaccgtaacggtaacgttgtggattaccagactggcccgattatctggggtgaacca
 ggcactaacggtcagcacgcgttctaccagctgatccaccagggaaccaaataagtaccg
 tgcgatttcatcgctccggctatcaccataacctgcctctctgatcatcaccagaaactg
 ctgtctaacttcttcgcccagaccgaagcgtggcggtttggtaaatcccggaagtgggt
 30 gagcaggaatatcgtgatcagggtaaagatccggcaacgcttgactacgtggtgccgttc
 aaagtattcgaaggtaacgcccgaacaaactccatcctgctgcgtgaaatcactccgttc
 agcctgggtgcgttgattgcgtgtatgagcacaaaatctttactcagggcgatgctctg
 aacatcttcaccttcgaccagtggggcggtggaactgggtaaacagctggcgaaccgtatt
 ctgccagagctgaaagatgataaagaaatcagcagccacgatagctcgaccaatgggtctg
 35 attaaccgctataaagcgtggcgcggttaa

SEQ ID NO: 3:

atgaaaaacatcaatccaacgcagaccgctgcctggcaggcactacagaaacacttcgatg
 aaatgaaagacgttacgatcgccgatctttttgctaaagacggcgatcgcttttctaagtt
 ctccgcaaccttcgacgatcagatgctggtggattactccaaaaaccgcatcactgaagag
 5 acgctggcgaaattacaggatctggcgaaagagtgcgatctggcgggcgcgattaagtcca
 tgttctcgggcgagaagatcaaccgcactgaaaaccgcgccgtgctgcacgtggcgctgcg
 taaccgcagcaataccccgatTTTTGGTTGATGGCAAAGACGTCATGCCGGAAGTCAACGCG
 GTGCTGGAGAAGATGAAAACCTTCTCAGAAGCGATTATTTCCGGTGAGTGGAAAGGTTATA
 CCGGCAAAGCAATCACTGACGTAGTGAACATCGGGATCGGCGGTTCCGGACCTCGGCCATA
 10 CATGGTGACCGAAGCTCTGCGGCCGTACAAAAACCACCTGAACATGCACCTTGTCTTAAC
 GTCGATGGGACTCACATCGCGGAAGTGCTGAAAAAGTGAACCCGGAACCACGCTGTTCT
 TGGTAGCATCGAAAACCTTCACCCTCAGGAACTATGACCAACGCCCATAGCGCGCGTGA
 CTGGTTCTCTGAAAGCGGCAGGTGATGAAAAACACGTTGCAAAACACTTTGCGGCGCTTTC
 ACCAATGCCAAAGCCGTTGGCGAGTTTGGTATTGATACTGCCAACATGTTGAGTTCTGGG
 15 ACTGGGTTGGCGGCCGGTACTCTTTGTGGTCAGCGATTGGCCTGTCGATTGTTCTCTCCAT
 CGGCTTTGATAACTTCGTTGAAC TGCTTTCGGCGCACACGCGATGGACAAGCATTTCTCC
 ACCACGCCTGCCGAGAAAAACCTGCCTGTCTGCTGGCGCTGATTGGCATCTGGTACAACA
 ATTTCTTTGGTGCGGAAACTGAAGCGATTCTGCCGTATGACCAGTATATGCACCGTTTCGC
 GGC GTACTTCCAGCAGGGCAATATGGAGTCCAACGGTAAGTATGTTGACCGTAACGGTAAC
 20 GTTGTGGATTACCAGACTGGCCGATTATCTGGGGTGAACCAGGCAC TAACGGTCAGCACG
 CGTTCTACCAGCTGATCCACCAGGGAACCAAAATGGTGCCGTGCGATTTCTCGCTCCGGC
 TATCACCCATAACCCGCTCTCTGATCATCACCAGAAACTGCTGTGCAACTTCTTCGCCAG
 ACCGAAGCGCTGGCGTTTGGTAAATCCCGCGAAGTGGTTGAGCAGGAATATCGCGATCAGG
 GTAAAGATCCGGCAACGCTTGACTACGTGGTGCCGTTCAAAGTATTCGAAGGTAACCGCCC
 25 GACCAACTCCATCTGCTGCGTGAAATCACTCCGTTCCAGCCTGGGTGCGTTGATTGCGCTG
 TATGAGCACAAAATCTTTACTCAGGGCGTGATCCTGAACATCTTCACCTTCGACCAGTGGG
 GCGTGGAAC TGGGTAACAGCTGGCGAACC GTATTCTGCCAGAGCTGAAAGATGATAAAGA
 AATCAGCAGCCACGATAGCTCGACCAATGGTCTGATTAACCGCTATAAAGCGTGGCGCGGT
 TAA

30

- La enzima fosfoglucomutasa o PGM (en inglés PGM o *phosphoglucomutase*) es una enzima que cataliza la transferencia del grupo fosfato desde el carbono 1 de la glucosa-1-fosfato al carbono 6 de la glucosa-6-fosfato. En una realización particular, la enzima PGM es la enzima PGM de *E. coli*. En otra realización particular, la enzima PGM comprende una secuencia de aminoácidos que presenta, al menos,

35

un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID

NO: 4. En otra realización particular, la enzima PGMT comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos que presenta un 100% de identidad de secuencia con la secuencia SEQ ID NO: 4.

5 SEQ ID NO: 4:

MAIHNRAQPAQQSDLINVAQLTAQYYVLKPEAGNAEHAVKFGTSGHRGSAARHSFNEPHI
 LAIAQIAEERAKNGITGPCYVGKDTHALSEPAFISVLEVLAANGVDVIVQENNGFTPTPA
 VSNAILVHNKKGGPLADGIVITPSHNPPEDGGIKYNPPNGGPADTNVTKVVEDRANALLAD
 10 GLKGVKRISLDEAMASGHVKEQDLVQPFVEGLADIVDMAAIQKAGLTLGVDPLGGSGIEYW
 KRIGEYYNLNLTIVNDQVDQTFRFMHLDKDGAIRMDCSSECAMAGLLALRDKFDLAFANDP
 DYDRHGIVTPAGLMNPNHYLAVAINYLFQHRPQWGKDVAVGKTLVSSAMIDRVVNDLGRKL
 VEVPGFKWFVDGLFDGSFGFGGEESAGASFLRFDGTPWSTDKGDIIMCLLAAEITAVTGK
 NPQEHYNELAKRFGAPSYNRLQAAATSAQKAALSKLSPMVSASTLAGDPITARLTAAPGN
 15 GASIGGLKVMTDNGWFAARPSGTEDAYKIYCESFLGEEHRKQIEKEAVEIVSEVLKNA-

En la presente invención, todas las secuencias de aminoácidos que presentan una identidad de secuencia de, al menos, un 70% con la secuencia SEQ ID NO: 4 se consideran variantes funcionalmente equivalentes de la proteína PGMT, es decir, aunque comprenden distinta secuencia de aminoácidos, son capaces de catalizar la transferencia del grupo fosfato desde el carbono 1 de la glucosa-1-fosfato al carbono 6 de la glucosa-6-fosfato. Un ensayo para determinar si una proteína dada es una variante funcionalmente equivalente de PGMT incluye, sin limitar a, un ensayo de monitorización de la reacción EC 5.4.2.2 (responsable de la conversión de D-glucosa 1-fosfato en D-glucosa 6-fosfato) por la proteína dada. Llevar a cabo la monitorización de la reacción EC 5.4.2.2 por una enzima es práctica de rutina para el experto en la materia.

En otra realización particular, la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima PGMT comprende una secuencia de nucleótidos que presenta, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5. En otra realización particular, la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima PGMT comprende, o consiste en, la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 5. No obstante, como entiende el experto en la materia, en muchas ocasiones la secuencia de nucleótidos tiene que ser optimizada para su expresión en un sistema

celular distinto del de origen. Por este motivo, en otra realización particular, el gen que codifica la enzima PGM1 comprende, o consiste en, una secuencia de nucleótidos, optimizados para su correcta expresión en *Synechococcus* sp, en particular *S. elongatus*, más en particular, *S. elongatus* PCC7942, que presenta una identidad de secuencia del 100% con la secuencia SEQ ID NO: 6.

SEQ ID NO: 5:

atggcaatccacaatcgtgcaggccaacctgcacaacagagtgatttgattaacgtcgcc
caactgacggcgcaatattatgtactgaaaccagaagcaggggaatgcggagcacgcggtg
10 aaattcgggtacttccgggtcacctgtgagcgtgcagcgccacagctttaacgagccgcac
attctggcgatcgctcaggcaattgtctgaagaacgtgcgaaaaacggcatcactggccct
tgctatgtgggttaaagatactcacgccctgtccgaacctgcattcatttccgttctggaa
gtgctggcgagcgaacggcggtgatgtcattgtgcaggaaaacaatggcttcaccccgacg
cctgccgtttccaatgccatcctgggttcacaataaaaaaggtggcccgtggcagacgggt
15 atcgtgattacacgtcccataacccgccggaagatgggtggaatcaaatacaatccgcc
aatgggtggcccggtgataccaacgtcactaaagtgggtggaagacagggccaacgcactg
ctggccgatggcctgaaaggcgtgaagcgtatctccctcgacgaagcgatggcatccggt
catgtgaaagagcaggatctgggtgcagccgttcgtggaaggtctggccgatatcggtgat
atggccgcgattcagaaagcgggcctgacgctgggcgttgatccgctgggcggttccggt
20 atcgaatactggaagcgtattggcgagtattacaacctcaacctgactatcgttaacgat
caggtcgatcaaaccttccgctttatgcaccttgataaagacggcgcgatccgtatggac
tgctcctccgagtgtgcgatggcgggcctgctggcactgcgtgataagttcgatctggcg
tttgctaacgacccggattatgaccgtcacgggtatcgtcactccggcaggtttgatgaat
ccgaaccactacctggcggtggcaatcaattacctgttccagcatcgccgcagtggggc
25 aaagatgttgccgtcggtaaaacgctgggtttcatctgcgatgatcgaccgtgtggtcaac
gacttgggcccgtaaactggtagaagtcccggtaggtttcaaatggtttgatggtctg
ttcgacggcagcttcggctttggcggcgaagagagtgcaggggcttccttccgtgttc
gacggcacgcccgtgggtccaccgacaaagacggcatcatcatgtgtctgctggcggcgaa
atcacgcgtgtcacggtaagaacccgcaggaacactacaacgaactggcaaacgcttt
30 ggtgcgccgagctacaaccgtttgcaggcagctgcgacttccgcacaaaaagcggcgctg
tctaagctgtctccggaaatggtagcgccagcaccctggcaggtgacccgatcacgcg
cgctgactgctgctccgggcaacgggtgcttctattggcggtctgaaagtgatgactgac
aacggctgggttcgcccgcgctccgtcaggcacggaagacgcatataagatctactgcgaa
agcttccctcggtgaagaacatcgcaagcagattgagaaagaagcgggtgagattgttagc
35 gaagttctgaaaaacgcgtaa

SEQ ID NO: 6:

atggcaatccacaatcgcgagggccaacctgcacaacagagtgatttgattaacgtcgccc
aactgacggcgcaatattatgtgctgaaaccagaagcaggggaatgcggagcacgcggtgaa
attcgggtacttccgggtcaccggggcagtgacgcgcgccacagctttaacgagccgcacatt
5 ctggcgatcgctcaggcaattgctgaagaacgcgcgaaaaacggcatcactggcccttgct
atgtgggttaaagatactcacgccctgtccgaacctgcattcatttccgttctggaagtgt
ggcagcgaacggcggttgatgtcattgtgcaggaaaacaatggcttcaccccgacgcctgcc
gtttccaatgccatcctgggttcacaataaaaaaggtggcccgtggcagacgggtatcgatga
ttacaccgtcccataacccgccggaagatggtggaatcaaatacaatccgccaatggtgg
10 cccggctgataccaacgtcactaaagtgggtggaggaccgggccaacgcactgctggccgat
ggcctgaaaggcgatgaagcgatctccctcgacgaagcgatggcatccgggtcatgtgaaag
agcaggatctggtgcagccggttcgtggaaggtctggccgatatcggtgatatggccgcgat
tcagaaagcgggctgacgctgggcttgatccgctgggctgggttcgggtatcgaatactgg
aagcgcatcggcgagtattacaacctcaacctgactatcgtaacgatcaggtcgatcaaa
15 ccttccgctttatgcaccttgataaagacggcgcatccggtatggactgctcctccgagt
tgcatggcgggcctgctggcactgcgtgataagttcgatctggcggttgctaacgacccg
gattatgaccgccacgggtatcgctcactccggcaggtttgatgaatccgaaccactacctgg
cggtggcaatcaattacctgttccagcatcgctccgcagtggggcaaagatggtgccgtcgg
taaaacgctgggttcatcggcgatgatcgaccgtgtggtcaacgacttgggcccgtaaactg
20 gtagaagtcccggtaggtttcaaattggtttgtcgatggtctgttcgacggcagcttcgggt
ttggcggcgaagagagtgacggggcttccttctgctgttcgacggcacgccgtggtccac
cgacaaagacggcatcatcatgtgtctgctggcggcggaaatcaccgctgtcaccggtaag
aaccgcaggaacactacaacgaactggcaaaacgctttggtgcgccgagctacaaccgtt
tgcaggcagctgcgacttccgcacaaaaagcggcgctgtctaagctgtctccggaaatggt
25 gagcgccagcaccctggcaggtgacccgatcaccgcgcgctgactgctgctccgggcaac
ggtgcttctattggcggtctgaaagtgatgactgacaacggctgggttcgccgcgcgtccgt
caggcacggaagatgcatataagatctactgcgaaagtttctcgggtgaagaacatcgcaa
gcagattgagaaagaagcggttgagattgtagcgaagttctgaaaaacgcgtaa

- 30 - La enzima UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa o GalU (en inglés GalU o *UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase*, *UDP-glucose pyrophosphorylase*, o *glucose-1-phosphate uridylyltransferase*) es una enzima que cataliza la reacción entre la Glucosa-1-fosfato y el UTP para formar UDP-glucosa-2. En una realización particular, la enzima GalU es la enzima GalU de *E. coli*. En otra realización particular, la enzima GalU comprende una secuencia de aminoácidos que presenta,
- 35 al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad de secuencia con

la secuencia SEQ ID NO: 7. En otra realización particular, la enzima GalU comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos que presenta un 100% de identidad de secuencia con la secuencia SEQ ID NO: 7.

5 SEQ ID NO: 7:
 MAAINTKVKKAVIPVAGLGTRMLPATKAIPKEMLPLVDKPLIQYVVNECIAAGITEIVLVT
 HSSKNSIENHFDTSFELEAMLEKRVKRQLLDEVQSICPPHVTIMQVRQGLAKGLGHAVLCA
 HPVVGDEPVAVILPDVILDEYESDLSQDNLAEMIRRFDETGHQSQIMVEPVADVTAYGVVDC
 KGVELAPGESVPMVGVVEKPKADVAPSNLAIVGRYVLSADIWPLLAKTPPGAGDEIQLTDA
 10 IDMLIEKETVEAYHMKGKSHDCGNKLGVMQAFVEYGIRHNTLGTEFKAWLEEEMGIKK-

En la presente invención, todas las secuencias de aminoácidos que presentan una identidad de secuencia de, al menos, un 70% con la secuencia SEQ ID NO: 7 se consideran variantes funcionalmente equivalentes de la proteína GalU, es decir, aunque comprenden distinta secuencia de aminoácidos, son capaces de catalizar la reacción entre la Glucosa-1-fosfato y el UTP para formar UDP-glucosa-2. Un ensayo para determinar si una proteína dada es una variante funcionalmente equivalente de GalU incluye, sin limitar a, un ensayo de monitorización de la reacción EC 2.7.7.9 (responsable de la transferencia de un grupo UTP a la glucosa-1-fosfato) por la proteína dada. Llevar a cabo la monitorización de la reacción EC 2.7.7.9 por una enzima es práctica de rutina para el experto en la materia.

En otra realización particular, la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima GalU comprende una secuencia de nucleótidos que presenta, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 8. En otra realización particular, la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima GalU comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 8. No obstante, como entiende el experto en la materia, en muchas ocasiones la secuencia de nucleótidos tiene que ser optimizada para su expresión en un sistema celular distinto del de origen. Por este motivo, en otra realización particular, el gen que codifica la enzima GalU comprende, o consiste en, una secuencia de nucleótidos, optimizados para su correcta expresión en *Synechococcus* sp, en particular *S. elongatus*, más en particular, *S. elongatus* PCC7942, que presenta una identidad de secuencia del 100% con la secuencia SEQ ID NO: 9.

35

SEQ ID NO: 8:

atggctgccattaatacgaagtgcaaaaaagccgttatccccgttgccgggatttaggaacc
 aggatgttgccggcgacgaagccatcccgaaagagatgctgccacttgctgataagcca
 ttaattcaatacgtcgtgaatgaatgtattgctggctggcattactgaaattgtgctggtt
 5 acacactcatctaaaaactctattgaaaaccactttgataccagttttgaactggaagca
 atgctggaaaaacgtgtaaaacgtcaactgcttgatgaagtgcagtcattttgtccaccg
 cacgtgactattatgcaagttcgtcagggctctggcgaaaggcctgggacacgcggtattg
 tgtgctcaccggttagtgggtgatgaaccggtagctgttattttgcctgatgttattctg
 gatgaatatgaatccgattttgtcacaggataacctggcagagatgatccgccgctttgat
 10 gaaacgggtcatagccagatcatggttgaaccggttgctgatgtgaccgcatatggcggt
 gtggattgcaaaggcgttgaattagcgccgggtgaaagcgtaccgatggttggtgtggtgta
 gaaaaaccgaaagcggatgttgcccgctctaatctcgctattgtgggtcggttacgtactt
 agcgcggtatatttgccggttgctggcaaaaaccctccgggagctggtgatgaaattcag
 ctaccgacgcaattgatatgctgatcgaaaaagaaacggtggaagcctatcatatgaaa
 15 gggaagagccatgactgcggttaataaattaggttacatgcaggccttcggtgaatacgg
 attcgtcataacacccttggcacggaatttaaagcctggcttgaagaagagatgggcatt
 aagaagtaa

SEQ ID NO: 9:

atggctgccattaatacgaagtgcaaaaaagccgttatccccgttgccgggatttggaaccc
 ggatgttgccggcgacgaagccatcccgaaagagatgctgccactggctgataagccatt
 gattcaatacgtcgtgaatgaatgtattgctggctggcattactgaaattgtgctggttaca
 cactcatcgaaaaactctattgaaaaccactttgataccagttttgaactggaagcaatgc
 tggaaaaacgcgtaaaacgtcaactgcttgatgaagtgcagtcgattttgtccaccgcacgt
 25 gactattatgcaagttcgccagggctctggcgaaaggcctgggacacgcggtgttggtgct
 caccggtcggtgggtgatgaaccggtggctgttattttgcctgatgttattctggatgaat
 atgaatccgattttgtcacaggataacctggcagagatgatccgccgctttgatgaaacggg
 tcatagccagatcatggttgaaccggttgctgatgtgaccgcatatggcggttggtgattgc
 aaaggcgttgaattagcgccgggtgaaagcgtgccgatggttggtgtggtcgaaaaaccga
 30 aagcggatgttgcccgctctaatctcgctattgtgggtcggttacgtactcagcgcggtat
 ttggccggttgctggcaaaaaccctccgggagctggtgatgaaattcagctcaccgacgca
 attgatatgctgatcgaaaaagaaacggtggaagcctatcatatgaaagggaagagccatg
 actgcggttaataaattaggttacatgcaggccttcggtgaatacgggtattcgtcataacac
 ccttggcacggaatttaaagcctggcttgaagaagagatgggcattaagaagtaa

35

- La enzima sacarosa fosfato sintasa o SPS (en inglés SPS o *sucrose-phosphate*

synthase) es una enzima multifuncional que posee: i) actividad glucosiltransferasa que sintetiza sacarosa-6-fosfato a partir de UDP-Glc y/o ADP-Glc y Fru-6-P, y ii) actividad fosfohidrolasa específica, la sacarosa-fosfato-fosfatasa (SPP); ambas actividades, codificadas en la misma cadena polipeptídica son responsables de la síntesis neta de la sacarosa. En una realización particular, la enzima SPS es la enzima SPS de *S. elongatus*. En otra realización particular, la enzima SPS comprende una secuencia de aminoácidos que presenta, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10. En otra realización particular, la enzima SPS comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos que presenta un 100% de identidad con la secuencia SEQ ID NO: 10.

SEQ ID NO: 10:

MAAQNLYILHIQTHGLLRGQNLELGRDADTGGQTKYVLELAQAQAKSPQVQQVDIITRQIT
 DPRVSVGYSQAIEPFAPKGRIVRLPFGPKRYLRKELLWPHLYTFADAILQYLAQQKRTPTW
 IQAHYADAGQVGSLLSRWLNVPILFTGHSLGRIKLLKLEQDWPLEEIEAQFNIQQRIDAE
 EMTLTHADWIVASTQQEVEEQYRVYDRYNPERKLVIPPGVDTDRFRFQPLGDRGVVLQQEL
 SRFLRDPEKPQILCLCRPAPRKNVPALVRAFGEHPWLRKKANLVLVLGSRQDINQMDRGSR
 QVFQEIFHLVDYDLYGSVAYPKQHQADDVPEFYRLAAHSGGVFVNPALTEPFGLTILEAG
 SCGVPVATHDGGPQEILKHCDFTLVDSRPANIATALATLLSDRDLWQCYHRNGIEKVP
 AHYSWDQHVNTLFERMETVALPRRRVSVFVRSRKRLIDAKRLVVSIDINTLLGDRQGLENL
 MTYLDQYRDHFAFGIATGRRLDSAQEVLEKVGWVSPNFWTSVGSEIHYGTDAEPDISWEK
 HINRNWNPQRIRAVMAQLPFLELQPEEDQTPFKVSFFVRDRHETVLREVRQHLRRHRLRLK
 SIYSHQEFLDILPLAASKGDAIRHLSLRWRIPLNILLVAGDSGNDEEMLKGHNLGVVVGNV
 SPELEPLRSYERVYFAEGHYANGILEALKHYRFFEAIA-

En la presente invención, todas las secuencias de aminoácidos que presentan una identidad de secuencia de, al menos, un 70% con la secuencia SEQ ID NO: 10 se consideran variantes funcionalmente equivalentes de la proteína SPS, es decir, aunque comprenden distinta secuencia de aminoácidos, son capaces de actuar como una glucosiltransferasa que sintetiza sacarosa-6-fosfato a partir de UDP-Glc y/o ADP-Glc y Fru-6-P. Un ensayo para determinar si una proteína dada es una variante funcionalmente equivalente de SPS incluye, sin limitar a, un ensayo de monitorización de las actividades EC 2.4.1.12 y EC 3.1.3.24 en la misma cadena polipeptídica (responsables de la producción de sacarosa a partir de fructosa-6-P y

ADP/UDP-glucosa) por la proteína dada. Llevar a cabo la monitorización de las actividades EC 2.4.1.12 y EC 3.1.3.24 por una enzima es práctica de rutina para el experto en la materia.

5 En otra realización particular, la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima SPS comprende una secuencia de nucleótidos que presenta, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 11. En otra realización particular, la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima SPS comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 11. No obstante, como
10 entiende el experto en la materia, en muchas ocasiones la secuencia de nucleótidos tiene que ser optimizada para su expresión en un sistema celular. Por este motivo, en otra realización particular, el gen que codifica la enzima PSP comprende, o consiste en, una secuencia de nucleótidos, optimizados para su correcta expresión en *Synechococcus* sp, en particular *S. elongatus*, más en particular, *S. elongatus*
15 PCC7942, que presenta una identidad de secuencia del 100% con la secuencia SEQ ID NO: 12.

SEQ ID NO: 11:

gtggcagctcaaaatctctacattctgcacattcagacccatgggtctgctgcgagggcag
20 aacttggaactggggcgagatgccgacaccggcgggcagaccaagtacgtcttagaactg
gctcaagcccaagctaaatccccacaagtccaacaagtcgacatcatcacccgccaatc
accgacccccgcgtcagtggttggttacagtcaggcgatcgaaccctttgcgcccaaaggt
cggattgtccggtttgccttttgccccaaacgctacctccgtaaagagctgctttggccc
catctctacacctttgcggtatgcaattctccaatatctggctcagcaaaagcgcaccccg
25 acttggtattcaggccactatgctgatgctggccaagtgggatcactgctgagtcgctgg
ttgaatgtaccgctaattttcacagggcattctctggggcggtatcaagctaaaaaagctg
ttggagcaagactggccgcttgaggaaattgaagcgcaattcaatattcaacagcgaatt
gatgcgaggagatgacgctcactcatgctgactggattgtcgccagcactcagcaggaa
gtggaggagcaataccgcgtttacgatcgctacaaccagagcgcaagcttgtcattcca
30 ccgggtgtcgataccgatcgcttcagggtttcagcccttgggcgatcgcggtgttggtctc
caacaggaactgagccgctttctgcgcgacccagaaaaacctcaaattctctgcctctgt
cgccccgcacctcgaaaaatgtaccggcgctggtgcgagcctttggcgaacatccttg
ctgcgcaaaaaagccaaccttgtcttagtactgggcagccgccaagacatcaaccagatg
gatcgcggcagtcggcaggtgttccaagagattttccatctggtcgatcgctacgacctc
35 tacggcagcgtcgcttatcccaaacagcatcaggctgatgatgtgccggagttctatcgc
ctagcggctcattccggcggggtattcgtcaatccggcgctgaccgaaccttttggtttg

acaat t t t t t g g a g g c a g g a a g c t g c g g c g t g c c g g t g g t g g c a a c c c a t g a t g g c g g c c c c
c a g g a a a t t c t c a a a c a c t g t g a t t t c g g c a c t t t a g t t g a t g t c a g c c g a c c c g c t a a t
a t c g c g a c t g c a c t c g c c a c c c t g c t g a g c g a t c g c g a t c t t t g g c a g t g c t a t c a c c g c
a a t g g c a t t g a a a a g t t c c c g c c c a t t a c a g c t g g g a t c a a c a t g t c a a t a c c c t g t t t
5 g a g c g c a t g g a a c g g t g g c t t t g c c t c g t c g t c g t g c t g t c a g t t t c g t a c g g a g t c g c
a a a c g c t t g a t t g a t g c c a a a c g c c t t g t c g t t a g t g a c a t c g a c a a c a c a c t g t t g g g c
g a t c g t c a a g g a c t c g a g a a t t a a t g a c c t a t c t c g a t c a g t a t c g c g a t c a t t t t g c c
t t t g g a a t t g c c a c g g g g c g t c g c c t a g a c t c t g c c c a a g a a g t c t t g a a a g a g t g g g g c
g t t c c t t c g c c a a a c t t c t g g g t g a c t t c c g t c g g c a g c g a g a t t c a c t a t g g c a c c g a t
10 g c t g a a c c g g a t a t c a g c t g g g a a a g c a t a t c a a t c g c a a c t g g a a t c c t c a g c g a a t t
c g g g c a g t a a t g g c a c a a c t a c c c t t t c t t g a a c t g c a g c c g g a a g a g g a t c a a a c a c c c
t t c a a a g t c a g c t t c t t t g t c c g c g a t c g c c a c g a g a c t g t g c t g c g a g a a g t a c g g c a a
c a t c t t c g c c g c c a t c g c c t g c g g t g a a g t c a a t c t a t t c c c a t c a g g a g t t t c t t g a c
a t t c t g c c g c t a g c t g c c t c g a a g g g g a t g c g a t t c g c c a c c t c t c a c t c c g c t g g c g g
15 a t t c c t c t t g a g a a c a t t t t g g t g g c a g g c g a t t c t g g t a a c g a t g a g g a a t g c t c a a g
g g c c a a t c t c g g c g t t g t a g t t g g c a a t t a c t c a c c g g a a t t g g a g c c a c t g c g c a g c
t a c g a g c g c g t c t a t t t t g c t g a g g g c c a c t a t g c t a a t g g c a t t c t g g a a g c c t t a a a a
c a c t a t c g c t t t t t t g a g g c g a t c g c t t a a

20 SEQ ID NO: 12:

A T G G C A G C T C A A A a t c t c t a c a t t c t g c a c a t t c a g a c c c a t g g t c t g c t g c g a g g g c a g a
a c t t g g a a c t g g g g c g a g a t g c c g a c a c c g g c g g g c a g a c c a a g t a c g t c t t a g a a c t g g c
t c a a g c c c a a g c t a a a t c c c c a c a a g t c c a a c a a g t c g a t a t c a t c a c c c g c c a a a t c a c c
g a c c c c c g c g t c a g t g t t g g t t a c a g t c a g g c g a t c g a a c c c t t t g c g c c c a a a g g t c g g a
25 t t g t c c g t t t g c c t t t t g g c c c a a a c g c t a c c t c c g t a a a g a g c t g c t t t g g c c c a t c t
c t a c a c c t t t g c g g a t g c a a t t c t c c a a t a t c t g g c t c a g c a a a a g c g c a c c c c g a c t t g g
a t t c a g g c c c a c t a t g c t g a t g c t g g c c a a g t g g g a t c a c t g c t g a g t c g t g g t t g a a t g
t a c c g c t a a t t t t c a c a g g g c a t t c t c t g g g g c g g a t c a a g c t a a a a a a g c t g t t g g a g c a
a g a c t g g c c g c t t g a g g a a a t t g a a g c g c a a t t c a a t a t t c a a c a g c g a a t t g a t g c g g a g
30 g a g a t g a c g c t c a c t c a t g c t g a c t g g a t t g t c g c c a g c a c t c a g c a g g a a g t g g a g g a g c
a a t a c c g c g t t t a c g a t c g c t a c a a c c c a g a g c g c a a g c t g g t c a t t c c a c c g g g t g t c g a
t a c c g a t c g c t t c a g g t t t c a g c c c t t g g g c g a t c g c g g t g t t g t t c t c c a a c a g g a a c t g
a g c c g c t t t c t g c g c g a c c c a g a a a a c c t c a a a t t c t c t g c c t c t g t c g c c c c g c a c c t c
g c a a a a a t g t a c c g g c g c t g g t g c g a g c c t t t g g c g a a c a t c c t t g g c t g c g c a a a a a a g c
35 c a a c c t t g t c t t a g t a c t g g g c a g c c g c c a a g a c a t c a a c c a g a t g g a t c g c g g c a g t c g g
c a g g t g t t c c a a g a g a t t t t c c a t c t g g t c g a t c g c t a c g a c c t c t a c g g c a g c g t c g c c t

atcccaaacagcatcaggctgatgatgtgccggagttctatcgccctagcgggtcattccgg
 cgggggtattcgtcaatccggcgctgaccgaaccttttggtttgacaattttggaggcagga
 agctgcggcggtgccggtggtggcaacctatgatggcgggccccaggaattctcaaact
 gtgatttcggcacttttagttgatgtcagccgacctgtaatatcgcgactgcactcgccac
 5 cctgctgagcgatcgcgatctttggcagtgctatcaccgcaatggcattgaaaaagtccc
 gccattacagctgggatcaacatgtcaataacctgtttgagcgcatggaaacgggtggctt
 tgctcgtcgtcgtgctgtcagtttcgtacggagtcgcaaacgcttgattgatgccaaacg
 cctgtcgttagtgacatcgacaacacactgtttgggcatcgtaaggactcgaaaattta
 atgacctatctcgatcagatcgcgatcattttgcctttggaattgccacggggcgctgcc
 10 tagactctgccaagaagtcttgaaagagtggggcgcttccttcgccaacttctgggtgac
 ttccgtcggcagcgagattcactatggcaccgatgctgaaccggatatcagctgggaaaag
 catatcaatcgcaactggaatcctcagcgcattcgggcagtaatggcacaactacctttc
 ttgaactgcaaccggaagaggatcaaacaccttcaaagtcagcttctttgtccgcgatcg
 ccacgagactgtgctgcgagaagtacggcaacatcttcgccgccatcgctgcggctgaag
 15 tcaatctattcccatcaggagtttcttgacattctgccgctggctgcctcgaaaggggatg
 cgattcgccacctctcactccgctggcggattcctcttgagaacattttggtggcaggcga
 ttctggtaacgatgaggaaatgctcaagggccataatctcggcgttgtagttggcaattac
 tcaccggaattggagccactgcgcagctacgagcgcgtctattttgctgagggccactatg
 ctaatggcattctggaagccttaaaacactatcgcttttttgaggcgatcgcttaa

20

Alternativamente, la enzima PSP puede ser reemplazada por las enzimas encargadas de realizar cada una de las actividades enzimáticas que presenta la enzima PSP, es decir, una enzima con actividad glucosiltransferasa que sintetiza sacarosa-6-fosfato a partir de UDP-Glc y/o ADP-Glc y Fru-6-P, y otra enzima con actividad fosfohidrolasa específica. Enzimas con actividad glucosiltransferasa, así como enzimas con actividad fosfohidrolasa, son conocidas en el estado de la técnica, e igualmente la secuencia de nucleótidos que las codifica puede ser optimizada para su expresión en *Synechococcus* sp., en particular *S. elongatus*, más en particular, *S. elongatus* PCC7942.

30

- Un transportador de sacarosa a través de la membrana celular. Ejemplos de transportadores de sacarosa incluyen, sin limitar a, SoSUT1 (transportador de sacarosa procedente de la espinaca (*Spinacea oleracea*)), OsSUT1, OsSUT2, OsSUT3, OsSUT4 y OsSUT5 (transportadores de sacarosa procedentes del arroz (*Oryza sativa*)), HvSUT1 y HvSUT2 (transportadores de sacarosa procedentes de la cebada (*Hordeum vulgare*)), TaSUT1A, TaSUT1B y TaSUT1D (transportadores

35

de sacarosa procedentes del trigo (*Triticum aestivum*)), AcSUT1 (transportador de sacarosa procedente de la piña (*Anana comosus*)), BoSUT1 (transportador de sacarosa procedente de bambú (*Bambusa oldhamii*)), y SbSUT1 y SbSUT4 (transportadores de sacarosa procedentes de sorgo (*Sorghum bicolor*)). Las

5 secuencias de nucleótidos y aminoácidos correspondientes a estos transportadores de sacarosa están disponibles en bases de datos públicas accesibles al experto en la materia.

En una realización particular, el transportador de sacarosa es la permeasa de sacarosa o CSCB. La permeasa de sacarosa o CSCB (en inglés CSCB o *sucrose permease*) es responsable del transporte de sacarosa junto con la importación simultánea de protones. Este transportador presenta la ventaja de que es funcional en condiciones de pH alcalino, lo que le convierte en el transportador de sacarosa

10 óptimo para su uso por las cianobacterias, en particular, por *S. elongatus* PCC7942.

En una realización particular, la proteína CSCB es la proteína CSCB de *E. coli*. En otra realización particular, la proteína CSCB comprende una secuencia de aminoácidos que presenta, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% de

15 identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 13. En otra realización particular, la proteína CSCB comprende, o consiste en, una secuencia de nucleótidos que presenta un 100% de identidad de secuencia con la secuencia SEQ ID NO: 13.

20

SEQ ID NO: 13:

MALNIPFRNAYYRFASSYSFLFFISWSLWWSLYAIWLKGHLGLTGTELGTLYSVNQFTSIL
FMMFYGIVQDKLGLKKPLIWCMFSLVLTGPFMIYVYEPLLQSNFSVGLILGALFFGLGYL
25 AGCGLLDSFTEKMARNFHFEYGTARAWGSFGYAIGAFAFFAGIFFSISPHINFVLVSLFGAVF
MMINMRFKDKDHQCVAADAGGVKKEDFIAVFKDRNFWVFVIFIVGTWSFYNIQDQLFPVF
YSGLFESHVDVGTRLYGYLNSFQVVLEALCMAIIPFFVNRVGPKNALLIGVVIMALRILSCA
LFVNPWIIISLVKLLHAIEVPLCVISVFKYSVANFDKRLSSTIFLIGFQIASSLGIVLLSTP
TGILFDHAGYQTVFFAISGIVCLMLLFGIFFLSKKREQIVMETPVPSAI -

30

En la presente invención, todas las secuencias de aminoácidos que presentan una identidad de secuencia de, al menos, un 70% con la secuencia SEQ ID NO: 13 se consideran variantes funcionalmente equivalentes de la proteína CSCB, es decir, aunque comprenden distinta secuencia de aminoácidos, son capaces de

35 transportar sacarosa junto con la simultánea importación de protones. Un ensayo

para determinar si un transportador dado es una variante funcionalmente equivalente del transportador CSCB incluye, sin limitar a, un ensayo de monitorización de la reacción de transporte 2.A.1.5.3 por la proteína dada. Llevar a cabo la monitorización de la reacción de transporte 2.A.1.5.3 por una proteína transportadora es práctica de rutina para el experto en la materia.

En otra realización particular, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína CSCB comprende una secuencia de nucleótidos que presenta, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 14.

En otra realización particular, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína CSCB comprende, o consiste en, la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 14. No obstante, como entiende el experto en la materia, en muchas ocasiones la secuencia de nucleótidos tiene que ser optimizada para su expresión en un sistema celular distinto del de origen. Por este motivo, en otra realización particular, el gen que codifica la enzima CSCB comprende, o consiste en, una secuencia de nucleótidos, optimizados para su correcta expresión en *Synechococcus* sp, en particular *S. elongatus*, más en particular, *S. elongatus* PCC7942, que presenta un 100% de identidad de secuencia con la secuencia SEQ ID NO: 15.

SEQ ID NO: 14

```

atggcactgaatattccattcagaaatgcgtactatcgttttgcatccagttactcattt
ctcttttttatttcctggtcgctgtggtggcgttatacgctatttggtgaaaggacat
ctagggttgacaggacggaattaggtacactttattcgggtcaaccagtttaccagcatt
ctatttatgatgttctacggcatcgttcaggataaactcgggtctgaagaaaccgctcatc
tgggtgatgagtttcatcctggtccttgaccggaccgtttatgattttacgtttatgaaccg
ttactgcaaagcaatttttctgtaggtctaattctggggcgctattttttggttgggg
tatctggcgggatgcggtttgcttgatagcttcaccgaaaaaatggcgcgaaattttcat
ttcgaatatggaacagcgcgccctggggatcttttggtatgctattggcgcggttcttt
gccggcatattttttagtatcagtccccatatcaacttctggttgggtctcgctatttggc
gctgtatttatgatgatcaacatgcgttttaagataaggatcaccagtgcgtagcgcca
gatgcgggaggggtaaaaaaagaggattttatcgagttttcaaggatcgaaacttctgg
gttttcgtcatattttattgtggggacgtggtctttctataacatttttgatcaacaactt
tttctgtctttttattcaggtttattcgaatcacacgatgtaggaacgcgcctgtatggt
tatctcaactcattccaggtggtactcgaagcgctgtgcatggcgattattcctttcttt
gtgaatcgggtagggccaaaaaatgcattacttatcggagttgtgattatggcggttgcgt

```

atcctttcctgcgcgctgttcgttaacccctggattatttcatttagtgaagttgttacat
gccattgaggttccactttgtgtcatatccgtcttcaaatacagcgtggcaaactttgat
aagcgctgtcgtcgacgatctttctgattggttttcaaattgccagttcgcttgggatt
gtgctgctttcaacgccgactgggatactctttgaccacgcaggctaccagacagttttc
5 ttcgcaatttcgggtattgtctgcctgatgttgctatttggcattttcttcttgagtaaa
aaacgcgagcaaatagttatggaaacgcctgtaccttcagcaatatag

SEQ ID NO: 15

atggcactgaatattccattccgaaatgcgtactatcgttttgcatccagttactcgtttc
10 tcttttttatttcctggctgctgtggtggcgttgtagcgtatttggctgaaaggacatct
agggttgacagggacggaattaggtacactgtattcgggtcaaccagtttaccagcattcta
tttatgatgttctacggcatcgttcaggataaactcgggtctgaagaaaccgctcatctggt
gtatgagtttcatcctggtcttgaccggaccgtttatgattttacgtttatgaaccgttgct
gcaaagcaatttttctgtgggtctaattctgggggcgctattttttggcttggggatctg
15 gcgggatgcggtttgcttgatagcttcaccgaaaaaatggcgcaaattttcatttcgaat
atggaacagcgcgcgcctggggatcttttggtatgctattggcgcggttctttgccggcat
cttttttagtatcagtccccatatcaacttctgggttggtgctgctatttggcgctgtattt
atgatgatcaacatgcgttttaagataaggatcaccagtgcgtagcggcagatgcgggag
gggtcaaaaaagaggattttatcgcagttttcaaggatcgaaacttctgggttttcgtcat
20 ctttattgtggggacgtgggtctttctataacatttttgatcaacaactgtttcctgtcttt
tattcaggtttattcgaatcgacgatgtaggaacgcgcctgtatggttatctcaactcat
tccaggtggtcctcgaagcgtgtgcatggcgattattcctttctttgtgaatcgggtggg
gccaaaaaatgcattacttatcggagttgtgattatggcggttgctatcctgtcctgcgcg
ctgttcgttaacccctggattatttcattggtgaagttgttacatgccattgaggttccac
25 tttgtgtcatctccgtgttcaaatacagcgtggcaaactttgataagcgctgtcgtccac
gatctttctgattggttttcaaattgccagttcgcttgggattgtgctgctttcgacgccg
actgggattctctttgaccacgcaggctaccagacagttttcttcgcaatttcgggtattg
tctgcctgatgttgctatttggcattttcttcttgagtaaaaaacgcgagcaaatcgttat
ggaaacgcctgtaccttcagcaatctag

30

En la presente invención, el término "variante" significa un polipéptido o proteína que tiene la misma actividad que un polipéptido o proteína de referencia, pero que comprende una alteración en la secuencia de aminoácidos, es decir, una sustitución, inserción y/o deleción, en una o más (p.ej., varias) posiciones. Una sustitución significa
35 el reemplazo del aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una deleción significa la deleción del aminoácido que ocupa una posición; y una inserción

significa agregar un aminoácido adyacente e inmediatamente después del aminoácido que ocupa una posición. Los cambios en los aminoácidos pueden ser de una naturaleza menor, es decir, sustituciones o inserciones de aminoácidos conservadoras que no afectan significativamente al plegamiento y/o la actividad del polipéptido/de la proteína; pequeñas delecciones, típicamente de 1-30 aminoácidos; pequeñas extensiones amino o carboxilo-terminales, tales como un residuo de metionina amino-terminal; un péptido enlazador pequeño de hasta 20-25 residuos; o una pequeña extensión que facilita la purificación cambiando la carga neta u otra función, como una cola de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión. Los ejemplos de sustituciones conservadoras están dentro de los grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrófobos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Las sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica son conocidas en la técnica. Las sustituciones comunes son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly.

En el contexto de la presente invención también se contemplan fragmentos de las proteínas codificadas por las secuencias de nucleótidos de la invención, siempre y cuando dichos fragmentos puedan desempeñar la función de la proteína completa. Así, el término "fragmento" se refiere a una proteína o polipéptido con uno o más (por ejemplo, varios) aminoácidos ausentes del terminal amino y/o carboxilo de la proteína o el polipéptido; donde el fragmento tiene la actividad de la proteína completa. Ensayos para averiguar si un fragmento de una proteína tiene la misma actividad/función que la proteína completa han sido descritos en párrafos anteriores para el caso de las variantes de las proteínas.

En la presente invención, se entiende por "identidad" o "identidad de secuencia" al grado de similitud entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos obtenido mediante el alineamiento óptimo de las dos secuencias. Dependiendo del número de residuos comunes entre las secuencias alineadas, se obtendrá un grado de identidad expresado en tanto por ciento. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo

BLAST. Los programas BLAST, por ejemplo, BLASTN, BLASTX, and TBLASTX, BLASTP and TBLASTN, son de dominio público en la página web de *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

- 5 Una característica de la cianobacteria de la invención es que las secuencias de nucleótidos (i) a (v) citadas arriba están sobreexpresadas con respecto a una cianobacteria no recombinante o *wild type*, y las secuencias de nucleótidos (i), (ii), (iii) y (v) son heterólogas.
- 10 En la presente invención se entiende por “heteróloga” a aquella secuencia de nucleótidos (o aminoácidos) que deriva o procede de una especie distinta de la especie de referencia. En el contexto de la presente invención, la especie de referencia es *S. elongatus*.
- 15 Tal como se ha indicado en párrafos anteriores, los codones de las secuencias de nucleótidos de la invención pueden estar optimizados para su expresión en cianobacterias, es decir, la secuencia de nucleótidos ha sido alterada con respecto a la secuencia de nucleótidos original de forma que uno o más codones de la secuencia de nucleótidos han sido cambiados a un codón diferente que codifica el mismo aminoácido,
- 20 pero que es utilizado con más frecuencia por la célula huésped (en la presente invención, una cianobacteria) que el codón original. La degeneración del código genético hace que todos los aminoácidos excepto metionina y triptófano estén codificados por más de un condón. Por ejemplo, arginina, leucina y serina están codificados por 6 codones diferentes, pero muchos organismos usan ciertos codones
- 25 con más frecuencia que otros. Como las secuencias de nucleótidos de la invención son heterólogas a la célula huésped, cabe la posibilidad de optimizar la secuencia de nucleótidos para su expresión en cianobacterias.

- 30 Las secuencias de nucleótidos de la invención pueden formar de parte de una o más construcciones genéticas que serán introducidas en una cianobacteria para obtener la cianobacteria de la invención. La introducción de las secuencias de nucleótidos de la invención o de la construcción/es génica/s que comprenden dichas secuencias de nucleótidos puede realizarse mediante el empleo de un vector, por ejemplo, un vector de expresión. Por lo tanto, la presente invención también se relaciona con una
- 35 construcción génica que comprende, al menos, una secuencia de nucleótidos de la

- invención. La construcción génica puede comprender, además, los elementos necesarios para la expresión de la/s secuencia/s de nucleótidos de la invención. Dichos elementos incluyen, sin limitar a, promotores, terminadores de la transcripción, marcadores de selección, orígenes de replicación, potenciadores de la expresión (5 *enchancers*) y sitios de unión a ribosomas (RBS). Terminadores alternativos de la transcripción incluyen el terminador T1 del operon *rrnB* de *E. coli* y T0 del fago lamda, TE del colifago T7, entre otros. Alternativos RBS incluyen aquellos de la librería Anderson, desde BBa_J61100 hasta BBa_J61139.
- 10 Una o más de las secuencias de nucleótidos de la invención pueden estar unidas operativamente con un promotor que puede actuar en las cianobacterias hospedadoras. Preferentemente, el promotor puede actuar de forma eficiente en las cianobacterias y en bacterias, tales como *E. coli*. La selección del promotor puede permitir la expresión de un producto génico deseado en una diversidad de condiciones. Los promotores 15 pueden seleccionarse para una función óptima en una cianobacteria, de manera que se inserte la construcción del vector. Los promotores pueden seleccionarse también basándose en sus características reguladoras. Los ejemplos de dichas características incluyen mejora de la actividad de transcripción e inducibilidad.
- 20 El promotor puede ser un promotor inducible. Por ejemplo, el promotor puede inducirse de acuerdo con la temperatura, el pH, una hormona, un metabolito (por ejemplo, lactosa, manitol, un aminoácido), la luz (por ejemplo, longitud de onda específica), un metal pesado o un antibiótico. Los expertos en la materia conocen numerosos promotores inducibles estándar.
- 25 El promotor puede ser un promotor inducible por temperatura. Por ejemplo, el promotor Lambda es un promotor inducible por temperatura que puede actuar en cianobacterias. En cianobacterias, el promotor Lambda alcanza su actividad máxima aproximadamente a entre 30°C y 35°C, un intervalo de temperatura de crecimiento ideal para las 30 cianobacterias y un intervalo mucho menor que la expresión óptima del promotor Lambda en *E. coli*. Así, el promotor Lambda proporciona una expresión efectiva de la actividad biosintética de disacáridos en las cianobacterias.
- Los ejemplos de promotores que pueden insertarse en la construcción génica incluyen, 35 pero no se limitan a, a los promotores de los genes *carB*, *nirA*, *psbAII*, *cpcB*, *cpt* y sus

variantes sintéticas, dnaK y kaiA. En una realización particular, el promotor es el promotor Ptrc. El promotor Ptrc es un promotor híbrido de los promotores lac y trp, que comprende la secuencia operadora lacO a la que se une el represor LacI. El represor se une al operador y con alta especificidad e inhibe la expresión hasta que el inductor como la alolactosa o el IPTG se añade al medio. El inductor se une al represor y éste no puede unirse al operador, permitiendo a la ARN polimerasa que se una al promotor e inicie la transcripción de la/s secuencia/s de nucleótidos controlados por el promotor.

Los marcadores de selección son ampliamente conocidos en el estado de la técnica. Estos marcadores de selección, o genes de selección, pueden ser genes de resistencia a antibióticos, genes reporteros, como el gen que codifica la beta-galactosidasa del operón lactosa, etc. Entre los genes que confieren resistencia a antibióticos se incluyen, sin limitar a, ampicilina, tetraciclina, kanamicina, higromicina, gentamicina, etc. Los marcadores permiten la selección de las células transformadas satisfactoriamente que crecen en un medio que contiene el antibiótico correspondiente porque llevan el gen de resistencia apropiado. En una realización particular de la presente invención, la construcción comprende el gen de resistencia a gentamicina o el gen de resistencia a cloranfenicol.

Por otro lado, las secuencias de nucleótidos de la invención pueden agruparse para estar bajo el control del mismo promotor, dando lugar así a operones. Tal como se ha explicado anteriormente, en la presente invención se entiende por “operón” a la unidad genética funcional formada por un grupo de genes capaces de ejercer una regulación de su propia expresión por medio de los sustratos con los que interactúan las proteínas codificadas por sus genes. Así, en una realización particular de la invención de la invención, la sobreexpresión de las secuencias de nucleótidos (i), (ii) y (iii) de la invención está bajo el control de un operón “A” que comprende un promotor funcional en cianobacterias, y/o la sobreexpresión de las secuencias de nucleótidos (iv), y (v) está bajo el control de un operón “B” que comprende un promotor funcional en cianobacterias (promotor igual o distinto del anterior). En una realización particular, el operón “A” comprende, o consiste en, la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 19 y/o en otra realización particular, el operón “B” comprende, o consiste en, la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 20.

SEQ ID NO: 19:

aggagctccaccgatcaagcttttgacataagcctgttcgggttcgtaaactgtaatgcaagtag
 cgtatgcgctcacgcaactgggtccagaaccttgaccgaacgcagcgggtggtaacggcgagtg
 cggttttcatggcttggtatgactgtttttttgtacagtctatgcctcgggcatccaagcagca
 agcgcggttacgccgtgggtcgatgtttgatgttatggagcagcaacgatgttacgcagcagcaa
 5 cgatgttacgcagcagggcagtcgccctaaaacaaagttaggtggctcaagtatgggcatcatt
 cgcacatgtaggctcggccctgaccaagtcaaattccatgcgggctgctcttgatcttttcggtc
 gtgagttcggagacgtagccacctactcccaacatcagccggactccgattacctcgggaactt
 gctccgtagtaagacattcatcgcgcttgctgccttcgaccaagaagcgggttggtggcgctctc
 gcggcttacgttctgcccagggtttgagcagccgcgtagtgagatctatatctatgatctcgcag
 10 tctccggcgagcaccggaggcagggcattgccaccgcgctcatcaatctcctcaagcatgaggc
 caacgcgcttggtgcttatgtgatctacgtgcaagcagattacggtgacgatcccgcagtggtc
 ctctatacaaagttaggcatacgggaagaagtgatgcactttgatatcgaccaagtaccgcca
 cctaacaattcgttcaagccgagatcgggttcccggccgcggagtgttcggtaaattgtcaca
 acgccgcggccggatccggtaccctgaaatgagctgttgacaattaatcatccggctcgtataa
 15 tgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacactactagagtagtgagggttactaaatgaaa
 aacatcaatccaacgcagaccgctgcctggcaggcactacagaaacacttcgatgaaatgaaag
 acgttacgatcgccgatctttttgctaaagacggcgatcgctttttctaagttctccgcaacctt
 cgacgatcagatgctggtggattactccaaaaaccgcatcactgaagagacgctggcgaaatta
 caggatctggcgaaagagtgcgatctggcgggcgcgattaagtcgatgttctcgggcgagaaga
 20 tcaaccgcactgaaaaccgcgccgtgctgcacgtggcgctgcgtaaccgcagcaataccccgat
 tttggttgatggcaaagacgtcatgccggaagtcaacgcggtgctggagaagatgaaaaccttc
 tcagaagcgattatttccggtgagtggaagggttataccggcaaagcaatcactgacgtagtga
 acatcgggatcggcggttcggacctcggccatacatggtgaccgaagctctgcggccgtacaa
 aaaccacctgaacatgcactttgtttctaacgtcgatgggactcacatcgcggaagtgtgaaa
 25 aaagtgaaccggaaaccacgctgttcttggtagcatcgaaaaccttcaccactcaggaaacta
 tgaccaacgcccatagcgcgctgactgggttcctgaaagcggcaggtgatgaaaaacacgttgc
 aaaacactttgcggcgctttccaccaatgccaaagccgttggcgagtttggtattgatactgcc
 aacatgttcgagttctgggactgggttggcggccggtactctttgtggtcagcgattggcctgt
 cgattgttctctccatcggcttttgataacttcgttgaactgctttccggcgccacacgcgatgga
 30 caagcatttctccaccacgcctgccgagaaaaacctgcctgtcctgctggcgctgattggcatc
 tgggtacaacaatttcttttggtgcggaaactgaagcgattctgccgatgaccagtatatgcacc
 gtttcgcggcgctacttccagcagggcaatatggagtccaacggtaagtatgttgaccgtaacgg
 taacgttggtgattaccagactggccccgattatctggggtgaaccaggcactaacggtcagcac
 gcgttctaccagctgatccaccagggaacccaaaatggtgccgtgcgatttcatcgctccggcta
 35 tcaccataaccgctctctgatcatcaccagaaactgctgtcgaacttcttcgccagaccga
 agcgctggcggtttggtaaatcccgcgaagtgggttgagcaggaatatcgcgatcagggtaaatg

ccggcaacgcttgactacgtggtgccgttcaaagtattcgaaggtaaccgcccgaaccaactcca
 tcctgctgctgaaatcactccgttcagcctgggtgcttgattgctgctgtagcacaaaat
 ctttactcagggcgatcctgaacatcttcaccttcgaccagtggggcgaggaaactgggtaaa
 cagctggcgaaccgtattctgccagagctgaaagatgataaagaaatcagcagccacgatagct
 5 cgaccaatggtctgattaaccgctataaagcgtggcgcggttaataaaatgagagtagtggagg
 ttactaaatggcaatccacaatcgcgagggccaacctgcacaacagagtgatttgattaacgtc
 gccaactgacggcgcaatattatgtgctgaaaccagaagcagggaaatgcggagcacgcggtga
 aattcggtacttccggtcacggggcgagtcgagcgccacagctttaacgagccgcacattct
 ggcatcgctcaggcaattgctgagaacgcgcgaaaaacggcatcactggcccttgctatgtg
 10 ggtaaagatactcacgccctgtccgaacctgcattcatttccgttctggaagtgctggcagcga
 acggcggtgatgtcattgtgcaggaaaacaatggcttcaccccgacgcctgccgtttccaatgc
 catcctgggttcacaataaaaaagggtggcccgctggcagacgggtatcgtgattacacgtcccat
 aaccgcgggaagatggtggaatcaaatacaatccgccaatggtggcccggtgataccaacg
 tcaactaaagtggaggacggggccaacgcactgctggccgatggcctgaaaggcgtgaagcg
 15 tatctccctcgacgaagcgatggcatccggtcatgtgaaagagcaggatctggtgcagccgttc
 gtggaaggctctggccgatatcggtgatatggccgcgattcagaaagcgggcctgacgtgggcg
 ttgatccgctgggcggttccggtatcgaatactggaagcgcattggcgagattacaacctcaa
 cctgactatcggttaacgatcaggctgatcaaaccttccgctttatgcaccttgataaagacggc
 gcgatccgatggactgctcctccgagtgctgcgatggcgggcctgctggcactgctgataagt
 20 tcgatctggcggttgtaacgacccggattatgaccgccacgggtatcgtcactccggcaggttt
 gatgaatccgaaccactacctggcggtggcaatcaattacctgttccagcatcgtccgcagtg
 ggcaaagatgttgccgctcggtaaaacgctgggtttcatcggcgatgatcgaccgtgtggtcaacg
 acttgggcccgtaaactggtagaagtcccggtagggtttcaaatgggttgcgatggtctgttcga
 cggcagcttcggcttggcgggcgaagagagtgcaggggttcccttctgcttgcggttcgacggcacg
 25 ccgtggtccaccgacaaagacggcatcatcatgtgtctgctggcgggcgaaatcaccgctgtca
 ccggttaagaaccgcaggaacactacaacgaactggcaaacgctttggtgcccagctacaa
 ccgtttgcaggcagctgcgacttccgcacaaaaagcggcgctgtctaagctgtctccggaaatg
 gtgagcgccagcaccctggcaggtgacccgatcaccgcgcgctgactgctgctccgggcaacg
 gtgcttctattggcggtctgaaagtgatgactgacaacggctgggttcgcccgcgctccgtcagg
 30 cacggaagatgcatataagatctactgcgaaagtttctcgggtgaagaacatcgcaagcagatt
 gaaaaagaagcgggttgagattggttagcgaagttctgaaaaacgcgtaataaaggtagagtagtg
 gaggttactaaatggctgccattaatacgaagtcaaaaaagccgttatccccgttgccgggatt
 gggaaccggatgttgccggcgacgaaagccatcccgaagagatgctgccactggctcgataag
 ccattgattcaatacgtcgtgaatgaatgtattgcggctggcattactgaaattgtgctgggtta
 35 cacactcatgaaaaactctattgaaaaccactttgataccagttttgaaactggaagcaatgct
 ggaaaaacgcgtaaaacgtcaactgcttgatgaagtgcagtcgatttgtccaccgcacgtgact

attatgcaagttcgccagggctctggcgaaaggcctgggacacgcggtgttggtgctcaccg
 tcgtgggtgatgaaccggtggctgttattttgcctgatgttattctggatgaatatgaatccga
 tttgtcacaggataacctggcagagatgatccgccgctttgatgaaacgggtcatagccagatc
 atggttgaaccggttgctgatgtgaccgcatatggcggttggtgattgcaaaggcgttgaattag
 5 cgccgggtgaaagcgtgccgatggttgggtggtcgaaaaaccgaaagcggatgttgccgctc
 taatctcgctattgtgggtcggttacgtactcagcgcggatatttggccgttgctggcaaaaacc
 cctccgggagctggtgatgaaattcagctcaccgacgcaattgatatgctgatcgaaaaagaaa
 cgggtggaagcctatcatatgaaagggaagagccatgactgcggtaataaattaggttacatgca
 ggccttcgttgaatacggatttcgtcataacacccttggcacggaatttaaagcctggcttgaa
 10 gaagagatgggcattaagaagtaataaagggtccaggcatcaaataaacgaaaggctcagtcga
 aagactgggcctttcgttttatctgtttgttgctcggtgaacgctctctactagagtcacactgg
 ctcaccttcgggtgggcctttctgcgtttatagtcgacctcgagggggggcccggtaccttctg

SEQ ID NO: 20:

15 GATCTGTTTTTGTTCCTGCAATGACCATTGCTGAGGAGTTCCCATGAAAATCAAGTCATCGATT
 TCTGTGCTCGCTGCGATATTTTCTGCTTAACCGCTGAAAGTACGTCCATATAAATGCCTCTAT
 TAGTTAGCGCTATCGCGCGAAAAGAATGGTGATATAAGGGGCATCGCTGCCCTTCAGCATCAG
 TTAAACGTATTTAAATGGCCACTAGTAGGTGGGGTACCCTGAAATGAGCTGTTGACAATTAATC
 ATCCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACTACTAGAGTAGTGGA
 20 GGTTACTAAATGGCAGCTCAAAatctctacattctgcacattcagacccatggtctgctgcgag
 ggcagaacttggaactggggcgagatgccgacaccggcgggcagaccaagtacgtcttagaact
 ggctcaagcccaagctaaatccccacaagtccaacaagtcgatatcatcaccgccaatcacc
 gacccccgcgtcagtggttggttacagtcaggcgatcgaaccctttgcgccccaaaggctcgattg
 tccgtttgccttttggcccaaacgctacctccgtaaagagctgctttggccccatctctacac
 25 ctttgcggatgcaattctccaatatctgggtcagcaaaagcgcaccccgacttgattcaggcc
 cactatgctgatgctggccaagtgggatcactgctgagtcgctggttgaatgtaccgctaattt
 tcacagggcattctctggggaggatcaagctaaaaaagctggttgagcaagactggccgcttga
 ggaaattgaagcgcaattcaatattcaacagcgaattgatgcggaggagatgacgctcactcat
 gctgactggattgtcgccagcactcagcaggaagtggaggagcaataaccgcgtttacgatcgct
 30 acaaccagagcgcgaagctggtcattccaccgggtgtcgataccgatcgcttcaggtttcagcc
 cttgggcgatcgcggtgttgttctccaacaggaactgagccgctttctgcgcgaccagaaaaa
 cctcaaattctctgcctctgtcgccccgcacctcgcaaaaatgtaccggcgctggtgcgagcct
 ttggcgaacatccttggctgcgcaaaaaagccaaccttgtcttagtactgggcagccgccaaga
 catcaaccagatggatcgcggcagtcggcaggtgttccaagagattttccatctggtcgatcgc
 35 tacgacctctacggcagcgtcgccctatcccaaacagcatcaggctgatgatgtgccggagttct
 atcgccctagcggctcattccggcggggtattcgtcaatccggcgctgaccgaaccttttggttt

gacaat t t t t g g a g g c a g g a a g c t g c g g c g t g c c g g t g g t g g c a a c c c a t g a t g g c g g c c c c c a g
 g a a a t t c t c a a a c a c t g t g a t t t c g g c a c t t t a g t t g a t g t c a g c c g a c c c g c t a a t a t c g c g a
 c t g c a c t c g c c a c c c t g c t g a g c g a t c g c g a t c t t t g g c a g t g c t a t c a c c g c a a t g g c a t t g a
 a a a g t t c c c g c c c a t t a c a g c t g g g a t c a a c a t g t c a a t a c c c t g t t t g a g c g c a t g g a a a c g
 5 g t g g c t t t g c c t c g t c g t c g t g t c a g t t t c g t a c g g a g t c g c a a a c g c t t g a t t g a t g c c a
 a a c g c c t t g t c g t t a g t g a c a t c g a c a a c a c a c t g t t g g g c g a t c g t c a a g g a c t c g a a a a t t t
 a a t g a c c t a t c t c g a t c a g t a t c g c g a t c a t t t t g c c t t t g g a a t t g c c a c g g g g c g t c g c c t a
 g a c t c t g c c c a a g a a g t c t t g a a a g a g t g g g g c g t t c c t t c g c c a a a c t t c t g g g t g a c t t c c g
 t c g g c a g c g a g a t t c a c t a t g g c a c c g a t g c t g a a c c g g a t a t c a g c t g g g a a a a g c a t a t c a a
 10 t c g c a a c t g g a a t c c t c a g c g c a t t c g g g c a g t a a t g g c a c a a c t a c c c t t t c t t g a a c t g c a a
 c c g g a a g a g g a t c a a a c a c c c t t c a a a g t c a g c t t c t t t g t c c g c g a t c g c c a c g a g a c t g t g c
 t g c g a g a a g t a c g g c a a c a t c t t c g c c g c c a t c g c c t g c g g c t g a a g t c a a t c t a t t c c c a t c a
 g g a g t t t c t t g a c a t t c t g c c g c t g g c t g c c t c g a a a g g g g a t g c g a t t c g c c a c c t c t c a c t c
 c g c t g g c g g a t t c c t c t t g a g a a c a t t t t g g t g g c a g g c g a t t c t g g t a a c g a t g a g g a a a t g c
 15 t c a a g g g c c a t a a t c t c g g c g t t g t a g t t g g c a a t t a c t c a c c g g a a t t g g a g c c a c t g c g c a g
 c t a c g a g c g c g t c t a t t t t g c t g a g g g c c a c t a t g c t a a t g g c a t t c t g g a a g c c t t a a a a c a c
 t a t c g c t t t t t t g a g g c g a t c g c t t a a t a a a a t g a g a g t a g t g g a g g t t a c t a a a t g g c a c t g a
 a t a t t c c a t t c c g a a a t g c g t a c t a t c g t t t t g c a t c c a g t t a c t c g t t t c t c t t t t t a t t t c
 c t g g t c g c t g t g g t g g t c g t t g t a c g c t a t t t g g c t g a a a g g a c a t c t a g g g t t g a c a g g g a c g
 20 g a a t t a g g t a c a c t g t a t t c g g t c a a c c a g t t t a c c a g c a t t c t a t t t a t g a t g t t c t a c g g c a
 t c g t t c a g g a t a a a c t c g g t c t g a a g a a c c g c t c a t c t g g t g t a t g a g t t t c a t c c t g g t c t t
 g a c c g g a c c g t t t a t g a t t t a c g t t t a t g a a c c g t t g c t g c a a a g c a a t t t t t c t g t g g g t c t a
 a t t c t g g g g c g c t a t t t t t t g g c t t g g g g t a t c t g g c g g g a t g c g g t t t g c t t g a t a g c t t c a
 c c g a a a a a t g g c g c g a a a t t t t c a t t t c g a a t a t g g a a c a g c g c g c c t g g g g a t c t t t t g g
 25 c t a t g c t a t t g g c g c g t t c t t t g c c g g c a t c t t t t t a g t a t c a g t c c c c a t a t c a a c t t c t g g
 t t g g t g t c g c t a t t t g g c g c t g t a t t t a t g a t g a t c a a c a t g c g t t t t a a g a t a a g g a t c a c c
 a g t g c g t a g c g g c a g a t g c g g g a g g g t c a a a a a a g a g g a t t t t a t c g c a g t t t t c a a g g a t c g
 a a a c t t c t g g g t t t t c g t c a t c t t t a t t g t g g g g a c g t g g t c t t t c t a t a a c a t t t t t g a t c a a
 c a a c t g t t t c c t g t c t t t t a t t c a g g t t t a t t c g a a t c g c a c g a t g t a g g a a c g c g c c t g t a t g
 30 g t t a t c t c a a c t a t t c c a g g t g g t c c t c g a a g c g c t g t g c a t g g c g a t t a t t c c t t t c t t t g t
 g a a t c g g g t g g g g c c a a a a a a t g c a t t a c t t a t c g g a g t t g t g a t t a t g g c g t t g c g t a t c c t g
 t c c t g c g c g t g t t c g t t a a c c c c t g g a t t a t t t c a t t g g t g a a g t t g t t a c a t g c c a t t g a g g
 t t c c a c t t t g t g t c a t c t c c g t g t t c a a a t a c a g c g t g g c a a a c t t t g a t a a g c g c c t g t c g t c
 c a c g a t c t t t c t g a t t g g t t t t c a a a t t g c c a g t t c g c t t g g g a t t g t g c t g c t t t c g a c g c c g
 35 a c t g g g a t t c t c t t t g a c c a c g c a g g c t a c c a g a c a g t t t t c t t c g c a a t t t c g g g t a t t g t c t
 g c c t g a t g t t g c t a t t t t g g c a t t t t c t t c t t g a g t a a a a a c g c g a g c a a a t c g t t a t g g a a a c

gcctgtaccttcagcaatctagtaaaggctggttgacaccatcgaatgggtgcaaaccttttcgcg
 gtatggcatgatagcgcccgaagagagtcaattcaggggtggtgaatatgaaaccagtgacggt
 gtacgatgtcgcagagtatgccggtgtctcgtatcagaccgtttcccgcgtggtgaaccaggcc
 agccacgtttctgcgaaaacgcgggaaaaagtggagcgcgatggcggagctgaattacattc
 5 ccaaccgcgtggcacaacaactggcgggcaaacagtcggttgctgattggcgttgccacctccag
 tctggccctgcacgcgccgtcgcaaattgtcgcggcgattaaatcgcgcgccgatcaactgggt
 gccagcgtggtggtgtcgatggtggaacgaagcggcgtcgaagcctgtaaagcggcgggtgcaca
 atcttctcgcgcaacgcgtcagtgggctgatcattaactatccgctggatgaccaggatgccat
 tgctgtggaagctgcctgcactaatgttccggcggtgtttcttgatgtctcggaccagacaccc
 10 atcaacagtatatttttctcccatgaggacggtacgcgactgggcgtggagcatctggtcgc
 tgggtcaccagcaaatacgcgctgttggcgggcccattaagtctgtctcggcgcgccgtgcgtct
 ggctggctggcataaatactcactcgcaatcaaattcagccgatcgcggaacgggaaggcgac
 tggagtgccatgtccggttttcaacaacacatgcaaattgctgaatgagggcatcgttccactg
 cgatgctggttgccaacgatcagatggcgctgggcgcaatgcgcgccattaccgagtcggggct
 15 gcgcgttggtgcggatatctcggtagtgggatacgacgataccgaagatagctcatgttatatc
 ccgccgttaaccaccatcaaacaggattttcgcctgctggggcaaaccagcgtggaccgcttgc
 tgcaactctcgcagggccaggcgggtgaagggcaatcagctgttggccgtctcactggtgaaacg
 aaaaaccaccctggcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgttggccgattcggttaatg
 cagctggcacgacaggtttcccgactggaaagcgggcagtgataaagggtccaggcatcaaataa
 20 aacgaaaggctcagtcgaaagactgggcctttcgttttatctgttggttgctggtgaacgctct
 ctactagagtcacactggctcaccttcgggtgggcctttctgcgtttatagtcgacctcgagct
 agcaagcttagatcgatccgtcacacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaaagt
 ctcatcattgaaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctgttgagatcca
 gttcgatgtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatcttttactttcaccagcgtttc
 25 tgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgt
 tgaatactcatactcttccctttttcaatattattgaagcatttatcaggggttatgtctcatga
 gcggatacatatttgatgtatttagaaaaataaacaataaggggttcgcgcacattttccccg
 aaaagtgccacctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaacctataaaaaataggcgt
 atcacgaggccctttcgtcttcgaataaatacctgtgacggaagatcacttcgcagaataaata
 30 aatcctggtgtccctgttgataccgggaagccctgggccaacttttggcgaaaatgagacggtg
 atcggcacgtaagagggtccaactttcaccataatgaaataagatcactaccgggcgtattttt
 tgagttatcgagattttcaggagctaaggaagctaaaatggagaaaaaatcactggatatacc
 accggtgatataatcccaatggcatcgtaaagaacattttgaggcatttcagtcagttgctcaat
 gtacctataaccagaccgttcagctggatattacggcctttttaaagaccgtaaagaaaaataa
 35 gcacaagttttatccggcctttattcacattcttggccgcctgatgaatgctcatccggaattc
 cgtatggcaatgaaagacgggtgagctggtgatatgggatagtggtcacccttggtacaccggtt

tccatgagcaaactgaaacgttttcatcgctctggagtgaataccacgacgatttccggcagtt
 tctacacatatattcgcaagatgtggcgtgttacggtgaaaacctggcctatttccctaaaggg
 ttattgagaatatgttttctcagccaatccctgggtgagtttcaccagttttgatttaa
 acgtggccaatatggacaacttcttcgcccccgtttccaccatgggcaaattataacgcaagg
 5 cgacaagggtgctgatgccgctggcgattcaggttcatcatgccgtttgtgatggcttccatgtc
 ggcagaatgcttaatgaattacaacagtactgcgatgagtggcagggcggggcgtaattttttt
 aaggcagttattggtgcccttaaacgcctggtgctacgcctgaataagtataaagcggatg
 aatggcagaaattcgaaagcaaattcgaccgggtcgctcggttcagggcagggtcgttaaatagc
 cgcttatgtctattgctggtttaccggtttattgactaccggaagcagtgtagcgtgtgcttc
 10 tcaaatgcctgaggccagtttgctcaggctctccccgtggaggtaataattgacgatatgatcg
 acgt

Los operones pueden estar comprendidos dentro de una construcción génica tal como la descrita en los párrafos anteriores. En la presente invención se entiende como operón
 15 a la construcción genética, preferiblemente una construcción de ADN, donde el material genético de interés es introducido para ser expresado en la célula. El operón sintético comprende todos los elementos necesarios para la expresión de las secuencias de nucleótidos de los genes de interés comprendidos en él. Los elementos comprendidos dentro de la construcción genética están dispuestos en el marco de lectura correcto de
 20 tal manera que tenga lugar la expresión de la/s secuencia/s de codificación en condiciones compatibles con los otros elementos o secuencias presentes en la construcción. En la presente invención, las secuencias de nucleótidos de los genes comprendidos en el operón sintético se disponen preferiblemente en tándem.

25 En la presente invención se entiende por “operón inducible” al operón que en condiciones normales no se expresa, pero se activa en respuesta a un agente inductor que funciona como activador. En el momento que el inductor se une al operador, se activa el promotor y comienza la transcripción de los genes estructurales. En el caso particular del operón lactosa, cualquier análogo de la lactosa puede usarse como
 30 inductor. Ejemplos de inductores del operón lactosa incluyen, sin limitar a, IPTG (isopropil- β -D-tiogalactósido), fenil-Gal (fenil- β -D-galactosa), ONPG (orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido) y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido). En una realización particular, el inductor del operón lactosa es IPTG.

35 En una realización particular, el operón “B” comprende una secuencia de nucleótidos

que codifica una proteína de un operón inducible por metabolito. De aquí en adelante, esta secuencia de nucleótidos se denomina secuencia de nucleótidos (vi) de la invención. La secuencia de nucleótidos (vi) de la invención puede ser heteróloga y/o estar sobreexpresada con respecto a una célula "madre" o *wild type*. Ejemplos de operones inducibles por metabolito incluyen, sin limitarse a, el operón lactosa, el operón maltosa y el operón arabinosa. En una realización particular, el operón inducible por metabolito es el operón lactosa, por lo que la proteína represora es LacI.

Así, en una realización más particular, la proteína represora del operón inducible por metabolito es la proteína LacI de *E.coli*. En otra realización particular, la proteína LacI comprende una secuencia de aminoácidos que presenta, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 16. En otra realización particular, la proteína LacI comprende, o consiste en, una secuencia de aminoácidos que presenta un 100% de identidad de secuencia con la secuencia SEQ ID NO: 16.

SEQ ID NO: 16:

MKPVTLYDVAEYAGVSYQTVSRVVNQASHVSAKTREKVEAAMAELNYIPNRVAQQLAGKQSLLI
GVATSSLALHAPSQIVAAIKSRADQLGASVVVSMVERSGVEACKAAVHNLLAQRVSGLIINYPL
DDQDAIAVEAACTNVPALFLDVSDQTPINSIIFSHEDGTRLGVEHLVALGHQQIALLAGPLSSV
SARLRLAGWHKYLTRNQIQPIAEREGDWSAMSGFQQTMLNEGIVPTAMLVANDQMALGAMRA
ITESGLRVGADISVVGYYDDTEDSSCYIPPLTTIKQDFRLLGQTSVDRLLQLSQGQAVKGNQLLP
VSLVKRKTTLAPNTQTASPRALADSLMQLARQVSRLESGQ-

En otra realización particular, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína LacI comprende una secuencia de nucleótidos que presenta, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 17. En otra realización particular, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína LacI comprende, o consiste en, la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 17.

SEQ ID NO: 17:

gtgaaaccagtaacgttatacgatgtcgcagagtatgccggtgtctcttatcagaccgtt
tcccgcgtggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaaaacgcgggaaaaagtggaagcg
gcatggcggagctgaattacattcccaaccgcgtggcacaacaactggcgggcaaacag
tcgttgctgattggcggtgccacctccagtctggccctgcacgcgccgtcgcaaattgtc

gcggcgattaaatctcgcgccgatcaactgggtgccagcgtgggtggtcgcgatggtagaa
cgaagcggcgtcgaagcctgtaaagcggcgggtgcacaatcttctcgcgcaacgcgtcagt
gggctgatcattaactatccgctggatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcctgc
actaatgttccggcggttatttcttgatgtctctgaccagacacccatcaacagtattatt
5 tcttcccatgaagacgggtacgcgactgggcgtggagcatctggtcgcattgggtcaccag
caaatcgcgctgttagcggggccattaagttctgtctcggcgcgtctgcgtctggctggc
tggcataaatactctcactcgcgaatcaaattcagccgatagcggaaacgggaaggcgactgg
agtgccatgtccggttttcaacaaacatgcaaattgctgaatgagggcatcggttcccact
gcatgctggttgccaacgatcagatggcgtgggcgcaatgcgcgccattaccgagtcc
10 gggctgcgcgttgggtgcggatatctcggtagtgggatacgcgataccgaagacagctca
tgttatatcccgcggttaaccaccatcaaacaggattttcgctgctggggcaaaccagc
gtggaccgcttgctgcaactctctcagggccaggcgggtgaagggaatcagctgttgccc
gtctcactggtgaaaagaaaaaccaccctggcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgc
gcgttggccgattcattaatgcagctggcacgcaggtttcccgactggaaagcgggcag
15 tga

En otra realización particular, el gen que codifica la proteína LacI comprende, o consiste en, una secuencia de nucleótidos, optimizados para su correcta expresión en *Synechococcus* sp, en particular *S. elongatus*, más en particular, *S. elongatus*
20 PCC7942, que presenta un 100% de identidad de secuencia SEQ ID NO: 18.

SEQ ID NO: 18:
atgaaaccagtgacgttgtagcatgtcgcagagtatgccggtgtctcgtatcagaccgtttccc
gcgtgggtgaaccaggccagccacgtttctgcgaaaacgcgggaaaaagtggaagcggcgatggc
25 ggagctgaattacattcccaaccgcgtggcacaacaactggcgggcaaacagtcgttgctgatt
ggcgttgccacctccagctctggccctgcacgcgccgtcgcaaattgtcgcggcgattaaatcgc
gcgccgatcaactgggtgccagcgtggtggtgtcgcgatggtggaacgaagcggcgtcgaagcctg
taaagcggcgggtgcacaatcttctcgcgcaacgcgtcagtgggctgatcattaactatccgctg
gatgaccaggatgccattgctgtggaagctgcctgcactaatgttccggcggtgtttcttgatg
30 tctcggaccagacacccatcaacagtattattttctcccatgaggacgggtacgcgactgggcgt
ggagcatctggtcgcattgggtcaccagcaaatcgcgctgttggcggggccattaagttctgtc
tcggcgcgcctgcgtctggctggctggcataaatactcactcgcgaatcaaattcagccgatcg
cggaaacgggaaggcgactggagtgccatgtccggttttcaacaaacatgcaaattgctgaatga
gggcatcggttcccactgcgatgctggttgccaacgatcagatggcgtgggcgcaatgcgcgcc
35 attaccgagtcgggctgcgcgttgggtgcggatatctcggtagtgggatacgcgataccgaag
atagctcatgttatatcccgcggttaaccaccatcaaacaggattttcgctgctggggcaaac

cagcgtggaccgcttgctgcaactctcgcagggccaggcgggtgaagggcaatcagctggtgccc
gtctcactggtgaaacgaaaaaccaccctggcgcccaatacgcaaaccgcctctccccgcgcgt
tgcccgattcggttaatgcagctggcacgacaggtttcccgactggaaagcgggcagtga

5 Así, tal como se ha indicado anteriormente, en una realización particular, la secuencia de nucleótidos del Operón “B” comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 20. En una realización particular, la cianobacteria recombinante de la invención comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 19 y/o la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 20.

10

La secuencia de nucleótidos de la invención, o las construcciones génicas que comprenden las secuencias de nucleótidos de la invención, pueden insertarse por ejemplo en un vector o plásmido para llevar a cabo su inserción en el genoma de la cianobacteria.

15

En la presente descripción, el término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede usarse para transportar o transferir una secuencia de nucleótidos al interior de una célula. Un vector puede contener diferentes elementos funcionales que incluyen, pero no se limitan a, elementos de control de la transcripción, como promotores u operadores, regiones o potenciadores de la unión a factores de transcripción, y elementos de control para iniciar y terminar la transcripción. Los vectores incluyen, pero no se limitan a: plásmidos, cósmidos, virus, fagos, casetes de expresión recombinantes y transposones. Algunos vectores son capaces de replicarse o dividirse autónomamente tras ser introducidos en la célula huésped, como los vectores bacterianos con un origen de replicación bacteriano. Otros vectores pueden integrarse en el genoma de la célula huésped y replicarse así junto con el genoma celular.

20

25

30

35

En general, un vector de expresión comprende, además de al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 de las secuencias de nucleótidos de la invención, un promotor que dirige su transcripción (por ejemplo, *pT7*, *plac*, *ptrc*, *ptac*, *pBAD*, *ret*, etc.), al que está operativamente enlazado, y otras secuencias necesarias o apropiadas que controlan y regulan dicha transcripción y, en su caso, la traducción del producto de interés, por ejemplo, señales de inicio y terminación de transcripción (*ttl2*, etc.), señal de poliadenilación, origen de replicación, secuencias de unión a ribosomas (RBS), secuencias codificantes de reguladores transcripcionales, (*enhancers*), silenciadores transcripcionales (*silencers*), represores,

etc. Ejemplos de vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse de acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso concreto entre plásmidos de expresión, vectores virales (ADN o ARN), cósmidos, cromosomas artificiales, etc. que pueden contener, además, marcadores utilizables para seleccionar las células transfectadas o transformadas con las secuencias de nucleótidos de la invención. La elección del vector dependerá de la célula huésped y del tipo de uso que se quiera realizar. En una realización particular de la invención, el vector empleado es un vector “suicida”, es decir, no se replica en la cianobacteria, sino que toda la construcción que comprende las secuencias de nucleótidos de la invención queda insertada en el cromosoma de la cianobacteria. Ejemplos de vectores de este tipo se muestran en el Ejemplo 1 de la presente descripción.

La obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia, al igual que para la transformación de cianobacterias se pueden utilizar diferentes métodos ampliamente conocidos – transformación química, liposomas, transfección, electroporación, bombardeo de partículas, balas génicas (“gene gun”), microinyección, etc. – descritos en diversos manuales ampliamente conocidos por el experto en la materia.

Las secuencias de nucleótidos (i) a (iv) de la invención pueden insertarse en cualquier parte del genoma de la cianobacteria siempre y cuando dicha inserción no interrumpa la expresión de un gen esencial para la viabilidad de la cianobacteria. Así, los sitios preferidos de inserción en el genoma de la cianobacteria son los sitios Neutral Site I (NSI), Neutral Site II (NSII) y/o Neutral Site III (NSIII).

En una realización particular de la cianobacteria de la invención, el operón “A” está insertado en el NSI del genoma de la cianobacteria y el operón “B” está insertado en el NSII del genoma de la cianobacteria. Como entiende el experto en la materia, otras alternativas también son posibles en el contexto de la presente invención, como que el operón “B” esté insertado en el NSI del genoma de la cianobacteria y el operón “A” está insertado en el Neutral Site II (NSII) del genoma de la cianobacteria. Las características del operón “A” y el operón “B” han sido descritas en párrafos anteriores.

En cualquier caso, es esencial que se dé la co-expresión de las secuencias de nucleótidos de la invención (i) a (v) dentro de la cianobacteria para obtener una

cianobacteria recombinante sobreproductora de sacarosa en ausencia de estrés osmótico. Como entiende el experto en la materia, esto puede conseguirse mediante el empleo del mismo promotor inducible por metabolito en la expresión de las secuencias de nucleótidos de la invención.

5

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con una composición, de aquí en adelante “composición de la invención”, que comprende la cianobacteria de la invención, incluyendo solas o en combinación todas las realizaciones particulares descritas en párrafos anteriores. Adicionalmente, la composición de la invención (ver Ejemplo 1)

10 puede comprender otros microorganismos además de la cianobacteria de la invención, tales como microorganismos heterótrofos y/o microorganismos no-halófitos. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con una composición que comprende un consorcio sintético bacteriano, también denominada “composición de la invención”, comprendido por la cianobacteria de la invención tal como se ha definido a lo largo de

15 la presente descripción, y al menos un microorganismo heterótrofo y/o un microorganismo no-halófilo. En una realización particular, estos microorganismos heterótrofos son capaces de consumir la sacarosa producida por la cianobacteria de la invención bien para crecer y multiplicarse, y/o bien para producir productos derivados de la asimilación y metabolización de dicha sacarosa. En el Ejemplo 3 de la presente

20 descripción se muestra un consorcio de microorganismos en el que las bacterias heterótrofas crecen a partir de la sacarosa producida por la cianobacteria de la invención. Dentro de la presente invención también se contempla la producción de metabolitos o productos de interés industrial, tales como biocombustibles y bioplásticos, mediante el cultivo de un consorcio de microorganismos como el descrito en el párrafo

25 anterior, en donde las bacterias heterótrofas comprenden por ejemplo, y sin limitar a, un microorganismo productor de biocombustible (por ejemplo, isobutanol) y/o un microorganismo productor de alcohol.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso de la

30 composición de la invención para la producción de metabolitos de alto valor añadido o de productos de interés industrial, en donde la composición comprende una concentración de fosfato mayor de 0,2, 0,5, 1, 1,5 ó 2 mM. En otra realización particular, dichos metabolitos de alto valor añadido o productos de interés industrial son butanol o Polihidroxialcanoatos.

35

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de la cianobacteria de la invención para la producción de sacarosa en ausencia de estrés osmótico, de aquí en adelante, uso de la invención (Ejemplo 2). En la presente invención se considera que hay ausencia de estrés osmótico cuando la concentración de sales en el medio de cultivo es inferior a 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 o 0,5 mM. Así, en un aspecto, la presente invención se relaciona con el uso de la cianobacteria de la invención o la composición de la invención, para la producción de sacarosa en una concentración de sales inferior a 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 o 0,5 mM. En una realización particular del uso de la invención, la sal es cloruro sódico.

10

En otra realización particular, la producción de sacarosa se lleva a cabo en un biorreactor de cultivo discontinuo o de cultivo continuo.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método para producir sacarosa en ausencia de estrés osmótico, de aquí en adelante “método para producir sacarosa de la invención”, que comprende cultivar la cianobacteria recombinante de la invención, o la composición de la invención, en una concentración de sales inferior a 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 o 0,5 mM.

En caso de que el promotor que regula las secuencias de nucleótidos de la invención en la bacteria recombinante de la invención sea un promotor inducible por metabolito, el método de la invención comprende (i) cultivar la cianobacteria recombinante de la invención en una concentración de sales inferior a 150 mM hasta que la cianobacteria supere la fase de crecimiento, lo que suele ocurrir cuando la densidad óptica es de 1, y (ii) añadir el inductor adecuado al promotor que regula las secuencia de nucleótidos de la invención para promover la expresión de los nucleótidos de la invención. Adicionalmente, el método de la invención puede comprender una etapa que comprende la centrifugación del caldo de cultivo para eliminar las cianobacterias y aislar el sobrenadante que comprende la sacarosa, el cuál puede ser empleado como fuente de carbono y energía por los microorganismos heterótrofos, en particular, microorganismos heterótrofos productores de metabolitos o productos de interés industrial o de alto valor añadido en la industria.

En una realización particular del método para producir sacarosa de la invención, la concentración de sales en el cultivo es inferior a 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10

o 0,5 mM.

En otra realización particular del método para producir sacarosa de la invención, el cultivo de la cianobacteria de la invención se lleva a cabo durante al menos 5, 6, 7, 8, 9,
5 10, 11, 12, 13, 14 o 15 días.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un método para producir productos de interés industrial a partir de sacarosa que comprende:

- (i) cultivar la cianobacteria recombinante de la invención en una concentración de sales
10 inferior a 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 o 0,5 mM en combinación con una bacteria heterótrofa productora del producto de interés industrial que usa sacarosa como fuente de carbono, en donde el medio de cultivo comprende una concentración de fosfato mayor de 0,2 mM, y
- (ii) obtener el producto de interés industrial a partir del sobrenadante resultante del
15 cultivo de la etapa (i).

Las condiciones de cultivo de una cianobacteria, tales como nutrientes, pH, temperatura, etc., necesarias para el crecimiento de la misma, son ampliamente conocidas por el experto en la materia. En una realización particular, el medio cultivo comprende una
20 concentración de fosfato mayor de 0,5, 1, 1,5 ó 2 mM.

En el estado de la técnica existen gran variedad de productos de interés industrial que pueden ser producidos por microorganismos heterótrofos. Ejemplos de metabolitos de interés industrial incluyen, sin limitarse a, enzimas, antibióticos, aminoácidos
25 biocombustibles (tales como biobutanol, bioetanol, propanol, etc.), ácidos orgánicos, bioplástico, biomasa, y Polihidroxialcanoatos.

Ejemplos de microorganismos heterótrofos productores de productos de interés industrial, y que pueden ser cultivados en consorcio con la cianobacteria de la invención,
30 incluyen, sin limitar a, *Pseudomonas* sp. (por ejemplo, *Pseudomonas putida*), *Bacillus* sp. (por ejemplo, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*), *Salmonella* sp. (por ejemplo, *Salmonella typhimurium*), *Bordetella* sp. (por ejemplo, *Bordetella pertussis*), *Clostridium* sp. (por ejemplo, *Clostridium tetani*), *Corynebacterium* sp. (por ejemplo, *Corynebacterium diphtheriae*), *Propionibacterium* sp., *Penicillium* sp. (por ejemplo,
35 *Penicillium chrysogenum*), *Streptomyces* sp. (por ejemplo, *Streptomyces*

- chrestomyceticus*), *Rhizopus* sp. (por ejemplo, *Rhizopus nigricans*), *Curvularia* sp. (por ejemplo *Curvularia lunata*), *Aspergillus* sp. (*Aspergillus ochraceus*), *E. coli*, *Saccharomyces* sp. (*Saccharomyces cerevisiae*), *Streptococcus* sp. (por ejemplo, *Streptococcus lactis*), *Lactobacillus* sp. (por ejemplo, *Lactobacillus bulgaricus*),
- 5 *Brevibacterium* sp., *Aspergillus* sp. (por ejemplo, *Aspergillus niger*), *Clostridium* sp. (por ejemplo, *Clostridium acetobutylum*), *Thiobacillus* sp. (por ejemplo, *Thiobacillus thiooxidans*), *Trichoderma* sp. (por ejemplo, *Trichoderma reesei*) y *Xanthomonas* sp. (por ejemplo, *Xanthomonas campestris*).
- 10 Asimismo, el microorganismo heterótrofo productor del producto de interés industrial que va a formar un consorcio con la cianobacteria de la invención, puede ser modificado genéticamente para que sea capaz de emplear la sacarosa como fuente de energía. Esta modificación puede llevarse a cabo empleando herramientas de ingeniería genética ampliamente conocidas por el experto en la materia, y la modificación genética
- 15 puede comprender la inclusión en el microorganismo heterótrofo de los genes *cscA* y/o *cscB* que codifican respectivamente la sacarosa hidrolasa y el transportador de sacarosa. Estos genes heterólogos se podrían introducir en los macroorganismos heterótrofos que de forma natural no utilizan sacarosa como fuente de carbono y energía tanto en plásmidos replicativos como integrados en el genoma.
- 20 Alternativamente, en el contexto de la presente invención también se contempla la posibilidad de modificar genéticamente el microorganismo heterótrofo que de forma natural es capaz de emplear sacarosa como fuente de carbono, para que sea productor de algún producto de interés industrial como los descritos en párrafos anteriores.
- 25 Dentro del contexto de la presente invención está contemplada la combinación de todas las realizaciones particulares de los diferentes aspectos inventivos descritos en la esta descripción. Asimismo, a lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas,
- 30 aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Diagrama de la ruta metabólica de producción de sacarosa en *Synechococcus elongatus* PCC7942 indicando, en recuadros negros, los genes a sobreexpresar en la presente invención.

Figura 2. Representación gráfica del resultado de la integración de los operones M1 y M2 en el cromosoma de *Synechococcus elongatus* PCC 7942.

Figura 3. Crecimiento de una cianobacteria recombinante empleando aire enriquecido en CO₂

Figura 4. Producción de sacarosa acoplada al crecimiento de una cepa de cianobacteria recombinante empleando aire enriquecido en CO₂

Figura 5. Biomasa promedio acumulada $\frac{DCW_t + DCW_{t-1}}{2}$ por la cepa de la invención (gris oscuro) y de una cepa de cianobacteria recombinante de referencia [Ducat et al. (2012) Appl Environ Microbiol 78 (8): 2660 - 2668] (gris claro).

Figura 6. Producción diaria de sacarosa empleando una cepa de cianobacteria recombinante desarrollada en la presente invención (gris oscuro) y de una cepa de cianobacteria recombinante de referencia (gris claro)

Figura 7. Crecimiento de *E. coli* W en caldos de cultivo de una cianobacteria recombinante en condiciones de inducción (+IPTG) y no inducción (-IPTG).

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

EJEMPLO 1

CONSTRUCCIÓN DE UNA CEPA RECOMBINANTE DE CIANOBACTERIA SOBREEXPRESANDO LOS GENES *pgi*, *pgmt*, *galU*, *sps*, *cscB* y *lacI*

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Cepa

La cepa parental es *Synechococcus elongatus* PCC7942 (PCC or Pasteur Culture
5 collection of Cyanobacteria).

1.2. Genes sobreexpresados

En la cepa recombinante de *Synechococcus elongatus* se han expresado los siguientes genes heterólogos:

- 10 • *pgi* Glucosa-6-fosfato isomerasa (SEQ ID NO: 3)
- *pgmT* Fosfoglucomutasa (SEQ ID NO: 6)
- *galU* Manosa-1-fosfato guanililtransferasa (SEQ ID NO: 9)
- *cscB* Sacarosa permeasa (SEQ ID NO: 15)
- *lacI* Represor LacI (SEQ ID NO: 18)

15

Asimismo, se ha sobreexpresado el siguiente gen homólogo:

- *sps* Sacarosa fosfato sintasa (SEQ ID NO: 12)

1.3. Técnicas de biología molecular

20

1.3.1. Técnicas de ensamblaje de DNA

Modular Cloning (MoClo) es un método de ensamblaje de ADN basado en el sistema Golden Gate (Engler *et al*, 2014, ACS Synth Biol, 3(11): 839-43) que se basa en el uso de enzimas de restricción tipo II-S, como BsaI y/o BbsI, que reconocen un sitio
25 específico de ADN pero cortan en una secuencia distinta. Por lo tanto, es posible usar una sola enzima, en una reacción única, para generar una variedad de sitios de fusión al mismo tiempo. Los fragmentos de DNA generados por digestión, flanqueados por sitios BsaI, se ensamblan en un vector receptor, interrumpiendo el gen *lacZ*, permitiendo la selección por color de los clones positivos (color blanco). El protocolo realiza varios
30 ciclos combinados de digestión y ligación, de manera que los fragmentos generados por digestión se unen por ligación en un vector receptor en una misma reacción, y en un orden concreto definido por la secuencia de los sitios de fusión. Este método puede utilizarse para generar unidades transcripcionales que, a su vez, pueden combinarse para generar distintos circuitos genéticos empleando el mismo protocolo y cambiando
35 la enzima de restricción (BbsI, en este caso). De esta manera, las enzimas BsaI y BbsI

se alternan en cada ronda de ensamblaje. Este método permite ensamblar fragmentos de ADN en poco tiempo (menos de 3 horas) empleando un protocolo muy simple, cuyo producto puede ser transformado directamente en cepas de clonaje.

- 5 En este ejemplo se ha empleado la librería CIDAR MoClo (Iverson et al., 2016, ACS Synth Biol. 5(1): 99-103), como fuente de partes de ADN (Promotores, sitios de unión a ribosoma, secuencias codificantes, terminadores, vectores receptores, etc.). El sistema MoClo se ha empleado en este ejemplo para la construcción de un circuito genético que contiene los distintos genes sobreexpresados.

10

1.3.2. Manipulación genética de *Synechococcus elongatus*

Synechococcus elongatus PCC7942 se transforma de manera natural con plásmidos cuyos genes de interés están flanqueados por secuencias de homología a determinados sitios neutrales de su genoma, permitiendo una doble recombinación que puede

15 seleccionarse mediante resistencia a antibióticos.

1.4. Medios de cultivo

Las diferentes cepas de *S. elongatus* se han crecido en una versión modificada del medio de cultivo BG11 (Stanier et al. 1971. Bacteriol Rev. 35(2): 171-205), denominado

20 BG11-HP con una mayor concentración de fosfato (2 mM K_2HPO_4) y con 10 mM de HEPES buffer ajustado previamente a un pH de 7.8 con NaOH. De esta manera, la composición del medio BG11-HP es la siguiente:

- 1,5 g $NaNO_3/L$,
- 0,348 g K_2HPO_4/L ,
- 25 • 0,075 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O/L$,
- 0,036 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O/L$,
- 6,56 mg ácido cítrico monohidrato/L,
- 6 mg citrate de amonio férrico/L,
- 1,04 mg $Na_2EDTA \cdot 2H_2O/L$,
- 30 • 0,02 g Na_2CO_3/L ,
- 2,86 mg H_3BO_3/L ,
- 1,81 mg $MnCl_2 \cdot 4H_2O/L$,
- 0,222 mg $ZnSO_4 \cdot 7H_2O/L$,
- 0,39 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O/L$,
- 35 • 0,079 mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O/L$,

- 0,022 mg CoCl₂/L,
- HEPES buffer 10 mM pH 7.8/NaOH.

1.5. Condiciones de crecimiento

5 Las cepas de *Synechococcus elongatus* se han crecido en matraces tipo Erlenmeyer de 500 mL con 50 mL de medio BG11-HP. Las condiciones de crecimiento son: 30°C en incubadora orbital a 200 rpm con una iluminación de aproximadamente 6000 lux.

2. RESULTADOS

10

2.1. Identificación de los genes a sobreexpresar

Se realizó un análisis *in silico* empleando el modelo metabólico de *S. elongatus* y el algoritmo (GDLS) para optimizar la producción de sacarosa acoplada al crecimiento. Los resultados indicaron que la sobreexpresión de los genes *galU*, *sps*, *pgi* *pgmt* puede ser
 15 necesaria para la sobreproducción de sacarosa en ausencia de estrés salino. En adición, el gen *cscB* es necesario para la secreción de la sacarosa al exterior de la célula como previamente se ha demostrado en [Ducat et al. (2012) Appl Environ Microbiol 78 (8): 2660 - 2668]. Un diagrama de la ruta de producción de sacarosa en *Synechococcus elongatus* PCC7942 y de los genes a sobreexpresar se representa en la Figura 1.

20

2.2. Construcción de los operones sintéticos

Las secuencias de los genes a sobreexpresar se han seleccionado del genoma de *Escherichia coli* (SEQ ID NO: 2, 5, 8, 14), salvo el gen *sps*, que se ha seleccionado de *Synechococcus elongatus* PCC7942 (SEQ ID NO: 11). Las secuencias de todos los
 25 genes a sobreexpresar se han editado para optimizar su expresión en *Synechococcus* y para evitar los sitios de corte de las enzimas BsaI y BbsI (SEQ ID NO: 3, 6, 9, 12, 15)

Para la sobreexpresión de los genes, éstos se han organizado en dos operones distintos, ambos controlados por el promotor P_{trc} y precedidos por un sitio de unión a
 30 ribosoma de uso común en cianobacterias.

Para controlar la actividad del promotor P_{trc} mediante la adición del inductor IPTG, se ha sobreexpresado el gen *lacI* (SEQ ID NO: 17), también optimizado para su expresión en *Synechococcus* (SEQ ID NO: 18).

35

La construcción de los operones se ha realizado empleando el método MoClo de ensamblaje de DNA, detallado en la sección Materiales y Métodos.

2.2.1. Construcción del operón *P_{trc}, pgi, pgmt, galU-T1T7 (M1)*

5 Las partes individuales se ensamblaron en el vector DVA_AE del kit CIDAR (Addgene, 490 Arsenal Way, Suite 100, Watertown, MA 02472, USA). La construcción resultante se ha denominado M1-DVA. A continuación, el plásmido M1-DVA se ha digerido con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I y el operón resultante se ha ligado en el vector pMSM230, que se integra en el sitio neutral 1 (NSI) del cromosoma de *Synechococcus elongatus*
10 PCC7942. Este nuevo vector se ha denominado pMSM230-M1. La secuencia de nucleótidos integrada en el sitio neutral 1 es la SEQ ID NO: 19

2.2.2. Construcción del operon *P_{trc}-sps-cscB,PlacI^q-lacI-T1T7 (M2)*

Las partes individuales se ensamblaron en el vector DVA_AE del kit CIDAR (Addgene).
15 La construcción resultante se ha denominado M2-DVA. A continuación, el plásmido M2-DVA se ha digerido con las enzimas *Kpn*I y *Xho*I y el operón resultante se ha ligado en el vector pMSM249, que se integra en el sitio neutral 2 (NSII) del cromosoma de *Synechococcus elongatus* PCC7942. Este nuevo vector se ha denominado pMSM249-M2. La secuencia de nucleótidos integrada en el sitio neutral 2 es la SEQ ID NO: 20

20

2.3. Integración de los operones sintéticos en el cromosoma de *Synechococcus elongatus*

Siguiendo la estrategia de manipulación descrita en Materiales y Métodos, se ha realizado la integración genómica de los operones M1 (*P_{trc}-pgi-pgmt-galU*) y M2 (*P_{trc}-sps-cscB-PlacI^q-lacI*), tanto de manera individual como en combinación.
25

En primer lugar, *Synechococcus elongatus* PCC7942 se transformó con el plásmido pMSM230-M1, seleccionando los clones recombinantes por resistencia a gentamicina. Dicha cepa se transformó con el plásmido pMSM249-M2, seleccionando los clones
30 recombinantes por resistencia a cloranfenicol y gentamicina.

En la Figura 2 se muestra una representación gráfica del resultado de la integración de los operones M1 y M2 en el cromosoma de *Synechococcus elongatus* PCC7942.

35 EJEMPLO 2

PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE SACAROSA ACOPLADA AL CRECIMIENTO DESDE CO₂ USANDO UNA CEPA RECOMBINANTE DE CIANOBACTERIA

5 1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Cepa

La cepa empleada es la cianobacteria recombinante detallada en el Ejemplo 1

10 1.2. Medios de cultivo

El medio de cultivo es el detallado en el Ejemplo 1.

Para la inducción de los genes sobreexpresados, el medio se suplementa con 1 mM de IPTG.

15 1.3. Condiciones de crecimiento

Las condiciones de crecimiento estándar son las detalladas en el Ejemplo 1.

Para la producción de sacarosa se han empleado matraces tipo kitasato de 500 mL con 50 mL de medio BG11-HP suplementado con 1 mM de IPTG por los cuales se introduce una corriente de aire previamente burbujeado en buffer carbonato (K₂CO₃ 2M + KHCO₃, en relación 1:1). Las condiciones de producción de sacarosa son: 30°C en incubadora orbital a 200 rpm con una iluminación de aproximadamente 6000 lux.

1.4. Determinación del crecimiento

Se tomaron muestras durante el crecimiento para el análisis de la densidad óptica a 720 nm (OD₇₂₀). Dicho valor de OD₇₂₀ se transformó en datos de gramos de peso seco por litro (gDCW/L) empleando la siguiente relación:

$$\text{gDCW/L} = \text{OD}_{720} \times 0.3342$$

1.5. Análisis de sacarosa

Se tomaron muestras durante el crecimiento para el análisis de la concentración de sacarosa. Para ello las muestras se centrifugaron a 12000g durante 1 minuto y se recogió el sobrenadante.

El análisis de la concentración de sacarosa en el sobrenadante se realizó empleando el kit de sacarosa/D-glucosa de la compañía Megazyme

(<https://www.megazyme.com/sucrose-fructose-d-glucose-assay-kit>).

2. RESULTADOS

El cultivo de la cianobacteria recombinante se mantuvo en las condiciones de
5 crecimiento definidas para la producción de sacarosa durante 12 días. En el análisis del
crecimiento (Figura 3) se observa un crecimiento lineal constante durante los 10
primeros días.

La producción de sacarosa presenta una evolución claramente asociada al crecimiento
10 de la cianobacteria recombinante (Figuras 3-4) hasta, al menos, el día 12. La producción
máxima de sacarosa es de 4,22 g/L.

Estos resultados constituyen la primera y mejor prueba de producción de sacarosa
empleando cianobacterias recombinantes en ausencia de altas concentraciones salinas
15 en el medio.

Comparando la producción de sacarosa de la cianobacteria recombinante de la presente
invención con los mejores resultados obtenidos hasta la fecha ([Ducat et al. (2012) Appl
Environ Microbiol 78 (8): 2660 - 2668]), se observa cómo la cianobacteria de la presente
20 invención presenta un crecimiento y una mayor producción de sacarosa, mantenidos
durante más tiempo, y empleando un medio sin alta concentración de sal (Figuras 5-6).

EJEMPLO 3

25 CULTIVO DE CEPAS BACTERIANAS NO HALÓFITAS EN CALDOS DE CRECIMIENTO DE UNA CEPA DE CIANOBACTERIA RECOMBINANTE

1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Cepas

30 La cepa productora de sacarosa es la cianobacteria recombinante de la presente
invención detallada en el Ejemplo 1, produciendo sacarosa siguiendo el Ejemplo 2.

La cepa bacteriana no halófila es *Escherichia coli* W (American Type Culture
Collection number Access ATCC 9637).

35

1.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo son los detallados en los Ejemplos 1 y 2.

1.3. Condiciones de crecimiento

5 Las condiciones de crecimiento de la cianobacteria recombinante son las detalladas en los Ejemplos 1 y 2.

Para el crecimiento de *E. coli* W, los medios se han suplementado con 19 mM de NH₄Cl.

10

1.4. Análisis del crecimiento de *Escherichia coli* W

Para el análisis del crecimiento de *E. coli* W, se determinó la densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀).

15 2. RESULTADOS

Escherichia coli W se ha crecido en caldos de cultivo de *S. elongatus*, tanto inducidos con IPTG como sin inducir.

20 Para ello, *S. elongatus* se creció durante 6 días en un cultivo inducido con IPTG y en otro cultivo sin inducir. En el cultivo inducido se produjo 2 g/L de sacarosa (Ejemplo 2). De ambos crecimientos se separó el caldo de cultivo de las bacterias, mediante centrifugación y posterior filtración con una membrana de 0,22 µm.

25 Los caldos de cultivo, así obtenidos y purificados, se suplementaron con 19 mM de NH₄Cl y se utilizaron como medio de cultivo para el crecimiento de *E. coli* W. 20 mL de los caldos de crecimiento de *S. elongatus* (inducido y sin inducir) fueron inoculados con *E. coli* W a una OD₆₀₀ inicial de 0,1. Tras 24 horas de cultivo a 37 °C con agitación orbital a 170 rpm se analizó el crecimiento de *E. coli* W midiendo su OD₆₀₀. Como control se utilizó medio BG11-HP suplementado con sacarosa 2 g/L.

30

Como se observa en la Figura 7, se produce un crecimiento significativo de *E. coli* W usando sobrenadante del cultivo de *Synechococcus* inducido con IPTG. Este crecimiento es comparable al que alcanza *E. coli* W en medio fresco utilizando 2 g/L de sacarosa exógena. El resultado confirma que la sacarosa producida por *S. elongatus* es suficiente para sustentar el crecimiento de una cepa no halófila.

35

REIVINDICACIONES

1. Una cianobacteria recombinante que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos:
 - 5 (i) la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima glucosa-6-fosfato isomerasa (PGI) o un fragmento de la misma,
 - (ii) la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima fosfoglucomutasa (PGMT) o un fragmento de la misma,
 - (iii) la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa (GalU), o un fragmento de la misma,
 - 10 (iv) la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima sacarosa fosfato sintasa (SPS), o un fragmento de la misma;
 - (v) la secuencia de nucleótidos que codifica la permeasa de sacarosa (CSCB), o un fragmento de la misma, y opcionalmente,
 - 15 (vi) la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína represora de un operón inducible por metabolito,en donde:
 - las secuencias de nucleótidos (i) a (vi) están sobreexpresadas con respecto a una cianobacteria no recombinante o *wild type*, y
 - 20 - las secuencias de nucleótidos (i), (ii), (iii), (v) y (vi) son heterólogas.
2. Cianobacteria según la reivindicación 1, en donde la proteína represora de un operón inducible por metabolito es la proteína LacI del operón lactosa.
- 25 3. Cianobacteria según la reivindicación 1 o 2, en donde la sobreexpresión de las secuencias de nucleótidos (i), (ii) y (iii) está bajo el control de un operon "A" que comprende un promotor funcional en cianobacterias.
4. Cianobacteria según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la sobreexpresión de las secuencias de nucleótidos (iv), (v) y (vi) está bajo el control de un operón "B" que comprende un promotor funcional en cianobacterias.
- 30 5. Cianobacteria según la reivindicación 3 o 4, en donde el operón "A" está insertado en el Neutral Site I (NSI) del genoma de la cianobacteria y el operón "B" está insertado en el Neutral Site II (NSII) del genoma de la cianobacteria, o alternativamente, el operón
- 35

B está insertado en el NSI y el operón A está insertado en el NSII.

6. Cianobacteria según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la enzima PGI comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de
5 secuencia de, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.

7. Cianobacteria según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima PGI comprende una secuencia de
10 nucleótidos que presenta una identidad de secuencia de, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% con la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 2.

8. Cianobacteria según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima PGI comprende la secuencia SEQ ID
15 NO: 3.

9. Cianobacteria según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la enzima PGMT comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de
20 secuencia de, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4.

10. Cianobacteria según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima PGMT comprende una secuencia de
25 nucleótidos que presenta una identidad de secuencia de, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% con la secuencia SEQ ID NO: 5

11. Cianobacteria según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima PGMT comprende una secuencia de
30 nucleótidos que presenta una identidad de secuencia del 100% con la secuencia SEQ ID NO: 6

12. Cianobacteria según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la enzima GalU comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de
35 secuencia de, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% con la secuencia SEQ ID NO: 7.

13. Cianobacteria según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima GalU comprende una secuencia de nucleótidos que presenta una identidad de secuencia de, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% con la secuencia SEQ ID NO: 8.
5
14. Cianobacteria según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima Gal-U comprende una secuencia de nucleótidos que presenta una identidad de secuencia del 100% con la secuencia SEQ ID NO: 9.
10
15. Cianobacteria según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la enzima SPS comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% con la secuencia SEQ ID NO: 10.
15
16. Cianobacteria según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima SPS comprende una secuencia de nucleótidos que presenta una identidad de secuencia de, al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% con la secuencia SEQ ID NO: 11
20
17. Cianobacteria según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima SPS comprende una secuencia de nucleótidos que presenta una identidad de secuencia del 100% con la secuencia SEQ ID NO: 12.
25
18. Cianobacteria según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde la enzima CSCB comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% con la secuencia SEQ ID NO: 13.
30
19. Cianobacteria según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima CSCB comprende una secuencia de nucleótidos que presenta una identidad de secuencia de, al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% con la secuencia SEQ ID NO: 14.
35

20. Cianobacteria según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima CSCB comprende una secuencia de nucleótidos que presenta una identidad de secuencia del 100% con la secuencia SEQ ID NO: 15.
21. Cianobacteria según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en donde la proteína represora de un operón inducible por metabolito comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de secuencia de, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% con la secuencia SEQ ID NO: 16.
22. Cianobacteria según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína represora de un operón inducible por metabolito comprende una secuencia de nucleótidos que presenta una identidad de secuencia de, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% con la secuencia SEQ ID NO: 17.
23. Cianobacteria según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína represora de un operón inducible por metabolito comprende una secuencia de nucleótidos que presenta una identidad de secuencia del 100% con la secuencia SEQ ID NO: 18.
24. Cianobacteria según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 23, en donde el operón integrado en el cromosoma en el sitio neutral 1 comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 19.
25. Cianobacteria según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 24, en donde el operón integrado en el cromosoma en el sitio neutral 2 comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 20.
26. Cianobacteria según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, en donde la cianobacteria pertenece al género *Synechococcus* sp. o *Synechocystis* sp.
27. Cianobacteria según la reivindicación 26, en donde la cianobacteria es *Synechococcus elongatus*.

28. Una composición que comprende una cianobacteria según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27.
- 5 29. Una composición que comprende un consorcio sintético bacteriano comprendido por una cianobacteria según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27 y al menos un microorganismo heterótrofo.
- 10 30. Uso de una composición según la reivindicación 28 o 29, para la producción de metabolitos o productos de interés industrial, en donde la composición comprende una concentración de fosfato mayor de 0,2, 0,5, 1, 1,5 ó 2 mM.
- 15 31. Uso según la reivindicación 30, en donde los metabolitos o productos de interés industrial son butanol o Polihidroxialcanoatos.
32. Uso de una cianobacteria según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, o de una composición según la reivindicación 28, para la producción de sacarosa en una concentración de sales inferior a 150, 100, 80, 60, 40, 20, 10 o 0,5 mM.
- 20 33. Uso según la reivindicación 32, en donde la sal es cloruro sódico.

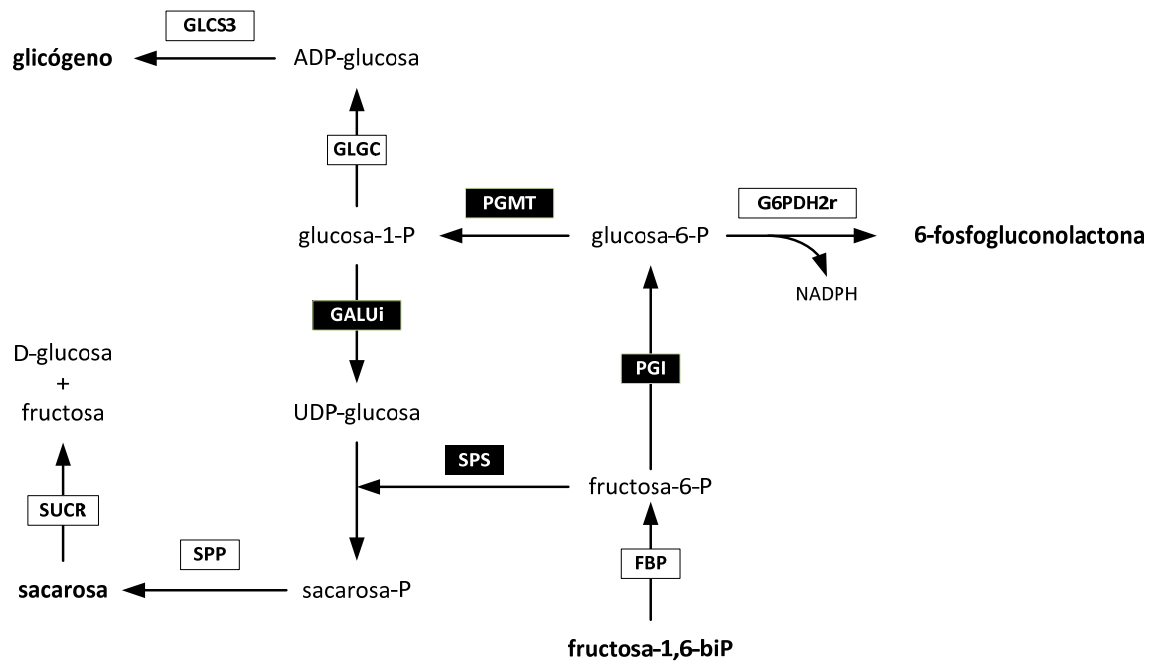


FIG. 1

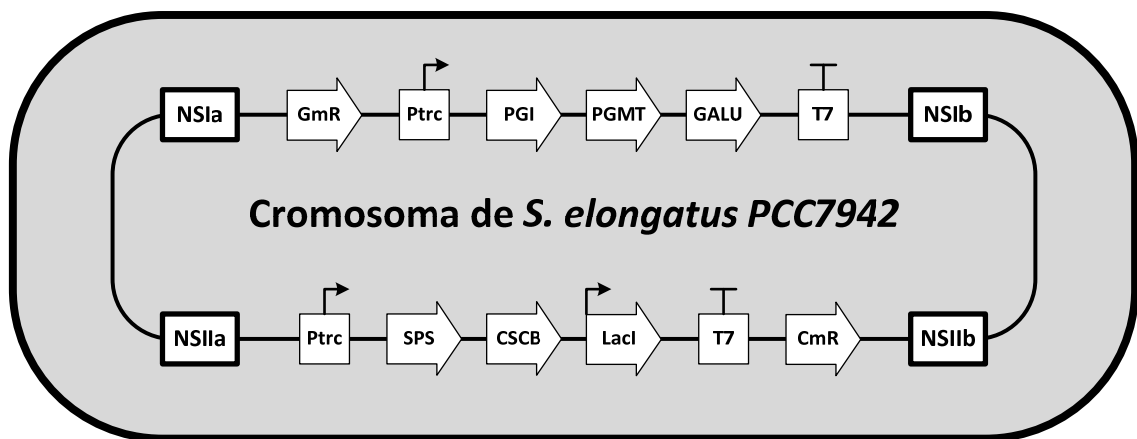


FIG. 2

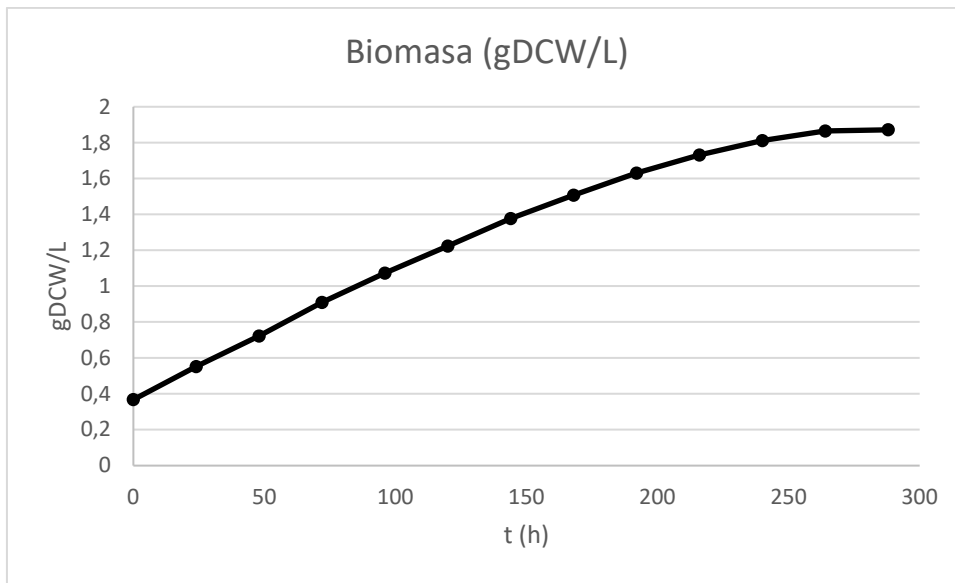


FIG. 3

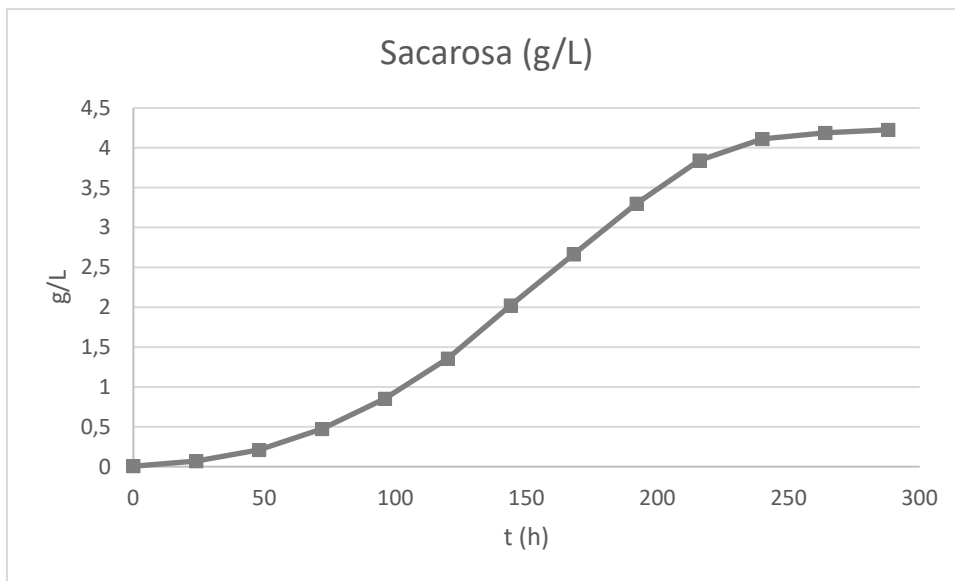


FIG. 4

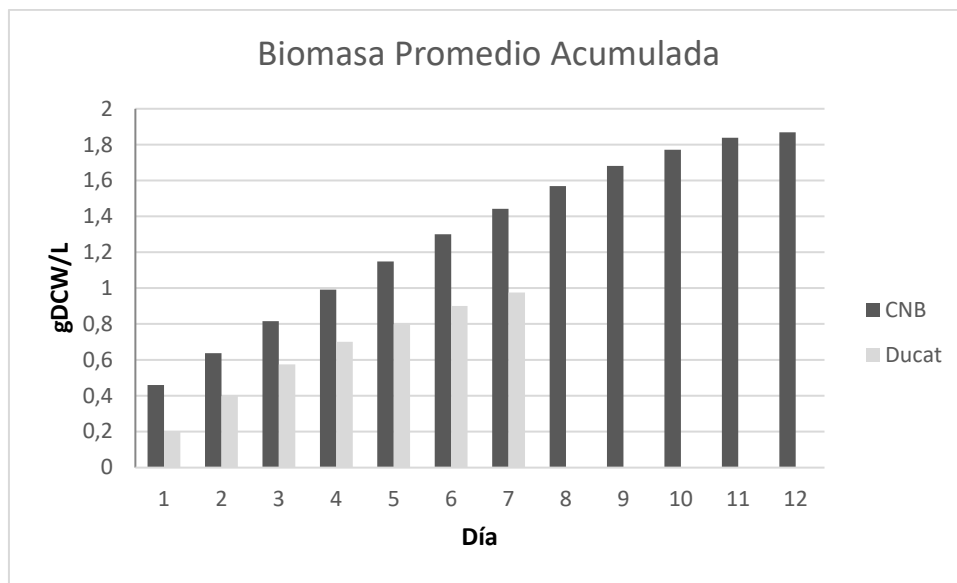


FIG. 5

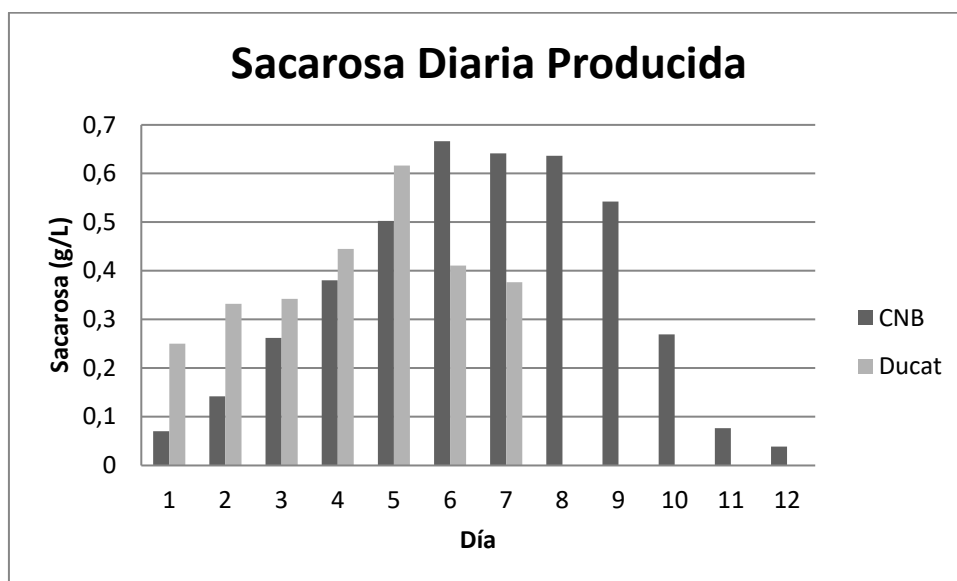


FIG. 6

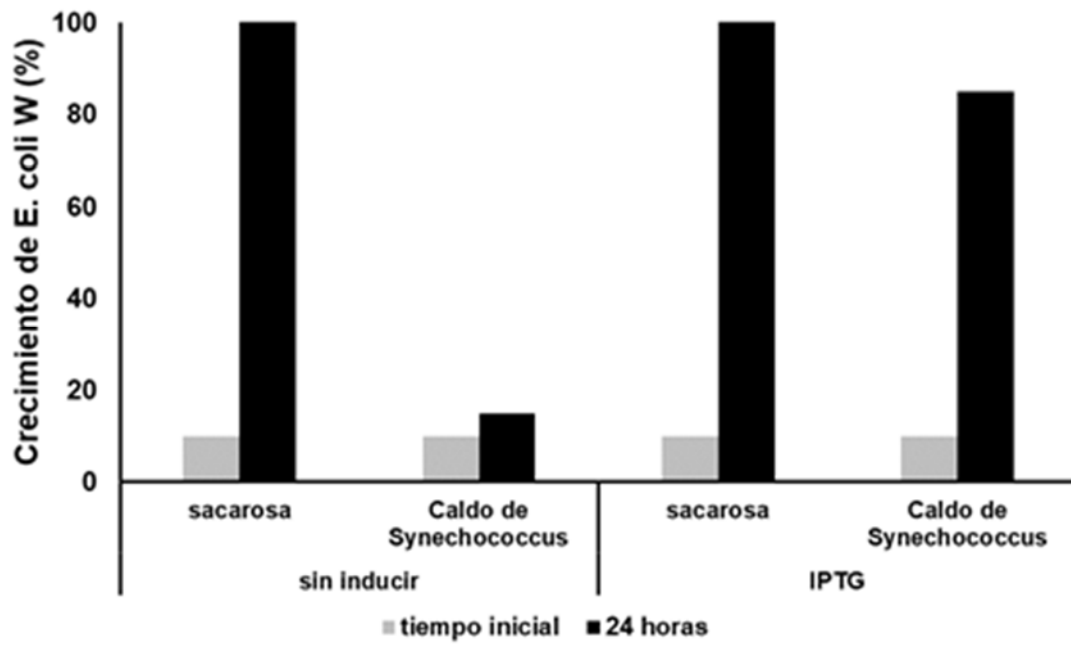


FIG. 7