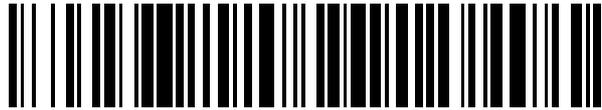


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 488 441**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/78 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12R 1/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2003 E 03771512 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 1543105**

54 Título: **Nuevas cepas mutantes de Pseudomonas fluorescens y variantes de las mismas, métodos para su producción y usos de las mismas en la producción de alginato**

30 Prioridad:

26.07.2002 NO 20023581

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

27.08.2014

73 Titular/es:

**ALGIPHARMA AS (100.0%)
Industriveien 33
1337 Sandvika, NO**

72 Inventor/es:

**GIMMESTAD, MARTIN;
SLETTA, HAVARD;
KARUNAKARAN, KARUNA PONNIAH;
BAKKEVIG, KARIANNE;
ERTESVAG, HELGA;
ELLINGSEN, TROND;
SKJAK-BRAEK, GUDMUND y
VALLA, SVEIN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 488 441 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevas cepas mutantes de *Pseudomonas fluorescens* y variantes de las mismas, métodos para su producción y usos de las mismas en la producción de alginato.

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a nuevas cepas mutantes de *Pseudomonas fluorescens* y a variantes de las mismas, que son capaces de producir grandes cantidades de alginato. El alginato no solo se produce en grandes cantidades, sino también con un cierto contenido determinado en residuos de manuronato y guluronato, con una posible presencia y determinado nivel de grupos acetilo en el alginato, y un peso molecular deseado del alginato. También se describe un alto rendimiento en mutantes con regulación de la producción de alginato. La invención proporciona además
10 métodos para producir nuevas cepas mutantes de *Pseudomonas fluorescens* y variantes de las mismas, y el uso de las cepas resultantes en la producción de alginato.

Descripción de la técnica anterior

Se conocen diversos microorganismos que producen alginato, la bacteria más estudiada es la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo tiene un uso limitado cuando se trata de la producción de alginatos para uso
15 en nutrientes o productos farmacéuticos, ya que se asocia con infecciones primarias y secundarias en mamíferos o seres humanos. Otras especies, que podrían ser fuentes seguras, no suelen producir grandes cantidades de alginatos o alginatos con un peso molecular suficientemente elevado y, por esta razón, no se pueden utilizar.

Se conoce que especies no patógenas de *Pseudomonas* tales como *P. putida*, *P. mendocina* y *P. fluorescens* producen exopolisacáridos similares a alginatos acetilados, Govan J.R.W. et al., J. of General Microbiology (1981),
20 125, págs. 217-220. También Conti, E. et al., Microbiology (1994), 140, págs. 1125-1132 describen la producción de alginatos a partir de *P. fluorescens* y *P. putida*. Sin embargo, no se conoce ningún productor en exceso de alginato que sea estable entre estas cepas.

El documento de patente de EE.UU. n° 4.490.467 de Kelco Biospecialties Ltd. describe la producción de polisacáridos utilizando nuevas cepas de *Pseudomonas mendocina*. Las cepas producen buenos rendimientos del polisacárido deseado y son relativamente estables en fermentación continua. Las cepas son producidas exponiendo un cultivo de tipo silvestre de *P. mendocina* a carbenicilina y mutando los clones mucoides resistentes seleccionados con un agente mutágeno. El más estable y, por tanto, más preferido se ha depositado con el n° NCIB 11687. Se obtuvieron concentraciones elevadas de alginato, aproximadamente 20 g/l, en cultivo continuo con nitrógeno limitado con un medio mínimo de glucosa. Una actividad liasa de alginato estaba presente en los cultivos y dio como
25 resultado un polímero de bajo peso molecular, de baja viscosidad con reología similar a la del alginato de calidad de impresión. La degradación con la enzima liasa se corrigió con la adición de una enzima proteolítica en el medio, Hacking A.J., et al., (1983) J. Gen. Microbiol., 129, págs. 3473-3480. Después de diez generaciones en cultivo continuo, aparecieron variantes no mucoides, Sengha S. S., et al., (1989) J. Gen. Microbiol., 135, págs. 795-804. página 799, segundo párrafo.

35 Un mutante negativo para la epimerasa del agente patógeno oportunista *P. aeruginosa* ha sido descrito por Chitnis et al. (1990) J. Bacteriol., 172, págs. 2894-2900. *P. aeruginosa* mucoide FRD1 se mutagenizó químicamente y mutantes que eran incapaces de incorporar residuos de ácido gulurónico (G) en el alginato, se aislaron de forma independiente. Ensayos que empleaban una liasa de alginato específica de G y análisis de resonancia magnética nuclear ¹H mostraron que los residuos G estaban ausentes en los alginatos secretados por esos mutantes. Goldberg y Ohman, 1987, J. Bacteriol., 169, págs. 1593-1602, produjeron hasta 1,7 g/l de alginato a partir de FRD1 en
40 matraces de agitación. Como es habitual para los productores espontáneos de alginato, aparecieron con frecuencia revertientes no mucoides (Flynn y Ohman, 1988, J. Bacteriol., 170, págs. 1452-1460).

Por tanto, existe todavía una necesidad en el mercado de fuentes adecuadas para una producción de alginato en grandes cantidades que sea fiable. En particular, existe una necesidad de fuentes estables que produzcan grandes
45 cantidades de alginato de alta calidad con una estructura definida y un peso molecular deseado, y especialmente de una fuente para la producción de grandes cantidades de alginato biológicamente activo. Además existe también una necesidad de producción de manuronano puro, que se pueda someter a epimerización *in vitro* con el fin de obtener alginatos con un contenido predeterminado en residuos de guluronato (G).

Compendio de la invención

50 La presente invención proporciona nuevas cepas mutantes de *P. fluorescens*, que son estables y producen grandes cantidades de alginato. Algunas realizaciones de la invención es proporcionar variantes de las mismas, que producen alginatos con una estructura definida con respecto al contenido en residuos de manuronato y guluronato, posible presencia y determinado nivel de grupos O-acetilo y un peso molecular deseado de las moléculas de alginato. También se describen mutantes de alto rendimiento con una producción regulada de alginato, y métodos
55 para su producción. Otros aspectos de la invención son; métodos para producir las nuevas cepas mutantes de *P. fluorescens* que incluyen variantes de las mismas, y usos de los mutantes resultantes en la producción de alginatos, en particular, la producción de alginatos en fermentador a media o gran escala, y más particularmente la producción

de alginatos biológicamente activos, o manuronano puro. Los alginatos resultantes son aplicables en diferentes productos alimenticios e industriales, tales como nutrientes, alimentación de animales, cosméticos y productos farmacéuticos, también pueden constituir un producto intermedio adecuado para realizar modificaciones adicionales mediante C5-epimerasas de manuronano, por ejemplo, las epimerasas del documento de patente de EE.UU. nº 5.939.289.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un cultivo bacteriano biológicamente puro de al menos una cepa mutante de *P. fluorescens*, en el que dicha cepa produce grandes cantidades de alginato. En un primer aspecto de la invención, dicha cepa produce al menos 10 g de alginato por litro de medio. En realizaciones preferidas, el cultivo bacteriano biológicamente puro de al menos una cepa mutante de *P. fluorescens*, produce por lo menos 10 g de alginato por 40-55 g de fuente de carbono por litro de medio, más preferentemente por 50-55 g de fuente de carbono por litro de medio, y lo más preferido, el cultivo bacteriano biológicamente puro de al menos una cepa mutante de *P. fluorescens* produce por lo menos 10 g de alginato por 40 g de fuente de carbono por litro de medio.

La cepa mutante pura de la bacteria *P. fluorescens* y variantes de la misma, incluidas en la invención, están ejemplificadas por cepas mutantes seleccionadas entre el grupo que consiste en las cepas mutantes Pf201, Pf2012, Pf2013, Pf20118, Pf20137, Pf20118algIΔ, Pf20118algFΔ, Pf20118AlgLH203R y Pf201MC. En algunas realizaciones, la invención se refiere a un cultivo bacteriano biológicamente puro de al menos una cepa de *P. fluorescens* en el que la cepa produce alginato con características de producción de alginato de Pf201 y variantes de la misma que conservan dichas características. Tales "características de producción de alginato" pueden ser una o varias de las siguientes: rendimiento en términos de g de alginato/l de medio (g/l) y g de alginato/g de fuente de carbono (g/g de fuente de carbono), la masa molecular promedio, el grado de acetilación y el contenido en G del alginato producido.

En un segundo aspecto, la presente invención comprende una cepa mutante pura de *P. fluorescens* en la que dicho mutante es capaz de producir grandes cantidades de un alginato que consiste solamente en residuos de manuronato. Las variantes preferidas se pueden seleccionar a partir del grupo que consiste en las cepas variantes Pf2012, Pf2013, Pf20118 y Pf20137.

En un tercer aspecto, la presente invención comprende una cepa mutante pura de *P. fluorescens* en la que dicho mutante es capaz de producir grandes cantidades de un alginato que tiene un contenido en residuos de guluronato (G) definido entre 0 y 30%. Tales realizaciones se pueden producir por métodos de la invención intercambiando el gen *algG* de tipo silvestre con un gen mutante, o alterando el gen *algG* para codificar una enzima C-5-epimerasa de manuronano con una actividad específica más baja que la de la enzima de tipo silvestre.

En un cuarto aspecto de la invención, la cepa mutante pura de *P. fluorescens* es capaz de producir grandes cantidades de alginato sin grupos O-acetilo o con un número reducido de los mismos. Tales realizaciones se pueden producir mediante la delección de partes de genes o de todos los genes *algG*, *algJ* y/o *algF*. Las cepas variantes mutantes Pf20118algIΔ y Pf20118algFΔ son capaces de producir grandes cantidades de un alginato sin grupos O-acetilo o con un número reducido de los mismos, y representan las realizaciones preferidas de este aspecto de la invención.

En un quinto aspecto de la presente invención, la cepa mutante pura de *P. fluorescens* es capaz de producir grandes cantidades de un alginato con un peso molecular deseado. El peso molecular del alginato está preferiblemente entre 50.000 y 3.000.000 Dalton. Tales realizaciones se pueden producir mediante el intercambio del gen *algL* de tipo silvestre por un gen mutante que codifica una enzima liasa de alginato con menor actividad específica que la enzima liasa de tipo silvestre. La cepa variante mutante pura Pf20118AlgLH203R representa una realización preferida de dicho mutante, que es capaz de producir grandes cantidades de un alginato que tiene un peso molecular elevado deseado.

En un sexto aspecto de la presente invención, la cepa mutante pura de *P. fluorescens* capaz de producir grandes cantidades de alginato, comprende un operón biosintético de alginato que está regulado por un promotor inducible diferente del promotor de origen natural y, opcionalmente, uno o varios genes efectores. El promotor inducible es preferiblemente un promotor *Pm*, y el gen efector es *xyiS*. De acuerdo con una realización preferida, dicha cepa mutante es Pf201MC.

Un séptimo aspecto de la invención proporciona un método para producir la nueva cepa mutante de *P. fluorescens* de la invención, en el que:

(a) una cepa de tipo silvestre de *P. fluorescens* se pone en contacto con un agente mutágeno, y

(b) la bacteria tratada de la etapa (a) se cultiva en presencia de uno o varios antibióticos, y

(c) mutantes mucoides resistentes a antibióticos se aíslan mediante selección, y

(d) se determinan las propiedades de la producción de alginato de los mutantes mucoides aislados de la etapa (c).

El agente mutágeno de la etapa (a) en el método es preferiblemente nitrosoguanidina, y los antibióticos aplicados en la etapa (b) son un antibiótico β -lactámico y/o aminoglucósido, preferiblemente el antibiótico es carbenicilina. El antibiótico puede estar presente en el intervalo de 800-1000 $\mu\text{g/ml}$ de medio, y más preferiblemente en cantidades de 900 $\mu\text{g/ml}$ de medio.

5 En todavía otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una cepa mutante de *P. fluorescens* capaz de producir grandes cantidades de alginato, en donde el operón biosintético de alginato está regulado por un promotor inducible diferente del promotor de origen natural y, opcionalmente, uno o varios genes efectores, en donde:

10 (i) el promotor del operón biosintético de alginato de una cepa de tipo silvestre de *P. fluorescens* se intercambia por un promotor inducible mediante recombinación homóloga, y

(ii) genes efectores opcionales se introducen en la bacteria de (i) mediante recombinación homóloga, mutagénesis con transposón o por medio de un plásmido, y

(iii) los mutantes se cultivan y después se aíslan mediante selección, y

(iv) se determinan las propiedades de la producción de alginato de los mutantes aislados de (iii).

15 En una realización del método de acuerdo con la invención, el promotor inducible es *Pm* procedente del plásmido Tol de *P. putida*, o un promotor *Pm* mutado como, por ejemplo, el ejemplificado en el ejemplo 9.

En todavía otros aspectos, la invención comprende un método para producir una cepa mutante de *P. fluorescens* según la reivindicación 8, en el que;

20 a) el gen *algG* de tipo silvestre, que codifica la C-5 epimerasa, se clona en un plásmido o un minitransposón y se mutageniza mediante mutagénesis química o con PCR,

b) se construye un derivado de una cepa productora de alginato de *P. fluorescens*, que carece del gen *algG* (cepa ΔalgG), y

25 c) la genoteca de *algG* sometida a mutagénesis de la etapa (a) se transfiere a la cepa ΔalgG de *P. fluorescens*, y las cepas que contienen el plásmido o el transposón se identifican y se someten a ensayo para estudiar la producción de alginato y la actividad epimerasa, y

d) las cepas que contienen el plásmido o el transposón que contienen un mutante *algG* que codifica una epimerasa que proporciona alginato con un contenido en residuos de ácido gulurónico entre 0 y 30%, se identifican mediante el ensayo de la etapa (c), y

e) el gen *algG* mutante se clona en un vector de sustitución génica, y

30 f) el vector de sustitución génica de la etapa (e) se transfiere a continuación a una cepa productora de alginato de *P. fluorescens* con el fin de sustituir su gen *algG* por el gen *algG* mutado, y hacerla capaz de expresar el gen mutante.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método adicional para producir una cepa mutante de *P. fluorescens* según la reivindicación 8, en el que;

35 a) uno o varios aminoácidos, que se identifican por mutagénesis y posterior escrutinio para estudiar si son relevantes para la epimerización, se intercambian a nivel génico mediante mutagénesis específica del sitio, con aminoácidos diferentes de los que se encuentran tanto en la proteína AlgG mutante como de tipo silvestre, y

b) el gen mutante se clona en un vector de sustitución génica y este vector se transfiere a una cepa productora de alginato de *P. fluorescens* en donde sustituye al gen *algG* de tipo silvestre y es capaz de ser expresarlo.

40 En otros aspectos, la invención proporciona el uso de un cultivo bacteriano biológicamente puro de al menos una cepa mutante de *P. fluorescens* tal como se describe en el presente documento, para la producción de alginato, y el uso del alginato producido en la preparación de un producto alimenticio o industrial, tal como un producto farmacéutico, cosmético, de alimentación animal o un producto nutriente, o como un producto intermedio para la C-5-epimerización *in vitro*.

45 Las cepas mutantes; Pf201, Pf2012, Pf2013, Pf20118, Pf20137, Pf20118algF Δ , Pf20118algJ Δ , Pf20118AlgLH203R y Pf201MC de la invención se han depositado en las Colecciones Nacionales de Bacterias de Alimentos Industriales y Marinas Ltd. (NCIMB) el 16 de julio de 2002, con los siguientes números de orden; 41137, 41138, 41139, 41140, 41141, 41142, 41143, 41144 y 41145, respectivamente. Los depósitos se realizaron de acuerdo con el Tratado de Budapest.

Definiciones

50 Las nuevas cepas mutantes y sus variantes de la presente invención, producen alginato en grandes cantidades, por

"grandes cantidades" tal y como se utiliza en el presente documento, se entiende al menos 10 g de alginato por litro. Cantidades de 10 g de alginato por litro de medio se logran preferiblemente a partir de 40-55 g de fuente de carbono por litro de medio, más preferiblemente a partir de 50-55 g de fuente de carbono por litro de medio o lo más preferido a partir de 40 g de fuente de carbono por litro de medio. El rendimiento en alginato puede alcanzar 35 g de alginato por litro, pero cantidades de aproximadamente 20% a 50% en peso de la fuente de carbono utilizada, se consiguen con mayor frecuencia.

Las "fuentes de carbono" adecuadas se pueden seleccionar, pero sin limitación, a partir de monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, alcoholes, ácidos orgánicos y son, por ejemplo fructosa, glucosa, galactosa, sacarosa, lactosa, glicerol, almidón, suero de leche, melazas, jarabes de azúcar o ácido láctico (lactato), y también otras fuentes de C como se indican en libros de texto convencionales, tales como Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, compiladores Noel R. Krieg y John G. Holt, 1984, Baltimore, EE.UU., se podrían utilizar igualmente. Se debe tener en cuenta que el uso de fuentes de carbono, que no se tienen que transformar en sus fosfatos de triosa correspondientes, a través de la vía de Entner-Doudoroff antes de que se puedan utilizar para la producción de alginato a través de las bacterias mutantes, normalmente generará los rendimientos más elevados, Banerjee et al., J. Bacteriol., 1983, págs. 238-245. Preferiblemente la producción de más de 10 g de alginato/l de medio en las cepas mutantes de *P. fluorescens* de la invención, se obtiene si se emplean 40 g de fructosa o glicerol por litro de medio como fuente de carbono. La producción de alginato a gran escala se puede llevar a cabo de cualquier manera adecuada conocida por una persona experta en la técnica, pero preferiblemente tiene lugar en un fermentador. La fermentación es por lotes, de tipo alimentación por lotes o continua, posiblemente con alimentación de fuentes de carbono y otros componentes apropiados. La fermentación se lleva a cabo a una temperatura dentro del intervalo de 5-35°C. Las temperaturas en la zona inferior de este intervalo se pueden seleccionar en ciertos casos, pero preferiblemente la fermentación se lleva a cabo a una temperatura de 20°C a 30°C.

La selección de los medios, la oxigenación, el pH, tiempo de fermentación, la agitación y otras condiciones posibles de las fermentaciones, se considera que están dentro del conocimiento general del campo, y se debe entender que un gran número de combinaciones de dos o más condiciones puede conducir a la misma cantidad elevada de rendimiento en alginato, y que la presente invención no se limita a una combinación específica de tales condiciones.

Las cepas mutantes y sus variantes, de acuerdo con la presente invención, son "estables", es decir, que no reversionan a cepas que no producen alginato, cuando se cultivan durante más de 60 generaciones. Los mutantes se cultivan en medio PIA en matraces de agitación en condiciones de cultivo convencionales, tal como se expone en Materiales y Métodos, excepto que cada 24 horas el medio se reemplazó con medio PIA de nuevo aporte (cultivos sucesivos).

La "cepa mutante" utilizada en esta memoria comprende cepas mutantes de *P. fluorescens* Pf201, así como cepas mutantes variantes, todas ellas producen alginato en grandes cantidades.

En realizaciones preferidas, "cepa mutante" se refiere a cepas mutantes de *P. fluorescens* Pf201 que todas ellas producen alginato en grandes cantidades. Las variantes pueden ser el resultado de una mutagénesis adicional de la cepa mutante Pf201 y/o una modificación genética adicional, o un resultado de una modificación genética o mutagénesis de una cepa de *P. fluorescens* de tipo silvestre. Las variantes producirán grandes cantidades de alginatos con ciertas estructuras definidas. También se considera que variantes que contienen cualquier combinación de las mutaciones definidas en la presente memoria, están incluidas en esta expresión.

El alginato producido de acuerdo con la invención tendrá un "peso molecular deseado". Preferiblemente se produce alginato con un peso molecular (Pm.) en el intervalo de 50.000 a 3.000.000 Dalton, más preferiblemente entre 200.000 y 2.000.000 Dalton, y lo más preferible más de 300.000 Dalton.

Con la expresión "alginato biológicamente activo" empleada en esta memoria, se entiende un alginato que tiene un impacto sobre un sistema biológico, es decir, se conocen ciertas estructuras moleculares de alginato bioactivo para inducir respuestas biológicas en ciertos sistemas celulares. Tales alginatos biológicos tienen un menor contenido en residuos de ácido gulurónico (guluronato), desde 0 a 30% del contenido total en ácido urónico, y preferiblemente el contenido en residuos de ácido gulurónico está entre 1% y 15%, y más preferiblemente entre 1% y 10 %.

Descripción de las figuras

Figura 1: Mapas de endonucleasas de restricción de los vectores suicidas pHE55 y pMG48, consultar la Tabla 1. Solo se muestran sitios de enzimas de restricción únicos.

Figura 2: Crecimiento y producción de alginato en fermentaciones con cepas mutantes de *P. fluorescens* NCIMB 10525.

Figura 3: Espectros ¹H-RMN de alginato producido por las cepas mutantes de *P. fluorescens* Pf201 y Pf20118. Los espectros ¹H-RMN de manuronano de los otros mutantes negativos para epimerasa (Tabla 3) eran idénticos al de Pf20118.

Figura 4: Se muestra el operón biosintético de alginato y el marco de lectura abierto aguas arriba de *P. fluorescens*. Los fragmentos clonados se marcan como recuadros sobre la línea del mapa. Solo se muestran los sitios de

restricción empleados para la clonación. La longitud total es de 18 kb.

Figura 5: Mapa de endonucleasas de restricción del plásmido pMC1. Solo se muestran las enzimas de restricción únicas.

Descripción General de Materiales y Métodos

5 Materiales de partida y medios de cultivo utilizados para el crecimiento de las bacterias

Las cepas bacterianas, los fagos y los plásmidos utilizados en la presente invención se enumeran en la Tabla 1 a continuación. Las cepas de *E. coli* y *P. fluorescens* se cultivaron de forma rutinaria en medio LB (10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura y 5 g/l de NaCl) o en un medio LA, que es medio LB que contiene 15 g/l de agar, a 37°C y 30°C, respectivamente. El agar para el aislamiento de *Pseudomonas* (PIA, Difco) también se utilizó para la propagación de *P. fluorescens*. Las *E. coli* utilizadas para la propagación del fago λ se cultivaron en medio LB complementado con maltosa (0,2%) y MgSO₄ (10 mM). Los antibióticos, cuando se utilizaron en experimentos de crecimiento rutinarios, estaban presentes en las siguientes concentraciones: ampicilina 100-200 μ g/ml, kanamicina 40 μ g/ml, tetraciclina 12,5 μ g/ml (*E. coli*) y 30 μ g/ml (*P. fluorescens*).

Producción de alginato en *P. fluorescens*; medios de cultivo y condiciones de crecimiento

15 Medios de cultivo:

La producción de alginato en experimentos con matraces de agitación se realizó en medio PIA que contenía peptona bacteriológica (20 g/l), MgCl₂ (1,4 g/l), NaCl (5 g/l), K₂SO₄ (10 g/l) y 87% de glicerol (20 ml/l) o en medio PIA con contenido en sal reducido (medio PIA sin K₂SO₄). Las proteasas (Alcalasa 2.4l (0,15 ml/l) y Neutrasa 0.5l (0,15 ml/l)) se añadieron para reducir la actividad liasa de alginato extracelular, a menos que se indicara lo contrario. La Alcalasa y la Neutrasa se adquirieron en Novo Nordisk.

La producción de alginato en fermentador se realizó en medio PM5 que contenía: fructosa (40 g/l), extracto de levadura (12 g/l), (NH₄)₂SO₄ (0,6 g/l), Na₂HPO₄ x 2H₂O (2 g/l), NaCl (11,7 g/l), MgSO₄ x 7H₂O (0,3 g/l) y clerol FBA622 (antiespumante) (0,5 g/l). Las proteasas (Alcalasa 2.4l (0,25 ml/l) y Neutrasa 0.5l (0,25 ml/l)) se añadieron para reducir la actividad extracelular de liasa de alginato.

25 Preparación de inóculo convencional (cultivo congelado con glicerol como crioprotector)

Una colonia procedente de una placa de agar (incubada a 30°C durante 2-3 días, medio PIA) se transfiere a un matraz de agitación (500 ml, con deflectores) con 100 ml de medio LB. El matraz de agitación se incubó a 30°C durante 16-20 horas en un agitador orbital (200 rpm, amplitud 2,5 cm). Para proteger, se añade glicerol estéril al caldo de cultivo a una concentración de 15%. La mezcla se transfiere a viales criogénicos estériles (Nunc) y se almacena a -80°C.

Preparación de inóculo para experimentos de producción en matraces de agitación y fermentador

Se transfiere 1 ml de inóculo convencional a un matraz de agitación (500 ml, con deflectores) con 100 ml de medio LB. El matraz de agitación se incubó a 30°C durante 16-20 horas en un agitador orbital (200 rpm, amplitud 2,5 cm).

Producción de alginato en matraz de agitación

35 Se transfiere 1-2% en volumen de inóculo (véase más arriba) a un matraz de agitación (500 ml, con deflectores) con 100 ml de medio PIA o medio PIA con reducción de sales. El matraz de agitación se incubó a 25°C durante 48 horas en un agitador orbital (200 rpm, amplitud 2,5 cm).

Producción de alginato en fermentador

40 Se transfiere 2-3% en volumen de inóculo de un matraz de agitación a un fermentador de 3 litros (Applicon), con 1,4 litros de medio PM5. Las fermentaciones se realizaron a 25°C. El pH inicial se ajusta a 7,0-7,2. El pH se controla a 7,0 con NaOH (2 M) y el control del pH se activa cuando el pH alcanza este valor. El flujo de aire a través del medio de cultivo es de 0,25 litro/litro de medio (vvm) durante las primeras 8-10 horas, después se incrementa en etapas hasta 0,9-1,0 vvm. El oxígeno disuelto se controla al 20% de saturación mediante el control automático de la velocidad del agitador.

45 Técnicas convencionales aplicadas

El aislamiento de plásmidos, las manipulaciones enzimáticas de ADN y la electroforesis en gel se llevaron a cabo con los métodos de Sambrook y Russell, 2000, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Tercera Edición). Cold Spring Harbor Laboratory Press. El kit de extracción en gel de Qiaquick y el kit de purificación de PCR de Qiaquick (Qiagen) se utilizaron para las purificaciones del ADN a partir de geles de agarosa y para reacciones enzimáticas, respectivamente. La transformación de *E. coli* se realizó tal y como se ha descrito por Chung et al., 1989, Proc Natl Acad Sci USA, 86, págs. 2172-2175 o mediante el uso de células con cloruro de rubidio competentes mediante

choque térmico. La PCR para la clonación y la identificación de alelos se realizó usando el sistema de PCR de alta fidelidad de Expand (Boehringer Mannheim). Como moldes se utilizó ya sea ADN de plásmido o 1 µl de un cultivo de una noche de *P. fluorescens*. En la primera etapa de desnaturalización, las mezclas de reacción se calentaron a 96°C durante tres minutos para asegurar tanto la lisis celular como la desnaturalización completa del ADN. Una mutagénesis específica del sitio se realizó utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange (Stratagene). Los cebadores proporcionados en la Tabla 2 fueron adquiridos en Medprobe o en MWG-Biotech AG. Los nucleótidos en los cebadores, que son diferentes de los de la secuencia de tipo silvestre, se marcan en negrita, y los sitios de las enzimas de restricción están subrayados. La secuenciación del ADN se realizó utilizando un kit Big-Dye, (Applied Biosystems).

10 Construcción de vectores suicidas para uso en *P. fluorescens*

Con el fin de lograr una recombinación homóloga en *P. fluorescens*, se construyeron dos vectores suicidas diferentes, pHE55 y pMG48, consultar la Figura 1. La construcción de pHE55 se describe en la Tabla 1. Se trata de un vector basado en RK2 que carece del gen que codifica TrfA, que es necesario para la replicación del plásmido. Además confiere resistencia a la ampicilina y la tetraciclina, lo que se puede utilizar para la selección de integrantes. La expresión de *sacB* que codifica la sacarasa de levana de *Bacillus subtilis* ha mostrado ser letal para muchas bacterias gram-negativas cuando crecen sobre 5% de sacarosa (Gay et al., 1985, J. Bacteriol., 164, págs. 918-921). En la cepa de *P. fluorescens* NCIMB 10525, sin embargo, el crecimiento de transconjugados resistentes a la tetraciclina y no mucoides, sobre sacarosa dio como resultado colonias cristalinas, como si la cepa utilizara la sacarosa para producir un polímero. La selección con SacB y sacarosa no se pudo utilizar entonces para esta cepa para seleccionar positivamente los cruzamientos dobles. pHE55 se utilizó como un vector suicida en algunos experimentos, en donde la producción de alginato se podía utilizar como un marcador.

El plásmido pMG48 se construyó como un vector de recombinación alternativo. El gen *sacB* de pHE55 fue reemplazado por un gen que codificaba una proteína de fusión TtrfA-LacZ, como se describe en la Tabla 1. Esta proteína muestra actividad β-galactosidasa, pero faltan las partes esenciales de TrfA. Empleando placas que contenían XGal (5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactopiranosido), 60 µl de una solución madre de 20 mg/ml se añadieron a cada placa de agar utilizada para el escrutinio. La actividad β-galactosidasa permite la detección de azul/blanco tanto para los integrantes (colonias azules) como más tarde para el segundo evento de recombinación (colonias blancas).

Recombinación homóloga

La secuencia de ADN que contenía la mutación de interés, ya fuera una mutación puntual, una inserción o una delección junto con ADN flanqueante de al menos 0,5 kb en cada lado, se clonó en un vector suicida, pHE55 o pMG48. *E. coli* S17.1 transformada con el plásmido de interés y la cepa de *P. fluorescens* que se iba a mutar, se incubaron en medio LB durante una noche. Después se incubaron en medio LB de nuevo aporte, se utilizó 1% de inóculo. *E. coli* se cultivó durante dos horas, *P. fluorescens* durante cuatro horas antes de la conjugación. Un ml de cada cultivo se mezcló a continuación y se centrifugó durante 15 min a 3000 rpm. La mayor parte del sobrenadante se retiró, y las células se resuspendieron en el líquido restante. La gota que contenía las células se transfirió a medio LA, y se incubó a 30°C durante una noche. Las células se recogieron con una espátula estéril, se resuspendieron en medio LB y las diluciones se sembraron en agar para aislamiento de *Pseudomonas* (PIA, Difco) con los antibióticos apropiados y X-Gal cuando el vector permitía la selección entre azul/blanco. Una colonia transconjugante no mucoides de cada cepa productora de manuronano se incubó en 2-6 cultivos líquidos secuenciales durante una noche, en ausencia de tetraciclina para permitir la pérdida del plásmido integrado. Los cultivos con crecimiento exponencial se diluyeron 10⁴-10⁹ veces y se sembraron sobre el medio apropiado para detectar las cepas diferentes.

Medición del contenido en G y el grado de O-acetilación del alginato mediante espectroscopía RMN.

Las muestras de las fermentaciones se diluyeron en NaCl 0,2 M y se centrifugaron para eliminar las células bacterianas. Para la preparación de las muestras para determinar el grado de acetilación, el alginato se precipitó desde el material sobrenadante libre de las células añadiendo un volumen de isopropanol (4°C), y después se recogió por centrifugación. A continuación, el alginato precipitado se lavó dos veces con etanol al 70%, una vez en etanol al 96% y se disolvió de nuevo en agua destilada antes de un tratamiento adicional. Para la preparación de muestras para determinar el contenido en G, el alginato en el material sobrenadante exento de células se desacetiló mediante tratamiento alcalino suave, tal y como se describe en Ertesvåg y Skjåk-Bræk 1999, en Methods in biotechnology 10, Carbohydrate Biotechnology Protocols. Bucke, págs. 71-78. Humana Press Inc. El alginato desacetilado se aisló a partir del material sobrenadante exento de células mediante precipitación ácida, añadiendo HCl a pH 2. El alginato precipitado se recogió por centrifugación, se disolvió de nuevo en agua destilada y se neutralizó con álcali. Para reducir la viscosidad del polímero para el análisis de RMN, las muestras se degradaron por hidrólisis ácida suave hasta un grado promedio final de polimerización (DP_n) de aproximadamente 35, que son 35 residuos en la cadena de polímero, se neutralizaron y se liofilizaron, Ertesvåg y Skjåk-Bræk, 1999, *supra*. Los espectros de RMN se obtuvieron utilizando un espectrómetro de 300 MHz de Bruker. Los espectros se integraron, y se calcularon las fracciones de residuos de guluronato (F_G), de residuos de bloques de manuronato (F_{MM}) y de residuos de bloques alternantes (F_{MG=GM}) y el grado de acetilación se calculó tal y como se describe en Grasdalen, 1983, Carbohydr. Res., 118, págs. 255-260 y Skjåk-Bræk, Grasdalen y Larsen, 1986, Carbohydr. Res., 154, págs.

239-250.

Medición de la viscosidad intrínseca del alginato y medición directa del contenido en alginato en las muestras de fermentación.

5 El alginato producido se aisló, se desacetiló, se precipitó en ácido, se volvió a disolver y se neutralizó tal y como se ha descrito anteriormente. A la solución de alginato neutralizada se añadió isopropanol para precipitar otra vez el alginato. El alginato precipitado se lavó dos veces con etanol (primero etanol al 70% y luego al 96%), se volvió a disolver en agua destilada y se dializó frente a agua destilada durante 48 horas. Después de la diálisis, la muestra se liofilizó y se pesó. La viscosidad intrínseca de los alginatos se determinó en un aparato Scott con dilución automática, usando un capilar Ubbelodhe ($\Phi = 0,53$ mm) a 20°C y una concentración de sal añadida de NaCl 0,1 M. El principio del método es como se describe en Haug y Smidsrød, 1962, Acta. Chem. Scand., 16, págs. 1569-1578.

Determinación enzimática del contenido en alginato en las muestras de fermentación.

El contenido en alginato se midió utilizando la liasa específica de M procedente de orejas de mar y la liasa de G procedente de *Klebsiella aerogenes*, tal y como describe en Østgaard, 1992, 19, Carbohydr. Polymers, págs. 51-59.

15 Se diluyeron las muestras de las fermentaciones (2-20 veces) en NaCl 0,2 M, se centrifugaron para eliminar las células bacterianas y se desacetilaron, tal y como se ha descrito más arriba. Las muestras desacetiladas se diluyeron a continuación en tampón (Tris-HCl (50 mM), NaCl (0,25 M), pH 7,5) hasta tener una concentración final de 0,005-0,05% de alginato. LF 10/60 (FMC Biopolymer AS) o manuronano, producido y medido tal y como se describe en el presente documento, se utilizaron como patrones de alginato en el ensayo. Para el ensayo, se añadió un volumen de muestra, o de patrón y 0,06 volúmenes de solución de liasa de alginato (aproximadamente 1 U/ml) a dos volúmenes de tampón (Tris-HCl (50 mM), NaCl (0,25 M), pH 7,5) y se incubó durante 3 horas a 25°C. La absorbancia a 230 nm se registró antes y después de la incubación. Las diferencias en los valores de la A230 nm antes y después de la incubación, se utilizan para el cálculo del contenido de alginato en la muestra. Los resultados, utilizando este ensayo, se correlacionan muy bien con la medición directa del contenido en alginato, descrita anteriormente.

25 Determinación de la actividad liasa

Las células bacterianas procedentes de fermentaciones se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en tampón (Tris-HCl (50 mM), NaCl (0,25 M), pH 7,5) hasta tener una densidad óptica de 3-10 a 660 nm y se sometieron a ultrasonidos. Los extractos después de la sonicación se investigaron para estudiar la actividad liasa. La liasa específica de M de la oreja de mar (descrita por Østgaard, 1992, 19, Carbohydr. Polymers, págs. 51-59) se utilizó como patrón. Las actividades liasa en las muestras se determinaron midiendo la tasa de degradación del manuronano utilizando un aparato Scott Ubbelodhe (instrumento nº 53620/II). El manuronano (1 mg/ml) se disolvió en tampón (Tris-HCl (12,5 mM), NaCl (62,5 mM), pH 7,5). Se añadieron 4 ml de solución de sustrato de manuronano y 0,4 ml de solución patrón diluida, o se añadieron las muestras al capilar Ubbelodhe. El tiempo que tardaba la solución en atravesar el capilar de la Ubbelodhe se midió cada 2 minutos durante un período de tiempo de una hora. El análisis se realizó a 25°C. Basándose en los datos de los análisis, se calculó la tasa de degradación del manuronano y se correlacionó con la actividad liasa en la muestra. Se obtuvo una curva estándar utilizando la liasa de M de la oreja de mar como patrón (0,005-0,05 u/ml). Una unidad de actividad de liasa se define como la describe Ertesvåg et al., J. Bacteriol. (1998), 180, págs. 3779-3784.

Tabla 1. Cepas bacterianas, plásmidos y fagos utilizados

Cepas	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i> S17.1	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thiΔ (lac-proAB)</i> , contiene los genes necesarios para la replicación y la transferencia de RK2.	Simon et al., 1983, Biotechnol. 1, págs. 784-791.
<i>E. coli</i> S17.1λ-pir	λ-pir, <i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thiΔ (lac-proAB)</i> , contiene los genes necesarios para la replicación y la transferencia de RK2 y la replicación de pCB111.	de Lorenzo et al., 1993, J. Bacteriol. 175, págs. 6902-6907.
<i>E. coli</i> SURE	e14- (<i>McrA</i> -) D(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)171 <i>endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kanr) uvrC [F' proAB lacIqZD(M15 Tn10 (Tetr)]</i> .	Stratagene

ES 2 488 441 T3

Cepas	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i> XL-1Blue MRA	$\Delta(mcrA)$ 183 $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 173 <i>endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac</i> .	Stratagene
<i>E. coli</i> XL-1Blue MRA(P2)	XL-1Blue MRA (P2 lisógeno).	Stratagene
<i>P. fluorescens</i> NCIMB 10525	<i>P. fluorescens</i> no mucoide de tipo silvestre.	NCIMB
Pf201	<i>algG</i> ⁺ , <i>P. fluorescens</i> mucoide.	Este trabajo
Pf2012	Mutante productor de manuronano, <i>algG</i> ⁻ D361N.	Este trabajo
Pf2013	Mutante productor de manuronano, <i>algG</i> G430D	Este trabajo
Pf20118	Mutante productor de manuronano, <i>algG</i> R408L.	Este trabajo
Pf20137	Mutante productor de manuronano, <i>algG</i> S337F.	Este trabajo
Pf20118 <i>algF</i> Δ	Mutante con delección en marco de <i>algF</i> de Pf20118.	Este trabajo
Pf20118 <i>algI</i> Δ	Mutante con delección en marco de <i>algF</i> de Pf20118.	Este trabajo
Pf20118 <i>algL</i> Δ	Mutante con delección en marco de <i>algL</i> de Pf20118	Este trabajo
Pf20118 <i>algLH203R</i>	Derivado de Pf20118 que codifica la proteína mutante AlgLH203R.	Este trabajo
Pf201 Δ <i>algG</i>	Mutante con delección en marco de <i>algG</i> .	Este trabajo
Pf20118::TnKB10	Derivado de Pf20118 con transposón procedente de pKB10.	Este trabajo
Pf201 Δ <i>algG</i> ::TnBK10	Derivado de Pf201 Δ <i>algG</i> con transposón procedente de pKB10.	Este trabajo
Pf201MC	Derivado de Pf201 en el que la biosíntesis de alginato está controlada por el promotor inducible Pm.	Este trabajo
Fagos		
λ DAshII	Vector de clonación λ .	Stratagene
Pf λ 1	λ DAshII en el que se ha insertado un inserto de 15 kb de ADN genómico digerido parcialmente con <i>Sau</i> AI, procedente de <i>P. fluorescens</i> NCIMB10525 que contiene <i>alg'EGXLIJFA</i> .	Este trabajo
Plásmido		
pCVD442	Ori R6K, Ap ^r .	Donnenberg y Kaper, 1991, 59, págs. 4310-4317.
pJB3Tc20	Vector basado en RK2, Ap ^r , Tc ^r .	Blatny et al., 1997, Appl. Environ. Microbiol., 63, págs. 370-379.

ES 2 488 441 T3

Cepas	Descripción	Referencia
pJB3Tc20trfA	Derivado de pJB3Tc20 del que se ha delecionado un fragmento de ADN <i>BsaAI-NdeI</i> de 1,0 kb que codifica TrfA.	Este trabajo
pHE55	Derivado de pJB3Tc20trfA en el que se ha insertado un fragmento de ADN <i>PstI-XbaI</i> de 2,6 kb procedente de pCVD442 que codifica SacB de <i>Bacillus subtilis</i> .	Este trabajo
pJB1002	Vector basado en RK2 que codifica una proteína de fusión TrfA-Lac.	Karunakaran et al., 1998, J. Bacteriol., 180, págs. 3793-3798.
pGEM5	ColE1. Ap ^r .	Promega
pMG47	Derivado de pHE55 en el que se ha sustituido un fragmento de ADN <i>NheI-PstI</i> de 4,1 kb procedente de pJB1002 que codifica una proteína de fusión TrfA-Lac por un fragmento de ADN <i>XbaI-PstI</i> de 2,6 kb que codifica SacB.	Este trabajo
pMG48	Derivado de pMG47 en el que se ha insertado un fragmento de ADN <i>SphI-SapI</i> de 0,36 kb que contiene el polienlazador de pGEM5.	Este trabajo
pBBg10	Inserto <i>BglII-BamHI</i> de 9,9 kb procedente del operón biosintético de alginato de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> que contiene alg'KEGXLIJF. Ap ^r .	Obsequio de A. Chakrabarty
pGEM11	ColE1. Ap ^r .	Promega
pMG24	pGEM11 que contiene un fragmento de ADN <i>SalI</i> de 1 kb procedente de Pfl1 que codifica parte de <i>algE</i> .	Este trabajo
pMG25	pGEM11 que contiene un fragmento de ADN <i>SalI</i> de 4,2 kb procedente de Pfl1 que codifica secuencias aguas arriba del operón de alginato.	Este trabajo
pMG26	pGEM11 que contiene un fragmento de ADN <i>SalI</i> de 4,6 kb procedente de Pfl1 que codifica <i>algGXL1'</i> .	Este trabajo
pMG27	pGEM11 que contiene un fragmento de ADN <i>SalI</i> de 4,8 kb procedente de Pfl1 que codifica <i>alg'IJFA</i> .	Este trabajo
pLitmus28	ColE1. Ap ^r .	New England Biolabs
pMG23	pLitmus28 en el que se ha insertado un fragmento de ADN <i>BglII-PstI</i> amplificado con PCR de 1,8 kb que contiene <i>algG</i> y 135 pb de <i>algX</i> . Se emplearon los cebadores PfalG3r y PfalG4f.	Este trabajo
pMG31	Derivado de pHE55 en el que se ha insertado un fragmento de ADN <i>BglII-XbaI</i> de 1,8 kb que codifica AlgG procedente de pMG23.	Este trabajo
pMG49	Derivado de pMG27 a partir del cual se ha delecionado un fragmento de ADN <i>NruI-HpaI</i> de 1,4 kb, creando una deleción algI''J en marco.	Este trabajo
pMG50	pHE55 con un inserto <i>SacI-XbaI</i> de 3441 pb procedente de pMG49 que contiene algIΔ.	Este trabajo

ES 2 488 441 T3

Cepas	Descripción	Referencia
pMG77	Derivado de pMG27 en donde se ha introducido un sitio <i>SacI</i> empleando la pareja de cebadores <i>algF-SacI-1</i> y <i>algF-SacI-2</i> (tabla 2).	Este trabajo
pMG78	Derivado de pMG27 a partir del cual se ha delecionado un fragmento de ADN <i>SacI</i> de 285 pb en <i>algF</i> .	Este trabajo
pMG79	Derivado de pMG48 restringido en <i>SphI-SpeI</i> en el que se ha insertado un fragmento de ADN <i>NspI-NheI</i> de 1,7 kb procedente de pMG78.	Este trabajo
pMG67	Derivado de pMG26 en el que se ha introducido un sitio <i>AgeI</i> y un <i>algLH203R</i> empleando los cebadores <i>AlgLH203R1</i> y <i>AlgLH203R2</i> .	Este trabajo
pMG70	Derivado de pMG48 en el que se ha insertado un fragmento de ADN <i>PstI-NotI</i> de 2,5 kb procedente de pMG87 en los sitios <i>NsiI</i> y <i>NotI</i> del vector.	Este trabajo
pJB658celB	Vector de expresión que contiene el promotor <i>Pm</i> y <i>xyIS</i> . <i>Ap^r</i> .	Blatny et al., 1997, <i>Plasmid</i> , 38, págs. 35-51.
pHE138	Derivado de pJB658celB en el que se ha insertado un fragmento de PCR digerido con <i>NdeI-NsiI</i> de 0,8 kb que codifica la parte N-terminal de <i>AlgD</i> en los sitios <i>NdeI</i> y <i>PstI</i> que sustituyen <i>celB</i> .	Este trabajo
pHE139	Derivado de pMG48 en el que se ha insertado un fragmento de PCR digerido con <i>BspLUIII-SpeI</i> de 0,7 kb que codifica la parte C-terminal del ORF aguas arriba del promotor de alginato en los sitios <i>NcoI</i> y <i>SpeI</i> .	Este trabajo
pHE140	Derivado de pHE138 a partir del cual se ha eliminado un fragmento de ADN <i>NsiI</i> de 0,6 kb, y los extremos protuberantes se han eliminado con polimerasa de ADN T4.	Este trabajo
pHE141	Se insertó un enlazador <i>BglII</i> en pHE139 digerido con <i>NsiI</i> que se había vuelto de extremos romos empleando polimerasa de ADN T4.	Este trabajo
pHE142	Un enlazador <i>NotI</i> se insertó aguas arriba de <i>xyIS</i> en pHE140 parcialmente digerido con <i>Eco57I</i> .	Este trabajo
pMC1	Un fragmento de ADN <i>NotI-BamHI</i> de 2,3 kb procedente de pHE142 se insertó en pHE141 digerido con <i>NotI-BglII</i> .	Este trabajo
pMG51	Derivado de pMG26 en el que se ha introducido un sitio <i>SmaI</i> en la posición del nucleótido 368 en <i>algG</i> empleando los cebadores <i>algG-SmaI-1</i> y <i>algG-SmaI-2</i> .	Este trabajo
pMG52	Derivado de pMG51 a partir del cual se ha delecionado un fragmento de ADN <i>SmaI</i> de 0,6 kb, creando una deleción en marco en <i>algG</i> .	Este trabajo

ES 2 488 441 T3

Cepas	Descripción	Referencia
pMG53	Derivado de pMG48 restringido en <i>NsiI-NcoI</i> en el que se ha insertado un fragmento de ADN <i>PstI-BspHI</i> de 2,1 kb procedente de pMG52.	Este trabajo
pCNB111	<i>oriR6K</i> , <i>mobRP4</i> , pUT/mini-Tn5 <i>xyIS/Pm</i> , Ap ^r , Km ^r .	Winther-Larsen et al., 2000, <i>Metabol. Eng.</i> 2, págs. 79-91
pKB4	Derivado de pMG26 a partir del cual se ha delecionado un fragmento de ADN <i>BlnI-XhoI</i> de 3,0 kb. Ap ^r . 4,9 kb.	Este trabajo
pKB10	Derivado de pCNB111 en el que se ha insertado un fragmento de PCR restringido en <i>NdeI-NotI</i> de 1,7 kb que contiene <i>algG</i> . pKB4 se empleó como molde para la PCR, P _f algG- <i>NdeI</i> -2 y M13/pUC inverso como cebadores.	Este trabajo
pJT19bla	Derivado de pJB655 que codifica β-lactamasa controlado por el promotor <i>Pm</i> .	Winther-Larsen et al., 2000, <i>Metabol. Eng.</i> 2, págs. 92-103
pJT19D2luc	Derivado de pJT19bla. Codifica el gen <i>luc</i> como gen informador.	Winther-Larsen et al., 2000, <i>Metabol. Eng.</i> 2, págs. 92-103
pIB11	Derivado de pJT19bla que contiene un terminador <i>rrnBT1T2</i> aguas arriba del promotor <i>Pm</i> y un sitio <i>SpeI</i> se ha cambiado por un sitio <i>BspLU11I</i> .	Ingrid Bakke, sin publicar
pHH100	Derivado de pIB11 en donde el gen <i>bla</i> se ha sustituido por un gen <i>luc</i> procedente de pJT19D2luc empleando las enzimas <i>NdeI</i> y <i>BamHI</i> .	Este trabajo
pHH100-A2	Derivado de pHH100 que contiene un promotor <i>Pm</i> mutante que proporciona una actividad no inducida inferior.	Este trabajo
pHH100-B1	Derivado de pHH100 que contiene un promotor <i>Pm</i> mutante que proporciona una actividad no inducida inferior.	Este trabajo
pHH100-D6	Derivado de pHH100 que contiene un promotor <i>Pm</i> mutante que proporciona una actividad no inducida inferior.	Este trabajo
pHH100-D9	Derivado de pHH100 que contiene un promotor <i>Pm</i> mutante que proporciona una actividad no inducida inferior.	Este trabajo
pHH100-G5	Derivado de pHH100 que contiene un promotor <i>Pm</i> mutante que proporciona una actividad no inducida inferior.	Este trabajo
pHM2	Plásmido con amplio rango de hospedadores que codifica <i>lacOPZY</i> procedente de <i>E. coli</i> .	Mostafa et al. 2002. <i>Appl. Environment. Microbiol.</i> 68:2619-2623

Tabla 2: Cebadores utilizados

Nombre	Secuencia*
PfalG3r	CAGGCTGCAGCACGGTTCGGC
PfalG4f	AAAAAGATCT AGTCGACTCGTACATGCACC
PfacetylFw	CTGCTGGTGGTGTATGGGCTGGG
PfacetylRev	AGACGCGCACGAAGCTTGAGCC
algF-SaclI-1	GTCAAACCTCGCCGCGGATCACTAC
algF-SaclI-2	GTAGTGATCCGCGGCGAGTTTGAC
algF-1-Fw	AGCGATGACTTCAAGAACAACCCG
algF-2-Rev	CAATTTGGGTCAGAGCTACGAAGG
algLH203R1	AACCAACA ACCGG TCTACTGGGCCGCC3'
algLH203R2	GGCGGCCAGTAGG ACCGG TGTGGTT
PfalGL-BspHI- pMG26	AAAAAAAGTC ATGAGGTTACCTATGCAGAAGTTATTG
algG-SmaI-1	CACGGCATTCCCGGGCGATCTTC
algG-SmaI-2	GAAGATCGCCCGGGGAATGCCGTG
PfalG-NdeI-2	AAAAAACATATG GGAGCCTGCGCAATGAACC
PfalGLRev1	AAAGATCGGCAAGAACAGAAACAGG
HypBspLUIII	GTTACATGT CAGCCGCAATACCTCGACC
HypSpe	GTTACTAGT TTATTCGGGGCGTGATCG
AlgDNdeI	GGTAATTCATATGCGCATCAGCATATTTG
AlgDNsil	GTAATGCATG TAGTACTGGGACAGG

* Los cebadores se escriben en la dirección 5'-3'. Los nucleótidos que no se encuentran en la secuencia original se muestran en negrita. Se subrayan los sitios de restricción introducidos.

Ejemplos de la invención

5 Ejemplo 1

Preparación de la cepa mutante Pf201

10 *P. fluorescens* NCIMB 10525 de tipo silvestre fue adquirida en las Colecciones Nacionales de Bacterias de Alimentos Industriales y Marinas Ltd. (NCIMB). El tipo silvestre no produce cantidades significativas de alginato. Con el fin de aislar mutantes superproductores de alginato, células con crecimiento exponencial de *P. fluorescens* NCIMB 10525 se sometieron a mutagénesis con nitrosoguanidina (NG). La cepa se cultivó en medio nutriente (CM67, Oxoid) con 0,5% de extracto de levadura y se lavó dos veces en tampón citrato 0,1 M (pH 5,5) antes de tratar las células con 25 µg/ml de nitrosoguanidina (NG) en tampón citrato, durante 1 hora a 30°C. Las células sometidas a mutagénesis se lavaron con tampón fosfato 0,1 M pH 7,0 que contenía KH₂PO₄ (13,6 g/l) y NaOH (~2,32 g/l) y se inocularon (2%) en medio nutriente con extracto de levadura. Las células crecieron durante una noche y luego se congelaron como partes alícuotas de 1 ml de reserva NG.

20 Las diluciones del cultivo se extendieron en placas sobre medio PIA que contenía carbenicilina (900 µg/ml) y se incubaron a 30°C. Se observaron unos pocos mutantes mucoides. A partir del escrutinio, que incluía la inspección de más de 4 x 10⁵ colonias, se seleccionaron los dos mutantes más mucoides para una evaluación adicional en estudios con fermentador. El mejor mutante, Pf201 producía en fermentación 11-13 g de alginato por litro de medio PM5 que contenía 40 g de fructosa como fuente de carbono por litro, tal y como se muestra en la Figura 2. Para las condiciones de crecimiento y la composición del medio, se hace referencia a Materiales y Métodos. El alginato producido por el mutante Pf201 usando el medio PM5 que contenía fructosa, y en condiciones de crecimiento convencionales, contiene aproximadamente 30% de G (residuos de guluronato) con una ausencia completa de bloques G, como se puede estimar a partir de la Figura 3. Basándose en las propiedades únicas de producción de

alginato, se seleccionó la cepa Pf201 para un desarrollo adicional de la cepa. El mutante de *P. fluorescens* Pf201 del ejemplo 1 se ha depositado en la NCIMB con el número de orden 41137.

Ejemplo 2

Clonación y secuenciación de partes del operón biosintético de alginato

- 5 Una genoteca de la cepa de tipo silvestre NCIMB 10525, fue construida en λ DASH II (lambda DASH II) (adquirido en Stratagene). El ADN cromosómico se aisló tal y como describen Ausubel et al., 1993, Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates, Inc y John Wiley & Sons Inc, Nueva York. A continuación, la genoteca se construyó mediante la inserción de ADN cromosómico digerido parcialmente con *Sau3AI*, procedente de NCIMB 10525, en lambda DASH II digerido con *Bam*HI y la infección de *E. coli* XL1-Blue MRA(P2) con los fagos empaquetados *in vitro* de acuerdo con las instrucciones del fabricante de *Bam*HI (Stratagene/Gigapack III Gold Extract). El marcado de la sonda de ADN y la detección de los clones λ que se hibridaban, se realizaron empleando el kit DIG DNA Labeling and Detection (Boehringer Mannheim) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Un fragmento de ADN de 3,8 *Mfe*I-*Nco*I procedente de pBBg10 que contenía *algG* flanqueado por partes de *algE* y *algX* de *P. aeruginosa* se marcó y se utilizó para escrutar la genoteca de *P. fluorescens*. Un fago que se hibridaba, denominado Pfl1, se detectó utilizando este sistema y se aisló el ADN de λ utilizando el kit Lambda Midi (QIAGEN). El inserto se subclonó como fragmentos de ADN digeridos con *Sal*I en pGEM11, dando como resultado los cuatro subclones pMG24-27. La secuenciación de los extremos de los subclones y la comparación con el operón biosintético de alginato de *P. aeruginosa*, reveló que Pfl1 contiene la parte aguas abajo del operón biosintético de alginato procedente de la parte 3' de *algE* (Figura 4).
- 10
- 15
- 20 pMG26 y pMG27 fueron secuenciados mediante Quiagen Sequencing & Genomics para obtener la secuencia completa de *algGXLIJFA*. Esta organización génica parece ser similar a las agrupaciones de biosíntesis de alginato citadas previamente en; May y Chakrabarty, 1994, Trends Microbiol., 2, págs. 151-157, Rehm et al., 1996, J. Bacteriol., 178, págs. 5884-5889, Penaloza-Vázquez et al., 1997, J. Bacteriol., 179, págs. 4464-4472, Vázquez et al., 1999, Gene, 232, págs. 217-222. La secuencia se ha presentado a GenBank y ha recibido el número de orden AF527790.
- 25

Ejemplo 3

Preparación de cepas variantes negativas para epimerasa

- La cepa mutante Pf201 del Ejemplo 1 se sometió a una mutagénesis adicional usando nitrosoguanidina utilizando una modificación del método descrito en el Ejemplo 1. Células de *P. fluorescens* NCIMB 10525 con crecimiento exponencial se sometieron a mutagénesis con nitrosoguanidina (NG): Las células bacterianas se lavaron dos veces con un volumen igual de tampón Tris/ácido maleico (TM) pH 6,0 que contenía NH_4SO_4 (1,0 g/l), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4,4 mg/l), KNO_3 (6,1 mg/l), ácido maleico (5,8 g/l), Tris (hidroximetil)-aminometano (6,05 g/l), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,25 mg/l) y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g/l). Las células se resuspendieron en 80% del volumen de cultivo original del tampón TM y se expusieron a NG (50 $\mu\text{g/ml}$) durante 1 hora a 30°C. Las células sometidas a mutagénesis se lavaron con tampón fosfato 0,1 M pH 7,0 que contenía KH_2PO_4 (13,6 g/l) y NaOH (~2,32 g/l) y se inocularon (2% de inóculo) en medio LB y se incubaron durante la noche. La tasa de mortalidad del procedimiento de mutagénesis se calculó que era aproximadamente el 90% usando como testigo una parte alícuota del cultivo no sometida a mutagénesis. Después de la mutagénesis, el cultivo se dejó crecer en medio LB durante la noche, y diluciones de las células se extendieron en placas sobre medio LA que contenía liasa de G procedente de *Klebsiella aerogenes* (aproximadamente 0,1 U/placa), como se describe en Chitnis. et al., 1990, J. Bacteriol., 172, págs. 2894-2900. Esta liasa de G escinde solo los enlaces G-M (residuo guluronato-manuronato) y G-G (residuo guluronato-guluronato) en el alginato, Haugen et al., 1990, Carbohydr. Res., 198, págs. 101-109.
- 30
- 35
- 40

- Los mutantes mucoides aparecieron con una frecuencia de aproximadamente 1 en 7.500 en tales placas selectivas. Un mutante mucoides se aisló y se denominó Pf20118. Pf20118 se cultivó en un fermentador en condiciones de crecimiento estándar usando medio PM5, consultar Materiales y Métodos. El polímero producido se analizó por espectroscopía ^1H -RMN. Los resultados de este análisis mostraron que el mutante producía manuronano puro, consultar la Figura 3. Se realizaron diversas fermentaciones con Pf20118 utilizando condiciones estándar de crecimiento y el medio PM5. Los rendimientos volumétricos estaban en el intervalo de 14-16 g de manuronano por litro a partir de 40 g de fructosa por litro de medio, en fermentaciones de aproximadamente 35 horas. El mutante de *P. fluorescens* Pf20118 obtenido a partir de Pf201 fue sometido a más de 70 experimentos diferentes en fermentador, ninguno de los cuales indicó inestabilidad en las propiedades productoras de manuronano. Tanto Pf201 como Pf20118 se cultivaron durante 60 generaciones sin aparición de colonias no mucoides. Aunque parecía probable que Pf20118 tenía un defecto en el gen de la C-5-epimerasa de manuronano, *algG*, no se puede excluir que las mutaciones afectaran a otras proteínas, que de alguna manera podrían ser necesarias para la epimerización.
- 45
- 50
- 55 Una localización preliminar de las mutaciones responsables del fenotipo que produce manuronano se realizó por sustitución génica del alelo de *algG* en cada uno de los mutantes, por *algG* de tipo silvestre. Un vector de sustitución génica, pMG31, codificaba *algG* de tipo silvestre y las primeras 135 pb de *algX* aguas abajo se construyó tal y como se describe en la Tabla 1. El plásmido se conjugó en Pf20118 como se ha descrito en Materiales y Métodos, utilizando PIA que contenía tetraciclina como medio selectivo. Colonias no mucoides aparecieron debido a la

alteración del operón biosintético de alginato ya que pMG31 se recombinaba en *algG*. Una colonia transconjugante no mucóide se incubó en cultivos líquidos de una noche, secuenciales de 2-6, en ausencia de tetraciclina para permitir la pérdida del plásmido integrado. Cultivos con crecimiento exponencial se diluyeron 10^4 - 10^9 veces y se sembraron en placas con agar PIA para escrutar los revertientes mucóides. Las colonias mucóides se volvieron a sembrar por el método de estría sobre agar L que contenía liasa de G para analizar si producían alginato epimerizado. Se encontraron tales revertientes no mucóides, lo que confirma que la mutación tenía que estar en el fragmento de ADN correspondiente al fragmento *algGX'* de pMG31. El gen *algG* se amplificó mediante PCR usando los cebadores a P*falgG3r* y P*falgG4f*, se secuenció y se identificó la mutación, consultar la Tabla 3.

Se prepararon otras tres cepas obtenidas a partir de mutantes negativos para epimerasa de acuerdo con el procedimiento expuesto más arriba, y se denominaron Pf2012, Pf2013 y Pf20137, respectivamente. Todas ellas tienen una mutación identificada en su gen *algG* que da como resultado un aminoácido diferente en su producto génico *AlgG*, como se expone en la Tabla 3 a continuación, y este cambio de aminoácido es suficiente para inactivar la proteína. Los mutantes produjeron aproximadamente los mismos niveles de manuronano puro que Pf20118, cuando se cultivaban en las mismas condiciones. El defecto de epimerización de los mutantes se podía revertir mediante recombinación con el gen de tipo silvestre en pMG31.

Tabla 3 Mutaciones en *algG* en mutantes productores de manuronano

Mutante	Mutación en <i>algG</i>	Sustitución de aminoácidos en el producto génico
Pf2012	G(1081)→A(1081)	Asp(361)→Asn(361)
Pf2013	G(1289)→A(1289)	Gly(430)→Asp(430)
Pf20118	C(1222)→T(1222)	Arg(408)→Leu(408)
Pf20137	C(-3) →T(-3) C(1010) → T(1010)	Ser(337) →Phe(337)

Las cepas mutantes de la tabla 3 se depositaron en la NCIMB con los números de orden; Pf2012 tiene el número de NCIMB 41138, Pf2013 tiene el número de NCIMB 41139, Pf20118 tiene el número de NCIMB 41140 y Pf20137 tiene el número de NCIMB 41141.

Ejemplo 4

Preparación de cepas negativas para acetilasa y variantes modificadas, Pf20118algFΔ y Pf20118algJΔ

Un mutante por delección de *algF* de Pf20118 se preparó primero, mediante la construcción de un fragmento de ADN mutante que contenía secuencias flanqueantes de una delección en marco de partes de *algF*, y después ligando el fragmento en el vector suicida pMG48, como se describe en la Tabla 1. El plásmido resultante, denominado pMG79, se transfirió a la cepa de *P. fluorescens* Pf20118 mediante conjugación, tal y como se describe en Materiales y Métodos, y los transconjugantes se seleccionaron como colonias azules sobre placas con PIA que contenían XGal y tetraciclina. Los recombinantes dobles se seleccionaron como colonias blancas y mucóides sobre placas con PIA que contenían XGal. Estos candidatos se sometieron a ensayo adicionalmente para estudiar la sensibilidad a tetraciclina. Veinticuatro candidatos blancos sensibles a la tetraciclina se sometieron a ensayo con PCR usando la pareja de cebadores *algF*-1-fw y *algF*-2-Rev como se indican en la Tabla 2, y los productos se analizaron por electroforesis en gel. Los productos de la PCR de veintidós de los candidatos tenían la longitud esperada para el alelo *algF* de tipo silvestre (1,0 kb). Sin embargo, los otros dos tenían la longitud esperada para el alelo mutante Δ*algF* (0,7 kb). Uno de ellos fue denominado Pf20118algFΔ.

Un mutante por delección de *algJ* fue creado, creando primero un derivado (pMG49) de pMG27 a partir del cual se había eliminado un fragmento de ADN de 1,4 kb *NruI-HpaI* que contenía los 261 nucleótidos 3' de *algI* y los 1140 nucleótidos 5' de *algJ*. La estructura artificial por delección codifica una fusión en marco de *AlgI* y *AlgJ* asegurando que *AlgF* y *AlgA* se podían traducir normalmente. A continuación, se ligó un fragmento de ADN de 3,4 kb *SacI-XbaI* procedente de pMG49 en el vector suicida pHE55 digerido con las mismas enzimas, creando pMG50. Este plásmido, que contenía las secuencias que flanquean la delección, se introdujo en Pf20118 mediante conjugación desde *E. coli* S17.1 y se seleccionaron los transconjugantes no mucóides con tetraciclina en medio PIA. Los revertientes transconjugantes se identificaron como colonias mucóides sensibles a la tetraciclina sobre medio LA. Cuatro candidatos mutantes *algJ*Δ se sometieron a ensayo mediante amplificación con PCR de una región que contenía la región delecionada usando la pareja de cebadores P*facetylFw* y P*facetylRev* (Tabla 2) y el producto de la PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Dos de las colonias contenían el fragmento de tipo silvestre (1,8 kb), mientras que las otras dos contenían el segmento mutante (0,4 kb). Una de ellas se denominó cepa Pf20118algJΔ. Pf20118algFΔ y Pf20118algJΔ se cultivaron en fermentadores usando el medio PM5 y condiciones de crecimiento convencionales tal y como se indica en Materiales y Métodos, y el alginato producido se recogió y se midió como se ha descrito anteriormente. Los resultados se proporcionan en la Tabla 4 a continuación.

Ambas variantes producían alginato de manuronano con rendimientos de 16-17 g de alginato por litro de medio. La presencia de grupos acetilo se determinó por espectroscopía $^1\text{H-RMN}$, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Pf20118algF Δ no produjo alginato acetilado, mientras que Pf20118algJ Δ producía alginato que contenía pequeñas cantidades de grupos O-acetilo.

- 5 Tabla 4 Rendimiento en alginato, fracción de contenido en residuos de guluronato [F_G], grado de acetilación [da] y viscosidad intrínseca [η] en fermentaciones con diferentes mutantes de *P. fluorescens*

Mutante	Alginato (g/l)	F_G (%)	da	η (dl/g)
Pf201	11,3	29	0,44	16,5
Pf20118	16,0	0	0,60	17,3
Pf20118 algJ Δ	16,8	0	0,03	10,9
Pf20118 algF Δ	16,2	0	0	8,9

Las fermentaciones se realizaron en fermentadores de 3 l utilizando medio PM5 y condiciones de crecimiento convencionales. Los análisis se realizaron como se ha descrito en Materiales y Métodos.

- 10 Pf20118algF Δ y Pf20118algJ Δ se han depositado en la NCIMB con los números de orden 41142 y 41143.

Ejemplo 5

Preparación de cepas mutantes derivadas modificadas que presentan una actividad liasa de alginato baja, Pf20118AlgLH203R.

- 15 *P. fluorescens*, según los conocimientos actuales, tiene solo una liasa de alginato (AlgL) codificada por el gen *algL*. Una opción para controlar el peso molecular del alginato producido por esta bacteria es, por lo tanto, modificar el producto génico AlgL producido simultáneamente.

- 20 La pareja de cebadores mutágenos algLH203R1/algLH203R2 se utiliza para crear una mutación His203Arg (H203R) en el gen *algL* de Pf20118. Los cebadores también contienen mutaciones silenciosas que crean un sitio *Agel*, para la identificación de alelos. El plásmido mutágeno pMG70 se construyó, tal como se ha descrito en la Tabla 1, y se introdujo en el cromosoma Pf20118 mediante conjugación, y se seleccionaron transconjugantes en medio PIA con tetraciclina y XGal. Los transconjugantes se cultivaron en series de cultivos de una noche en ausencia de tetraciclina y se sembraron sobre medio PIA con XGal para aislar los mutantes AlgL. Los candidatos mutantes blancos, sensibles a la tetraciclina se escrutaron mediante amplificación con PCR del alelo *algL* usando los cebadores PfaIgL-BspHI-pMG26 y PfaIgLRev1 (Tabla 2), y los alelos se identificaron mediante la digestión del fragmento de PCR con *Agel*. La cepa mutante elegida se denominó Pf20118AlgLH203R.

- 25 Cuando la cepa variante Pf20118AlgLH203R se cultiva en matraces de agitación con el medio PIA con sal reducida, produce cantidades de manuronano, aproximadamente al mismo nivel que la cepa variante Pf20118. También el crecimiento en fermentador dio lugar a aproximadamente las mismas cantidades de manuronano producidas a partir de las dos cepas variantes (H203R produjo 12 g de alginato de manuronano por litro). Mediciones de la viscosidad intrínseca del manuronano producido por Pf20118 (viscosidad intrínseca de 15 dl/g) y Pf20118AlgLH203R (viscosidad intrínseca de 37 dl/g) en matraces de agitación (usando medio PIA con sal reducida, no se añadieron proteasas) muestran que esta última produce un manuronano con peso molecular incrementado. Pf201 produce alginato con una viscosidad intrínseca como Pf20118 (14 dl/g).

- 35 Las células bacterianas de Pf201, Pf20118 y Pf20118AlgLH203R se recogieron al final de la fermentación en matraces de agitación y se sometieron a ultrasonidos. Después de los ultrasonidos, los extractos se analizaron para estudiar la actividad liasa de alginato, que se midió por el método tal como se establece en Materiales y Métodos. Definiendo la actividad liasa de Pf201 como 100%, es posible detectar actividades inferiores de hasta el 2% utilizando este método. Pf20118 mostró una actividad del 93%. No se detectó actividad para Pf20118AlgLH203R, lo que indica que es menor del 2% de la de la cepa Pf201. Sin embargo, cuando se añadieron las proteasas alcalasa y neutrasa, ambas a 0,15 ml/l, las viscosidades intrínsecas se incrementaron a aproximadamente 50 dl/g para Pf201 y Pf20118, y a 70 dl/g para Pf20118AlgLH203R, lo que indica que la liasa mutante tiene alguna actividad residual. La cepa variante Pf20118AlgLH203R se depositó en la NCIMB con el número de orden 41144.

Ejemplo 6

Preparación de cepas mutantes variantes con actividad epimerasa reducida

- 45 Las cepas mutantes Pf201 y Pf20118 proporcionan los medios para preparar alginato *in vivo*, con aproximadamente 30% de contenido en residuos de guluronato y manuronano puro, respectivamente. Sin embargo, alginatos con

cantidades intermedias de contenido en ácido gulurónico (residuo guluronato) que se encuentra entre 0 y 30%, también se pueden preparar. Una forma de obtener tales cepas es delecionar el gen de la epimerasa a partir del operón, y luego introducir el gen controlado por un promotor ya sea en un plásmido o un transposón. El plásmido pMG53 se construyó tal y como se ha descrito en la Tabla 1, este plásmido contiene una variante de *algG* en la que se ha delecionado el 40% interno del gen se ha eliminado. Este plásmido se transfirió a continuación a Pf201 y una cepa que contenía esta delección, denominada Pf201 Δ *algG*, se preparó por recombinación homóloga. Esta cepa no producía alginato, aunque produjo oligourónidos pequeños que contenían un residuo insaturado en el extremo no reductor. El plásmido pCNB111 es un plásmido suicida que contiene un minitransposón basado en Tn5. Los genes se pueden clonar en este minitransposón de tal manera que su expresión está controlada por el promotor *Pm* inducible. El gen *algG* de tipo silvestre se transfirió a este plásmido tal y como se describe en la Tabla 1, creando el plásmido pKB10. El plásmido se conjugó en Pf201 Δ *algG* tal y como se ha descrito en la descripción general de Materiales y Métodos, mediante recombinación homóloga. Pero la incorporación en el cromosoma dependía, en este caso, del transposón, no de la homología. La cepa resultante se denominó Pf201 Δ *algG*::TnKB10. Esta cepa produce alginato incluso en ausencia de inductor, pero la cantidad de polímero aumenta con el aumento de la concentración del inductor (no se muestra). Cuando el producto se analizó mediante RMN y espectrometría de masas, se encontró que la cepa produce una mezcla de alginato y oligómeros. pKB10 también se transfirió a Pf20118, creando la cepa Pf20118::TnKB10. Esta cepa produce una mezcla de alginato de tipo silvestre que contiene 30% de G y manuronano (resultados no mostrados). Estos resultados mostraron que la epimerasa no solo es necesaria para la producción de alginato, también epimeriza como parte de un complejo proteico. Con el fin de obtener alginato homogéneo, solo puede estar presente una forma de epimerasa.

Un método para la preparación de cepas variantes con reducción de la actividad epimerasa es intercambiar *algG* de tipo silvestre por un gen mutante que codifica una proteína mutante con actividad reducida. Ahora se ha establecido un método para la obtención de tales mutantes, utilizando las propiedades de Pf201 Δ *algG* y pKB10. Células de *E. coli* con crecimiento exponencial (DO_{600nm}: 0,5) S17.1 λ -pir (pKB10) se mutagenizaron con nitrosoguanidina. Las células procedentes de cultivos de 5 ml se lavaron dos veces en 5 ml de tampón TM (1,0 g/l de (NH₄)₂SO₄, 0,1 g/l de MgSO₄ x 7H₂O, 5 mg/l de Ca(NO₃)₂, 0,25 mg/l de FeSO₄ x 7H₂O, 5,8 g/l de ácido maleico, 6,05 g/l de Tris, pH ajustado a 6,0 con NaOH). Las células se suspendieron de nuevo en 2,85 ml de tampón TM y se trataron con 100 μ g/ml de nitrosoguanidina a 37°C durante 30 min. La suspensión se enfrió sobre hielo durante tres minutos, las células se sedimentaron por centrifugación y se lavaron tres veces en 5 ml de LB. Se añadió glicerol hasta tener una concentración final del 10%, y la suspensión se congeló a -80°C. Solo sobrevivió a la mutagénesis el 0,007% de las células. Los plásmidos se aislaron a partir de las células descongeladas y se transformaron en *E. coli* S17.1 λ -pir, de la tabla 1. Los plásmidos se denominaron entonces pKB10-M* para destacar que constituyen una genoteca de versiones mutadas de pKB10.

A continuación, pKB10-M* se conjugó en *P. fluorescens* Pf201 Δ *algG* tal y como se ha descrito en la sección Materiales y Métodos (bajo "recombinación homóloga"), excepto que 100 μ l de *E. coli* λ -pir (pKB10-M*) se inocularon directamente en 10 ml de medio LB y se cultivaron durante 2 horas antes de mezclar con la cepa de *P. fluorescens*. La DO_{600 nm} de ambos cultivos era de 0,4. Después de la incubación sobre medio LA a 30°C durante 36 horas, la mezcla de conjugación se cultivó en placas sobre medio PIA (Difco) que contenía 40 μ g/ml de kanamicina (Km). Solo las células de *P. fluorescens* en las que se había integrado el transposón TnKB10-M* en el cromosoma crecieron sobre este medio, porque pKB10 y sus derivados eran incapaces de replicarse en *P. fluorescens*. Incluso en ausencia de inductor, se expresa algo de AlgG a partir del promotor *Pm* en *P. fluorescens* y este nivel es suficiente para proporcionar colonias mucoides en la cepa Pf201 Δ *algG*::TnKB10. Aproximadamente el 0,5% de las colonias eran no mucoides indicando que el gen *algG* en estas células no se expresaba debido a mutaciones en el promotor *Pm* o en la secuencia líder de ARNm, o que la proteína AlgG no era funcional.

Cada placa (245 x 245 mm) contenía 4-5000 colonias, y entre 1200 y 1400 de las mismas se podían seleccionar de cada placa utilizando un selector de colonias automatizado, Genetix Q-pixil, Genetix Limited, UK. Los parámetros se ajustaron de tal manera que las colonias pequeñas (no mucoides) no se seleccionaron. Se desarrolló un método para escrutar la cepa que contenía la genoteca mutada. En este escrutinio se midieron los parámetros de crecimiento celular, producción de alginato (medida usando una mezcla de liasas M y G) y contenido en G (medido empleando solo liasas G), respectivamente.

Crecimiento de bacterias

Las colonias se replicaron en dos medios líquidos diferentes en placas de 96 pocillos utilizando un selector de colonias de Genetix Q-pixil. Para conservar los clones, una réplica se cultivó en 110 μ l de medio LB que contenía triclosán (0,025 g/l) y kanamicina (Km) (40 mg/l) y se incubó durante 48 horas a 25°C. Se añadió el glicerol (60%, 40 μ l) a cada pocillo, las soluciones se mezclaron y las placas se congelaron a -80°C.

Las otras réplicas se cultivaron en 0,5 X PIA (peptona bacteriológica (10 g/l), NaCl (2 g/l), MgCl₂ (0,7 g/l), K₂SO₄ (5 g/l), glicerol (5 g/l), triclosan (0,025 g/l) y Km (40 mg/l)). Se añadió m-toluato (inductor) hasta 0,1 mM. Las bacterias se cultivaron en placas Nunc de 96 pocillos V, estériles que contenían 110 μ l de medio/pocillo, y se incubaron durante 72 horas a 25°C utilizando 900 rpm, amplitud del movimiento orbital 3 mm.

Medición de la producción de alginato

Se añadió NaCl (0,2 M, 120 μ l) a cada pocillo, y las células se sedimentaron por centrifugación (3900 g, 20°C, 30 min). Se transfirieron 50 μ l de material sobrenadante de cada pocillo a una placa de 96 pocillos de fondo plano de Nunc. El alginato se desacetiló mediante la adición de NaOH (0,6 M, 10 μ l) a cada pocillo, mezclando durante 25 segundos, e incubando a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, se añadieron 100 μ l de tampón de reacción de liasa (Tris-HCl 50 mM, 1,5% de NaCl (pH 7,5)) y las soluciones se mezclaron durante 60 segundos.

Se transfirieron 75 μ l de cada pocillo a una placa de 96 pocillos de Costar UV. Se añadieron otros 150 μ l de tampón de reacción de liasa y las soluciones se mezclaron durante 25 segundos. Se leyó la absorbancia a 230 nm (A1), a continuación, se añadieron 8 μ l de liasa de alginato específica de G (0,2 U/ml) a cada pocillo. Las soluciones se mezclaron durante 25 segundos y se incubaron a temperatura ambiente durante 60 min. Se mezclaron de nuevo durante 25 segundos, y se leyeron a A230nm (A2). A continuación, se añadieron 8 μ l de liasa de alginato específica de M (1 U/ml) a cada pocillo, las soluciones se mezclaron durante 25 segundos y se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos. Las soluciones se mezclaron de nuevo durante 25 segundos y se leyeron a A230nm (A3). La absorbancia de las liasas añadidas se restó de las lecturas de A2 y A3. Los alginatos de composición conocida (poli(ácido manurónico) producido por Pf20118 y alginato con un contenido en G del 30% producido por Pf201) se utilizaron como patrones en los ensayos.

La cantidad total de alginato se calcula en base a la fórmula:

$$A_{alg} = A3 - A1$$

Mediante la comparación de A_{alg} de las muestras con A_{alg} procedente de patrones, con una concentración de alginato conocida, se calculó a la concentración de alginato en las muestras.

Medición del contenido en ácido gulurónico (G)

El contenido relativo en G (G_r) en una muestra se calcula con la fórmula

$$G_r = (A2 - A1) / (A3 - A1)$$

Mediante la comparación de G_r procedente de las muestras con G_r de los patrones, se calculó el contenido en G en la muestra.

Se escrutaron diez mil colonias de esta manera, y se seleccionaron unos pocos candidatos con la actividad alterada, pero que no fuera nula. Estos mutantes se cultivaron después en matraces de agitación, tal como se ha descrito en Materiales y Métodos. Al medio PIA utilizado se añadió triclosán (0,025 g/l), kanamicina (40 mg/l) y m-toluato (0,1 mM), y el alginato producido se analizó por RMN como se ha descrito en la sección de Materiales y Métodos. Un mutante producía alginato que contenía solo 13% de residuos de ácido gulurónico, mientras que el tipo silvestre producía alginato que contenía aproximadamente 30% de residuos de ácido gulurónico (Tabla 4). También se encontraron algunas otras cepas productoras de manuronano puro. El método facilita el escrutinio de formas mutantes de AlgG que introducen menos ácido gulurónico que la enzima de tipo silvestre.

Con el fin de producir otras cepas mutantes variantes que producen un producto de alginato deseado, los genes mutantes se pueden recuperar usando técnicas de PCR conocidas, clonando en pMG48 y transfiriendo a Pf201 o en realidad a cualquiera de las cepas superproductoras utilizando recombinación homóloga, como se ha descrito anteriormente en la descripción. De manera similar a las cepas que producen manuronano; Pf2012, Pf2013, Pf20118 y Pf20137, una mutación puntual en *algG* que afecta a la epimerización, no es probable que afecte a la cantidad de alginato producido.

Ejemplo 7

Preparación de cepas mutantes variantes con actividad epimerasa reducida

Un método alternativo para la preparación de cepas variantes con reducción de la actividad epimerasa es el intercambio de *algG* de tipo silvestre por un gen mutante que codifica una proteína mutante con menos actividad. Cuatro sustituciones de aminoácidos diferentes se muestran en la Tabla 3 para proporcionar mutantes de AlgG negativos para epimerasa. En estos cuatro casos, el cambio de aminoácido afecta al tamaño o a la carga del aminoácido, en dos de ellos se cambian ambas propiedades. Los posibles aminoácidos adicionales también se pueden identificar mediante la secuenciación de los mutantes que se han encontrado por el método descrito en el ejemplo 6. Alelos alternativos de *algG* que codifican cambios más conservadores en estos aminoácidos, se preparan mediante mutagénesis específica del sitio, utilizando pMG26 como molde. Se preparan cebadores mutágenos que contienen un codón para el nuevo aminoácido, flanqueado por aproximadamente 10-15 nucleótidos idénticos a los de la secuencia conocida. Las mutaciones en Ser337 destruirán el sitio *Sma*I, los cebadores para los otros aminoácidos tendrán preferiblemente mutaciones silenciosas que introducen un sitio de enzima de restricción para ayudar en la identificación de las nuevas cepas mutantes. Los cebadores para ambas cadenas se tienen que sintetizar y la mutagénesis se lleva a cabo tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos. Los alelos de *algG*

mutados se transfieren luego a pMG48 digerido con *NsiI-NcoI* como un fragmento de ADN digerido con *BspHI-PstI* de 2,7 kb. Los plásmidos resultantes se transfieren a Pf201 y los transconjugantes se seleccionan por ser no mucoides, resistentes a la tetraciclina y azules en placas de agar que contienen XGal. Después de cultivar los clones seleccionados durante varias transferencias sucesivas en medio LB, se seleccionan los recombinantes dobles por tener colonias blancas, mucoides en placas de agar que contienen XGal, y por ser sensibles a la tetraciclina. El *algG* procedente de estos candidatos se puede amplificar usando la pareja de cebadores P_{algG5f} y P_{algG3r}. El producto amplificado tiene una longitud de 1,7 kb. Si se elimina un sitio de restricción, o es introducido por los cebadores, los mutantes correctos se identifican mediante el uso de la enzima de restricción correspondiente. Alternativamente, los candidatos se confirman por secuenciación del ADN.

- 10 Las cepas mutantes se cultivan en matraces de agitación, y el alginato producido se aísla tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos. La cantidad de alginato y el contenido en G se determinan empleando liasas de M y G, tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos. Los resultados de cepas interesantes son verificados mediante espectroscopía de RMN.

Ejemplo 8

- 15 Preparación de la cepa mutante variante Pf201MC con un promotor inducible *Pm* para la regulación de la producción de alginato

El promotor *Pm* junto con su proteína efectora XylS es conocido por ser un promotor fuerte inducible que se puede utilizar en muchas especies gram-negativas, Blatny et al., 1997,63, Appl. Environ. Microbiol. págs. 370-379. El inductor utilizado es frecuentemente toluato, que difunde libremente a través de las membranas bacterianas. La cepa de *P. fluorescens* Pf0-1 ha sido secuenciada en JGI (The DOE Joint Genome Institute) (http://spider.jgipsf.org/JGI_microbial/html/pseudomonas/pseudo_homepage.html). Cuando se comparó el operón alginato de esta cepa con secuencias conocidas del operón de alginato de otras especies de *Pseudomonas*, se encontró que la organización era similar. Todas las especies de *Pseudomonas* productoras de alginato secuenciadas también tienen el mismo marco de lectura abierto conservado, aguas arriba del promotor de alginato. Codifica potencialmente una proteína, cuya función es desconocida. El objetivo de este experimento era el intercambio de secuencias aguas abajo del codón de parada para este marco de lectura y aguas arriba del codón de inicio de *algD*, el primer gen en el operón de alginato, con secuencias que codifican XylS, el promotor *Pm* y la secuencia de Shine-Dalgarno del vector pJB658 descrito en Blatny et al., 1997, 38, págs. 35-51. La mayoría del segmento de ADN, que separa *xyIS* y el promotor *Pm* en pJB658, se eliminó.

- 30 La primera etapa era clonar la parte 3' de la proteína hipotética (abreviada, *hyp*) y la parte 5' de *algD* con el fin de obtener secuencias flaqueantes para la inserción. Cuando se compararon las secuencias de *algEGXLIJFA* de la cepa Pf0-1, con las secuencias de NCIMB10525, se encontró que las dos secuencias no eran idénticas. Por tanto, los cebadores se construyeron utilizando partes de los genes *hyp* y *algD*, que están muy conservados en varias especies. La parte 3' de *hyp* se clonó como un fragmento de PCR digerido con *BspLU111-SpeI* de 0,7 kb usando los cebadores HypBspLU111 y HypSpeI de la Tabla 2, en el vector suicida pMG48, generando pHE139. La parte 5' de *algD* se clonó como un fragmento de PCR restringido con *NdeI-NsiI* de 0,8 kb en pJB658celB restringido con *NdeI-PstI*, generando pHE138. El vector de reemplazamiento pMC1, consultar la Figura 5, se construyó a continuación, a través de una serie de etapas de clonación (Tabla 1).

- 40 El plásmido se transfirió por conjugación a la cepa Pf201 tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos, seleccionando la resistencia/sensibilidad a XGal y tetraciclina para escrutar los recombinantes y posteriormente los recombinantes dobles. Las colonias, que parecían ser más mucoides en medio PIA que contenía toluato 1 mM, que en medio PIA que no contenía toluato, se seleccionaron para realizar otros análisis con PCR. Usando la pareja de cebadores HypBspLU111 y AlgDNsil (Tabla 2), el producto de PCR esperado a partir de cepas de tipo silvestre tendría 2,3 kb de longitud, mientras que el de la cepa mutante tendría 3,0 kb. El mutante elegido se denominó Pf201MC. A continuación, esta cepa se fermentó en ausencia y presencia de toluato (0,025 mM) como inductor. Se emplearon medio PM5 y condiciones convencionales durante la fermentación, como se ha descrito en Materiales y Métodos. El cultivo no inducido produjo 3,5 g de alginato por litro de medio, mientras que el cultivo inducido producía 13 g de alginato por litro de medio. La cepa mutante Pf201MC se depositó en la NCIMB con el número de orden 41145.

- 50 Ejemplo 9

Uso de un promotor *Pm* inducible mutado para la regulación de la producción de alginato

- El promotor *Pm* de tipo silvestre funciona, a pesar de que el nivel de expresión no inducida es bastante alto. Se ha desarrollado un método para escrutar mutaciones en dicho promotor, basado en el trabajo de Winther-Larsen et al., Metabol. Eng. (2000), 2, págs. 92-103. El pJT19-bla original se cambió mediante la inserción de una secuencia de terminación y un sitio *AflII*, aguas arriba del promotor *Pm* y el sitio *SpeI* aguas abajo del promotor se cambió a un sitio *BspLU111*. El nuevo plásmido se denominó pB11. En este plásmido, el promotor *Pm* está flanqueada por sitios de restricción únicos *XbaI* y *BspLU111*. A continuación, se sintetizaron dos oligómeros de ADN de 50 pb complementarios que cubrían este fragmento de ADN. Las condiciones se eligieron para proporcionar una tasa de

error de aproximadamente el 12% sobre los nucleótidos flanqueados por estos sitios de restricción. También se sintetizaron las cadenas de tipo silvestre correspondientes. A continuación, se preparó una genoteca de oligonucleótidos de doble cadena, mediante la reasociación de cada uno de los oligonucleótidos que contenían mutaciones con el oligonucleótido de tipo silvestre complementario. Los extremos de los oligonucleótidos se construyeron para que fueran complementarios a pIB11 restringido con *Xba*I y *Bsp*LU111. Los oligonucleótidos reasociados se ligaron a continuación en pIB11 restringido con *Xba*I y *Bsp*LU111, y se obtuvieron 50000 transformantes. En *E. coli*, esta genoteca se podía escrutar utilizando la resistencia a la ampicilina como marcador. Pero *P. fluorescens* ya tiene una resistencia bastante elevada a las β -lactamas. El gen de la β -lactamasa se intercambió con un gen que codifica luciferasa como se ha descrito en la Tabla 1, creando los vectores pHH100 que contienen el promotor de tipo silvestre y una genoteca de pHH100 que contiene la genoteca de promotores. La genoteca de pHH100 contiene 8.000 transformantes independientes. A continuación, se transfirió a *P. fluorescens* mediante conjugación tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos.

La genoteca de promotores *Pm* mutados se escrutó para buscar actividad luciferasa utilizando el ensayo descrito por Wood, K.V. y DeLuca, M. (1987, Anal. Biochem. 161: 501-507). Para obtener resultados reproducibles, encontramos que primero las bacterias tenían que ser cultivadas en placas de microtitulación que contenían 110 μ l de medio PIA líquido con 40 μ g/ml de kanamicina (Km) (25°C, 48 horas, con agitación a 900 rpm). Algunas bacterias se diluyeron después en medio de nuevo aporte, empleando un sello estéril para la transferencia, y luego se estamparon sobre dos filtros de nilón. Los filtros se colocaron sobre placas PIA con y sin inductor (m-toluato 1 mM), las bacterias hacia arriba, y se incubaron durante 14 horas a 30°C. El filtro se colocó después en una placa de Petri que contenía 3 ml de luciferina (Promega), (1 mM en citrato sódico 0,1 M, pH 5,0), se agitó hasta que el líquido se distribuyó uniformemente y se incubó durante 10 minutos. Se colocó sobre un papel de filtro para eliminar el líquido y se colocó, boca abajo, sobre una película de plástico transparente. Un papel de filtro seco se colocó encima de él para eliminar la humedad residual. El filtro de nilón se expuso después durante 10 min, utilizando una cámara Kodak 2000IR. Se escrutaron 1200 colonias con este método y 84 se identificaron por que no mostraron ninguna actividad o solo una actividad débil de colonias cultivadas sin inductor y una actividad fácilmente detectable de colonias cultivadas en presencia de inductor. Se volvieron a escrutar setenta y nueve de estas colonias, y setenta y cinco de ellas mostraron una actividad significativamente menor en ausencia de inductor en comparación con la de tipo silvestre pHH100.

Seis de estos clones se cultivaron en 10 ml de LB que contenía 50 mg/l de kanamicina. Cinco fueron elegidos por que sus niveles de expresión sin inductor eran muy bajos, el sexto (Pf201 (pHH100-E1)) tenía un nivel de expresión intermedio sin inductor añadido, pero también tenía un nivel de expresión significativamente mayor en presencia de inductor. Cultivos en fase estacionaria (100 μ l) se transfirieron después a dos matraces de agitación que contenían 10 ml de medio LB de nuevo aporte y se incubaron durante dos horas antes de la adición de m-toluato hasta tener una concentración final de 1 mM. Los cultivos se recogieron 14 horas después de la inducción. A continuación se añadieron noventa μ l de cultivo a tubos de 1,5 ml que contenían 10 μ l de tampón (K_2HPO_4 1 M, EDTA 20 mM, pH 7,8) y se congelaron a -80°C. La actividad luciferasa se midió usando el sistema de ensayo de luciferasa de Promega Inc. (nº de Cat. E1500) (Tabla 5). El método demostró ser útil para encontrar promotores mutantes que lograban no solo un nivel de expresión no inducida muy bajo, sino que también tenían un nivel de expresión no inducida bajo y todavía un nivel de expresión inducida bastante elevado, en comparación con el tipo silvestre. Los resultados se proporcionan en la tabla más abajo.

Tabla 5 Actividades de luciferasa a partir de la expresión de *Pm* en mutantes de *P. fluorescens*

Clones	Células no inducidas		Células inducidas		Proporción ^c
	Actividad ^a	% ^b	Actividad ^a	% ^b	
NCIMB10525 (pHH100)	11,6	100	605	100	52
NCIMB10525 (pHH100-A2)	0,7	6,0	3,2	0,5	5
NCIMB10525 (pHH100-B1)	1,3	11	5,7	0,9	4
NCIMB10525 (pHH100-D6)	1,2	11	15	2,4	12
NCIMB10525 (pHH100-D9)	0,5	4,2	8,7	1,4	18
NCIMB10525 (pHH100-E1)	7,8	67	1050	173	134
NCIMB10525 (pHH100-G5)	0,5	4,3	69	11,4	138

La cepa NCIMB10525 se utilizó como muestra en blanco, y no tenía ninguna actividad medible. Se muestran los resultados promedio de dos inoculaciones independientes de cada cepa. a: La actividad se proporciona en unidades arbitrarias (los valores dependen de la configuración del instrumento). b: Actividad en porcentaje de los niveles de

tipo silvestre. c: Valores inducidos/no inducidos.

Ejemplo 10

Epimerización *in vitro* del producto de alginato de manuronano

5 El manuronano producido tal y como se describe en el ejemplo 4, se disolvió en tampón (Mops (50 mM), CaCl₂ (2,5 mM), NaCl (10 mM), pH 6,9) hasta tener una concentración de 0,25% de alginato de manuronano. AlgE4 C5-epimerasa de manuronano producida y purificada como describen Ramstad et al., Enzyme and Microbial Technology, (1999), 24, págs. 636-646, se añadió hasta tener una concentración de 1 mg de enzima/200 mg de manuronano. La solución se incubó a 37°C durante 23 horas. La epimerización se detuvo mediante precipitación en ácido del alginato. El alginato se volvió a disolver después en agua destilada y se neutralizó con álcali. A la solución de alginato se añadió NaCl hasta tener una concentración de 0,2% y un volumen de etanol (96%) para precipitar el alginato. El alginato precipitado se lavó 3 veces con etanol al 70% y 2 veces con etanol al 96%, y se liofilizó. El alginato liofilizado se trató adicionalmente y se analizó mediante RMN como se ha descrito en Materiales y Métodos. El producto después de esta incubación era un alginato casi totalmente polialternante (PoliMG, Tabla 6).

15 El poli MG se volvió a disolver en tampón (Mops (50 mM), CaCl₂ (2,5 mM), NaCl (10 mM), pH 6,9). AlgE1 C5-epimerasa de manuronano se produjo y se purificó tal y como describen Ramstad et al., Enzyme and Microbial Technology, (1999), 24, págs. 636-646, excepto que se purificó solo mediante cromatografía de intercambio iónico. Se añadió a una concentración de 1 mg de enzima/200 mg de manuronano. La solución se incubó a 37°C durante 4 días. AlgE1 adicional (1 mg de enzima/200 mg de manuronano) se añadió después de 1, 2 y 3 días de incubación. La epimerización se detuvo tal y como se ha descrito anteriormente. El alginato se aisló y se analizó por RMN tal y como se ha descrito anteriormente. El resultado de la epimerización era un alginato con un contenido en G que era > 95% (Tabla 6).

Tabla 6. Composición de alginato después de la epimerización de manuronano con AlgE4 y AlgE1

Alginato	FG	FM	FGG	FGM/MG	FMM
Manuronano	0	1,0	0	0	1,0
PoliMG (manuronano + AlgE4)	0,45	0,55	0	0,45	0,1
Poli G (PoliMG + AlgE1)	>0,95	<0,05	>0,9	<0,05	<0,02

Ejemplo 11

25 Producción de alginato utilizando diferentes fuentes de carbono

Las *Pseudomonas* son conocidas por tener la capacidad de utilizar numerosos compuestos para el crecimiento. En este ejemplo, se muestra la capacidad de metabolizar diferentes fuentes de carbono en alginato, usando el medio PM5, sustituyendo la fructosa por la fuente de carbono real. La composición del medio, las condiciones de crecimiento y el análisis de las concentraciones de alginato en estos experimentos de fermentación se realizaron tal y como se describe en la "Descripción General de Materiales y Métodos", a menos que se indique lo contrario.

La capacidad para producir alginato se muestra para un alcohol (glicerol), monosacáridos (fructosa, glucosa) y para un disacárido (lactosa) (véase la Tabla 7).

35 *P. fluorescens* no codifica β-galactosidasa, y por lo tanto es incapaz de utilizar la lactosa como fuente de carbono, aunque puede crecer sobre glucosa y galactosa. Transferimos el plásmido pHM2 que codifica β-galactosidasa de *E. coli* (LacZ) y permeasa de lactosa (LacY), según lo descrito por Mostafa, H. E., Heller, K. J., Geis, A. 2002. Appl. Environment. Microbiol. 68: 2619-2623, a la cepa Pf201 mediante conjugación, tal y como se ha descrito en el capítulo de la recombinación homóloga en la descripción. La cepa resultante se denominó Pf201 (pHM2). Para evitar problemas de pérdida de plásmido, *lacZ* y *lacY* se podían insertar preferentemente en el cromosoma usando derivados del plásmido pCNB111. El suero de leche, un producto de desecho de la producción de queso, contiene cantidades elevadas de lactosa. Cuando Pf201 (pHM2) se cultivó en medio PM5 que contenía 27,5% de suero de leche ultrafiltrado, correspondiente a 50,9 g/l de lactosa en el medio, se produjeron 13,3 g/l de alginato.

Los resultados obtenidos se proporcionan en la Tabla 7 e indican que se pueden emplear numerosas fuentes de carbono para producir grandes cantidades de alginato a través de cepas mutantes que hiperproducen alginato.

Tabla 7. Producción de alginato mediante la utilización de fuentes de carbono diferentes (fuente de C)

Cepa	Fuente de C	Cantidad de fuente de C (g/l)	Rendimiento volumétrico de alginato (g/l)	Rendimiento en C (g de alginato/g de fuente de C)
Pf20118	Fructosa ¹⁾	40	16,0	0,40
Pf20118	Glucosa ²⁾	40	13,0	0,33
Pf20118	Glicerol ¹⁾	40	17,1	0,43
Pf201 (pHM2)	Lactosa ³⁾	51	13,3	0,26

¹⁾ Toda la fuente de carbono (40 g/l) se añade antes de la inoculación de la fermentación.

²⁾ 4,5 g/l de glucosa se añaden al medio antes del inicio de la fermentación. El resto de la glucosa (35,5 g/l) se proporciona a velocidad continua (1 g de glucosa/litro, hora). El abastecimiento de glucosa se inicia 10 horas después de la inoculación.

- 5 ³⁾ El suero de leche ultrafiltrado que contiene como compuesto principal lactosa y minerales como compuestos secundarios, se añade al medio PM-5. El suero de leche ultrafiltrado también contiene trazas de proteínas de la leche. La concentración de lactosa en el medio era de 51 g/l después de la adición del suero de leche ultrafiltrado. El suero de leche ultrafiltrado se añadió antes de la inoculación de las fermentaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa mutante de *P. fluorescens*, que es la cepa Pf201 (NCIMB n° 41137) o un mutante de la misma, en donde dicha cepa mutante produce al menos 10 g de alginato por litro de medio y es estable durante al menos 60 generaciones.
- 5 2. La cepa mutante de *P. fluorescens* según la reivindicación 1, en la que dicha cepa mutante produce al menos 10 g de alginato por 40-55 g de fuente de carbono por litro de medio.
3. La cepa mutante de *P. fluorescens* según la reivindicación 1, en la que dicha cepa mutante produce al menos 10 g de alginato por 50-55 g de fuente de carbono por litro de medio.
- 10 4. La cepa mutante de *P. fluorescens* según la reivindicación 1, en la que dicha cepa produce al menos 10 g de alginato por 40 g de fuente de carbono por litro de medio.
5. La cepa mutante de *P. fluorescens* según la reivindicación 1, en la que dicha cepa mutante se selecciona entre el grupo que consiste en la cepa mutante Pf201 (NCIMB n° 41137), Pf2012 (NCIMB n° 41138), Pf2013 (NCIMB n° 41139), Pf20118 (NCIMB n° 41140), Pf20137 (NCIMB n° 41141), Pf20118algJΔ (NCIMB n° 41143), Pf20118algFΔ (NCIMB n° 41142), Pf20118AlgLH203R (NCIMB n° 41144) y Pf201 MC (NCIMB n° 41145).
- 15 6. La cepa mutante de *P. fluorescens* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho mutante es capaz de producir un alginato que consiste solo en residuos de manuronato.
7. La cepa mutante de *P. fluorescens* según la reivindicación 5 y 6, en la que dicho mutante se selecciona entre el grupo que consiste en las cepas variantes Pf2012 (NCIMB n° 41138), Pf2013 (NCIMB n° 41139), Pf20118 (NCIMB n° 41140) y Pf20137 (NCIMB n° 41141).
- 20 8. La cepa mutante de *P. fluorescens* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho mutante es capaz de producir alginato que tiene un contenido (G) en residuo de guluronato definido entre 0 y 30%.
9. La cepa mutante de *P. fluorescens* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho mutante es capaz de producir alginato sin, o con un número reducido de grupos O-acetilo.
- 25 10. La cepa mutante de *P. fluorescens* según las reivindicaciones 5 o 9, en la que dicho mutante se selecciona a partir del grupo que consiste en las cepas mutantes variantes Pf20118algJΔ (NCIMB n° 41143), Pf20118algFΔ (NCIMB n° 41142).
11. La cepa mutante de *P. fluorescens* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicho mutante es capaz de producir alginato con un peso molecular de entre 50.000 y 3.000.000 Dalton.
- 30 12. La cepa mutante de *P. fluorescens* según la reivindicación 11, en la que dicho mutante se selecciona a partir del grupo de la cepa mutante variante Pf20118AlgLH203R (NCIMB n° 41144).
13. La cepa mutante de *P. fluorescens* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la cepa mutante comprende adicionalmente un gen mutante seleccionado entre el grupo que consiste en: un gen *algG* mutante, un gen *algI* mutante, un gen *algJ* mutante, un gen *algL* mutante y un gen *algF* mutante.
- 35 14. La cepa mutante de *P. fluorescens* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la cepa mutante comprende adicionalmente un gen *algG* mutante que codifica una enzima epimerasa que tiene actividad epimerasa reducida.
15. La cepa mutante de *P. fluorescens* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la cepa mutante comprende adicionalmente un gen *algG* mutante que está inactivado.
- 40 16. Una cepa mutante de *P. fluorescens* según la reivindicación 1, que produce al menos 10 g de alginato por litro de medio, en donde en dicha cepa mutante el operón biosintético de alginato está regulado con un promotor inducible diferente del promotor presente en la naturaleza.
17. La cepa mutante de *P. fluorescens* según la reivindicación 16, en la que el promotor inducible es un promotor *Pm*.
- 45 18. La cepa mutante de *P. fluorescens* según una de las reivindicaciones 16 o 17, en la que el promotor inducible es un promotor *Pm*, y comprende adicionalmente el gen efector *xylS*.
19. La cepa mutante de *P. fluorescens* según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en la que dicha cepa mutante es Pf201 MC (NCIMB n° 41145).
20. La cepa mutante de *P. fluorescens* según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en la que dicha cepa mutante produce alginato tal y como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 6, 8, 9 y 11.

21. La cepa mutante de *P. fluorescens* según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en la que la cepa mutante comprende adicionalmente un gen mutante tal y como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15.
- 5 22. Un cultivo bacteriano biológicamente puro de la cepa mutante de *P. fluorescens* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21.
23. Un método para producir la nueva cepa mutante de *P. fluorescens* según la reivindicación 1, en el que:
- (a) una cepa de tipo silvestre de *P. fluorescens* se pone en contacto con un agente mutágeno, y
- (b) las bacterias tratadas de la etapa (a) se cultivan en presencia de uno o varios antibióticos, y
- (c) los mutantes mucoides resistentes a los antibióticos se aíslan mediante selección, y
- 10 (d) se determinan las propiedades de producción de alginato de los mutantes mucoides aislados de la etapa (c).
24. El método según la reivindicación 23, en el que el agente mutágeno es nitrosoguanidina.
25. El método según las reivindicaciones 23 o 24, en el que las bacterias tratadas de la etapa (a) se cultivan en presencia de un antibiótico D-lactámico o aminoglucósido.
- 15 26. El método según las reivindicaciones 23 o 24, en el que las bacterias tratadas de la etapa (a) se cultivan en presencia de carbenicilina.
27. Un método para la producción de una cepa mutante de *P. fluorescens* según la reivindicación 16, en el que
- (i) el promotor del operón biosintético de alginato de una cepa mutante de *P. fluorescens*, que es la cepa Pf201 (NCIMB nº 41137) o un mutante de la misma, se intercambia a través de un promotor inducible mediante recombinación homóloga, y
- 20 (ii) genes efectores opcionales se introducen en la bacteria de (i) mediante recombinación homóloga, mutagénesis con transposón o por medio de un plásmido, y
- (iii) los mutantes se cultivan y a continuación se aíslan por selección, y
- (iv) se determinan las propiedades de producción de alginato de los mutantes aislados de (iii).
28. El método según la reivindicación 27, en el que el promotor inducible es *Pm* procedente del plásmido Tol de *P. putida*.
- 25 29. Un método para producir una cepa mutante de *P. fluorescens* según la reivindicación 8, caracterizado por que
- a) el gen *algG* de tipo silvestre, que codifica la C-5 epimerasa se clona en un plásmido o un minitransposón y se somete a mutagénesis mediante mutagénesis química o mediante PCR,
- 30 b) se construye un derivado de una cepa productora de alginato de *P. fluorescens*, que carece del gen *algG* (cepa $\Delta algG$), y
- c) la genoteca de *algG* sometida a mutagénesis de la etapa (a) se transfiere a la cepa $\Delta algG$ de *P. fluorescens*, y las cepas que contienen el plásmido o el transposón se identifican y se somete a ensayo la producción de alginato y la actividad epimerasa, y
- 35 d) las cepas que contienen el plásmido o el transposón que contienen un *algG* mutante que codifica una epimerasa que proporciona alginato con un contenido en residuos de ácido gulurónico entre 0 y 30%, se identifican por el ensayo en la etapa (c), y
- e) el gen mutante *algG* se clona en un vector de sustitución génica, y
- 40 f) el vector de sustitución génica de la etapa (e) se transfiere a continuación a una cepa productora de alginato de *P. fluorescens* con el fin de sustituir su gen *algG* con el gen *algG* mutante, haciéndola capaz de expresar el gen mutante.
30. Un método para producir una cepa mutante de *P. fluorescens* según la reivindicación 8, caracterizado por que
- 45 a) uno o varios aminoácidos, que se identifican por mutagénesis y posterior escrutinio para estudiar si son relevantes para la epimerización, se intercambian, a nivel génico, mediante mutagénesis específica del sitio, con aminoácidos diferentes de los que están presentes tanto en la proteína *algG* mutante como de

tipo silvestre, y

b) el gen mutante se clona en un vector de sustitución génica y este vector se transfiere a una cepa productora de alginato de *P. fluorescens* en donde reemplaza al gen *algG* de tipo silvestre y es capaz de expresarlo.

- 5 31. Uso de un cultivo bacteriano biológicamente puro de al menos una cepa mutante de *P. fluorescens* según la reivindicación 22, para la producción de alginato.
32. Uso de un cultivo bacteriano biológicamente puro de al menos una cepa mutante de *P. fluorescens* según la reivindicación 22, para la producción a gran escala de alginato en un fermentador.

Figura 1

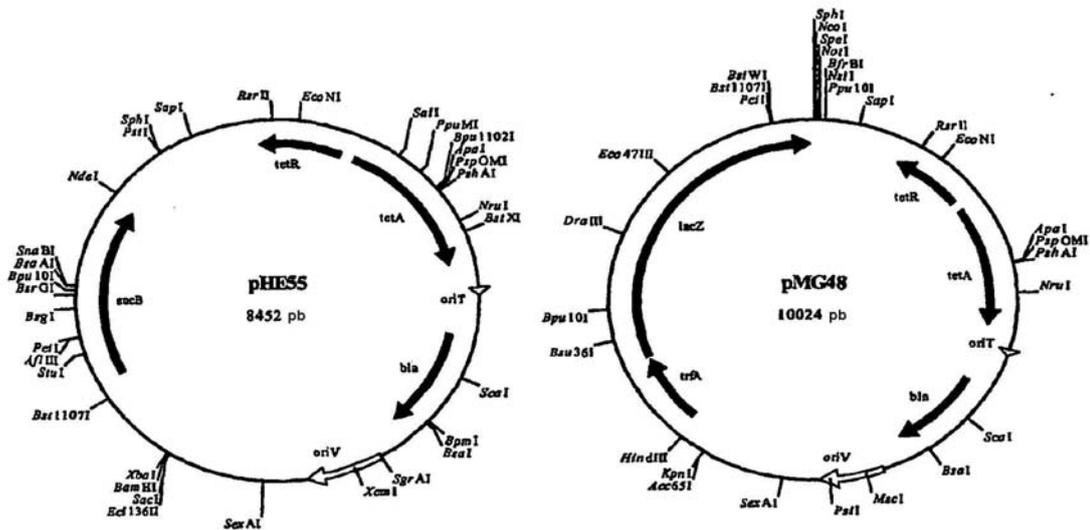


Figura 1

Mapa de restricción de los plásmidos suicidas pHE55 y pMG48

Figura 2

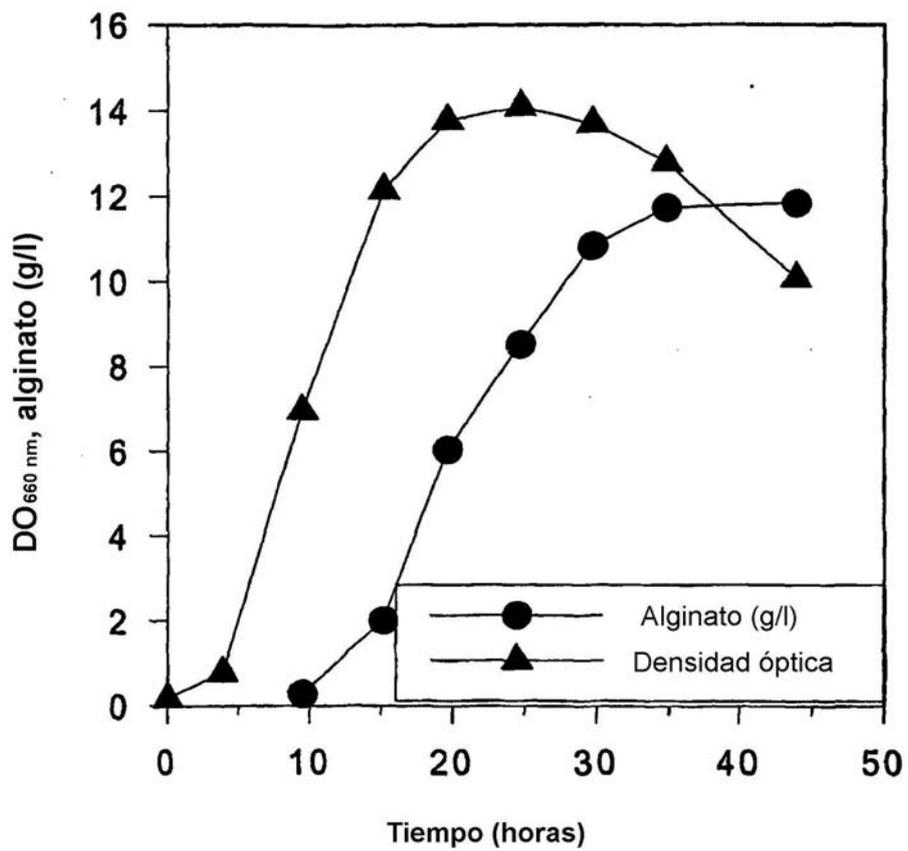


Figura 2: Crecimiento y producción de alginato en fermentación con la cepa Pf201.

Figura 3

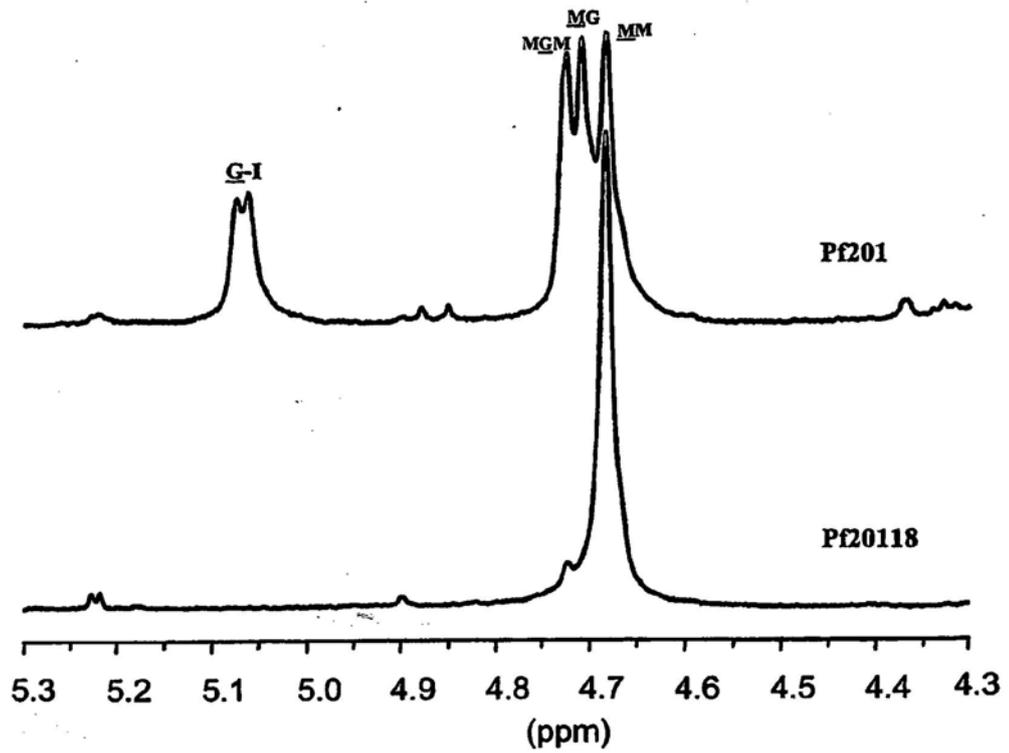


Figura 3. Espectros ¹RMN de alginato producido por *P. fluorescens* 201 y manunorano producido por *P. fluorescens* 20118

Figura 4

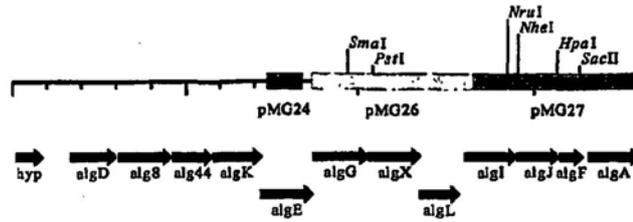


Figura 4: El operón biosintético de alginato y el marco de lectura abierto de *P. fluorescens*. Los fragmentos clonados se marcan como recuadros en la línea del mapa.

Figura 5

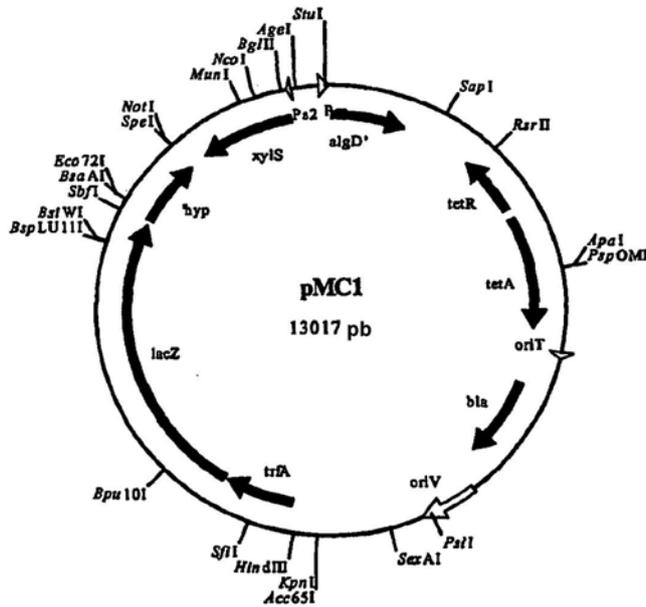


Figura 5: Mapa de restricción de pMC1.