

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 733 307**

51 Int. Cl.:

C12R 1/19 (2006.01)

C07K 14/245 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2012 PCT/EP2012/075639**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2013 WO13087884**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2012 E 12812205 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 2791367**

54 Título: **Microorganismos mutantes para sintetizar ácido colánico, oligosacáridos manosilados y/o fucosilados**

30 Prioridad:

16.12.2011 EP 11194103

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

28.11.2019

73 Titular/es:

**INBIOSE N.V. (100.0%)
Technologiepark 82, bus 41
9052 Zwijnaarde, BE**

72 Inventor/es:

**BEAUPREZ, JOERI;
LEQUEUX, GASPARD y
MAERTENS, JO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 733 307 T3

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

DESCRIPCIÓN

Microorganismos mutantes para sintetizar ácido colánico, oligosacáridos manosilados y/o fucosilados

Campo de la invención

La presente memoria descriptiva se refiere a microorganismos mutados y/o transformados para la síntesis de diversos compuestos. Más específicamente, en la presente memoria se describen microorganismos mutados en los genes codificantes de los reguladores ArcA e IclR. Estas mutaciones dan como resultado una regulación significativa al alza de los genes que forman parte del operón del ácido colánico. Por tanto, dichos microorganismos son útiles para la síntesis de cualquier compuesto que forme parte de la ruta del ácido colánico tal como GDP-fucosa, GDP-manosa y ácido colánico, y/o se pueden usar además –partiendo de GDP-fucosa como precursor– para sintetizar oligosacáridos fucosilados o –partiendo de GDP-manosa como precursor– para sintetizar oligosacáridos manosilados. Además, las mutaciones en los genes que codifican los reguladores transcripcionales ArcA e IclR conducen a un fenotipo de resistencia a ácidos en la fase de crecimiento exponencial que permite la síntesis de moléculas sensibles al pH y ácidos orgánicos.

Antecedentes de la invención

Los genes *arcA*, que codifica la proteína de control de la respiración aeróbica, e *iclR*, que codifica el regulador de la isocitrato liasa, se sabe que regulan el metabolismo central del carbono. ArcA es un regulador transcripcional global que regula una amplia gama de genes, mientras que IclR es un regulador transcripcional local que regula la ruta del glioxilato. ArcA se sabe que regula el metabolismo central del carbono en respuesta a la privación de oxígeno y no tiene más conexión con IclR que la de que también regula la ruta del glioxilato (24, 28, 29, 37, 38). En un estudio anterior, se ha observado el efecto combinado de cepas mutantes $\Delta iclR \Delta arcA$ sobre el metabolismo central del carbono. Se presentaron flujos aumentados en el ciclo del ácido tricarboxílico (ATC) y la ruta del glioxilato y apareció un interesante y sorprendente fenotipo cuando ambos genes se desactivaron, a saber, la cepa doble mutante formó biomasa con un rendimiento que se acercó al rendimiento teórico máximo (4, 39).

Algunos compuestos, tales como GDP-fucosa, son muy demandados. Este compuesto es, de hecho, un precursor de oligosacáridos fucosilados tales como fucosillactosa, fucosillactoNbiosa y oligosacáridos Lewis X, o de proteínas fucosiladas. Estos azúcares son componentes de la leche materna humana, en la que tienen efectos antiinflamatorios y prebióticos y/o tienen aplicaciones en usos terapéuticos como agente nutracéutico y antiinflamatorio o prebiótico, además, las proteínas fucosiladas encuentran aplicaciones en los productos farmacéuticos (5, 8, 27). Sin embargo, todavía es necesario un método eficaz para producir estos compuestos de alto valor.

Además, la GDP-manosa también es un producto intermedio de la ruta hacia GDP-fucosa. Interrumpir la ruta prematuramente conduce a la acumulación de este compuesto, que es un precursor de los oligosacáridos manosilados. Estos oligosacáridos encuentran aplicaciones, por ejemplo, en el tratamiento de infecciones por bacterias gram-negativas, además, la GDP-manosa es importante para la humanización de glicosilaciones de proteína, que es esencial para la producción de ciertas proteínas terapéuticas (18, 30). Los oligosacáridos manosilados y los glicoconjugados manosilados también se usan para el guiado de fármacos, por ejemplo, los antivirales manosilados se pueden guiar específicamente al hígado y los riñones (7).

La presente memoria descriptiva proporciona microorganismos que están cambiados genéticamente de tal manera que pueden producir eficazmente estos compuestos.

Asimismo, las síntesis de moléculas sensibles al pH, tales como –pero que no se limitan a– glucosamina, y ácidos orgánicos, tales como –pero que no se limitan a– ácido pirúvico, ácido succínico, ácido siálico, oligosacáridos sialilados..., se producen preferiblemente a pH bajo para indistintamente estabilizar el producto o por motivos de tratamiento aguas abajo (4, 12, 40). Por lo tanto, las cepas que pueden crecer a pH bajo son beneficiosas para estos procedimientos de producción. *E. coli* es un organismo que se puede adaptar fácilmente a diversas condiciones, por ejemplo, se puede adaptar fácilmente a las duras condiciones de pH del estómago, que es aproximadamente pH 2 (14). Sin embargo, *E. coli* no parece crecer en estas condiciones, pero induce su mecanismo de resistencia a ácidos en la fase estacionaria (40). Durante esta fase, la célula ya no se multiplica y, por lo tanto, dificulta la productividad. Hasta ahora, no se ha encontrado solución a este problema. Sin embargo, en la presente memoria se proporciona un microorganismo modificado genéticamente que puede inducir mecanismos de resistencia a ácidos en la fase de crecimiento exponencial, que es la fase que se usa principalmente para la producción de ácidos orgánicos y productos inestables al pH.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Patrón de expresión genética del tipo silvestre, la cepa mutante $\Delta iclR$ y $\Delta arcA$ en comparación con la cepa mutante $\Delta arcA \Delta iclR$ de genes implicados en la biosíntesis de ácido colánico en condiciones de fermentación por lotes. Los genes implicados en la biosíntesis de ácido colánico se presentan en las Figuras 3 y 4.

Figura 2: Patrón de expresión genética del operón del ácido colánico del tipo silvestre, la cepa mutante $\Delta iclR$ y $\Delta arcA$ en condiciones de fermentación quimioestática en comparación con la cepa mutante $\Delta arcA \Delta iclR$.

Figura 3: La organización de genes del operón del ácido colánico y un resumen de la función de estos genes:

Gen:	Función:
<i>wza</i>	Componente del aparato de exportación de polisacáridos capsulares
<i>wzb</i>	Tirosina fosfatasa
<i>wzc</i>	Tirosina quinasa
<i>wcaA</i>	Glicosiltransferasa
<i>wcaB</i>	Aciltransferasa
<i>wcaC</i>	Glicosiltransferasa
<i>wcaD</i>	Ácido colánico polimerasa
<i>wcaE</i>	Glicosiltransferasa
<i>wcaF</i>	Aciltransferasa
<i>gmd</i>	GDP-manosa-4,6-deshidratasa
<i>fcl</i>	GDP-fucosa sintasa
<i>gmm</i>	GDP-manosa hidrolasa
<i>weal</i>	Glicosiltransferasa
<i>cpsB</i>	Manosa-1-fosfato guanililtransferasa
<i>cpsG</i>	Fosfomanomutasa
<i>wcaJ</i>	UDP-glucosa transferasa al vehículo lipídico
<i>wzx</i>	Transportador putativo
<i>wcaK</i>	Piruviltransferasa

Figura 4: La ruta de biosíntesis de ácido colánico.

Figura 5: Red reguladora del operón del ácido colánico. Esta red se construyó con Pathway tools v 13.0.

5 Figura 6: Efecto de las mutaciones $\Delta arcA\Delta iclR$ sobre la ruta de biosíntesis de GDP-fucosa.

Figura 7: Resumen de las modificaciones genéticas necesarias para mejorar la producción de fucosillactosa y oligosacáridos fucosilados partiendo de glucosa como sustrato.

10 Figura 8: Partiendo de sucrosa, se producen derivados de azúcar fucosilados tales como fucosillactosa y, más específicamente, 1,2-fucosillactosa. La cepa se modifica para forzar a la célula a producir fructosa-6-fosfato, que es un producto intermedio en la síntesis de GDP-fucosa. A continuación, se alimenta glucosa o glucosa-1-fosfato (si la enzima de partida es indistintamente una sucrasa o una sucrosa fosforilasa) al metabolismo central del carbono a través de la ruta de la pentosa fosfato.

Figura 9: Resumen de las modificaciones genéticas necesarias para mejorar la producción de fucosillactosa y oligosacáridos fucosilados partiendo de glucosa como sustrato en un metabolismo dividido.

15 Figura 10: Detalle del flujo de la ruta de la pentosa fosfato en una cepa en la que los genes que codifican fosfoglucosa isomerasa y fosfofructoquinasa están desactivados.

20 Figura 11: Partiendo de sucrosa, se producen derivados de azúcar manosilados. La cepa se modifica para forzar a la célula a producir fructosa-6-fosfato, que es un producto intermedio en la síntesis de GDP-fucosa. A continuación, se alimenta glucosa o glucosa-1-fosfato (si la enzima de partida es indistintamente una sucrasa o una sucrosa fosforilasa) al metabolismo central del carbono a través de la ruta de la pentosa fosfato.

Figura 12: Patrón de expresión genética de genes relacionados con resistencia a ácidos del tipo silvestre, la cepa

mutante $\Delta iclR$ y $\Delta arcA$ en condiciones de cultivo por lotes en comparación con la cepa mutante $\Delta arcA\Delta iclR$.

Figura 13: Cromatogramas de análisis por CL EMEM de caldo de cultivo y un patrón de 2-fucosillactosa. A. Análisis por CL EMEM del patrón, B. análisis por CL EMEM de una muestra del caldo de cultivo de una cepa mutante que expresa una fucosiltransferasa de *H. pylori*, C. análisis por CL EMEM de una muestra del caldo de cultivo de una cepa mutante que expresa una fucosiltransferasa de *H. pylori*.

Figura 14: Espectro de masas del análisis por CL EMEM de los cromatogramas presentados en la Figura 13 de caldo de cultivo y un patrón de 2-fucosillactosa. A. Masa (m/z) del patrón, B. masa (m/z) de la muestra del caldo de cultivo de una cepa mutante que expresa una fucosiltransferasa de *H. pylori*, C. masa (m/z) de la muestra del caldo de cultivo de una cepa mutante que expresa una fucosiltransferasa de *H. pylori*.

Figura 15: La secuencia del promotor híbrido artificial como se proporciona en SEQ ID N° 6 (la combinación del promotor natural y uno artificial) que se clonó frente al operón del ácido colánico.

Descripción de la invención

La presente memoria descriptiva se refiere a microorganismos tales como enterobacterias que están cambiados genéticamente de tal manera que pueden producir eficazmente compuestos que forman parte de la ruta del ácido colánico. Un compuesto de interés particular es la GDP-fucosa, que se usa como precursor para sintetizar oligosacáridos fucosilados. Esta tiene efectos favorables para la salud, como se indicó anteriormente, pero no se dispone de un método de producción eficaz para producir dichos compuestos.

La presente invención proporciona un método para regular al alza al menos uno de los genes del operón del ácido colánico en una bacteria en comparación con la expresión de dichos genes en una bacteria de tipo silvestre correspondiente, que comprende generar la disrupción de los genes codificantes de los reguladores transcripcionales, la proteína de control de la respiración aeróbica ArcA y el regulador de la isocitrato liasa IclR, en donde dicho operón comprende los genes *cpsG*, *cpsB*, *gmd* y *fcl* que codifican una fosfomanomutasa, una manosa-1-fosfato guaniltransferasa, GDP-manosa 4,6-deshidratasa y GDP-fucosa sintasa, respectivamente. Este operón también puede comprender los genes *cpsG*, *cpsB*, *gmd*, *fcl* y *wza*. Además, se aumenta la expresión del gen *rcsA*. Este gen es un regulador transcripcional del operón del ácido colánico. La expresión mejorada de este gen aumenta la transcripción del operón del ácido colánico (13, 36).

Por tanto, la presente invención se refiere a un método para regular al alza el regulador transcripcional del operón del ácido colánico, *rcsA*, el cual, a su vez, regula al alza al menos uno de los genes del operón del ácido colánico, en una bacteria que comprende generar la disrupción de los genes codificantes del regulador transcripcional, la proteína de control de la respiración aeróbica, ArcA y el regulador de la isocitrato liasa IclR.

La presente memoria descriptiva se refiere a un microorganismo mutado y/o transformado tal como –pero no limitado a– enterobacterias tales como una cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) que comprende un cambio genético que conduce a una expresión modificada de los reguladores transcripcionales: la proteína de control de la respiración aeróbica ArcA y el regulador de la isocitrato liasa IclR.

Un microorganismo mutado y/o transformado tal como *E. coli* como se emplea en esta memoria se puede obtener mediante cualquier método conocido por el experto en la técnica, que incluye, pero no se limita a, mutagénesis UV y mutagénesis química. Una manera preferida de obtener este microorganismo es generando la disrupción (desactivando) los genes (*arcA* y *iclR*) que codifican las proteínas ArcA e IclR, o sustituyendo los promotores endógenos de dichos genes por promotores artificiales o sustituyendo el sitio de unión del ribosoma endógeno por un sitio de unión del ribosoma artificial. El término “promotores artificiales” se refiere a promotores heterólogos o no naturales o diseñados por ordenador con fuerza de expresión conocida, estos promotores se pueden obtener de bibliotecas como describen Alper *et al.* (2005), Hammer *et al.* (2006), o De Mey *et al.* (2007) (3, 11, 15). El término promotor heterólogo se refiere a cualquier promotor que no está presente en la naturaleza en frente del gen. El término “promotor artificial” también se puede referir a promotores con secuencias de ADN que son combinaciones de la secuencia de promotor natural (autólogo) con partes de secuencias de promotores diferentes (autólogos o heterólogos) como se muestra, por ejemplo, además en los ejemplos. Las secuencias de tales “promotores artificiales” se pueden encontrar en bases de datos tales como, por ejemplo, partsregistry.org (6). El término “sitio de unión del ribosoma artificial” se refiere a sitios de unión del ribosoma heterólogos o no naturales o diseñados por ordenador con tasas de traducción conocidas o medibles, estas bibliotecas se pueden obtener a partir de bibliotecas o diseñar por medio de algoritmos como describen Salis *et al.* (2009) (26). Por tanto, la presente memoria descriptiva se refiere específicamente a un microorganismo mutado y/o transformado como se indicó anteriormente en donde dicho cambio genético es generar la disrupción de los genes codificantes de ArcA e IclR, o reducir o eliminar la función de ArcA e IclR por medio de mutaciones en la secuencia codificadora de los genes que codifican ArcA e IclR, o es sustituir los promotores endógenos de los genes codificantes de ArcA e IclR por promotores artificiales; o es sustituir el sitio de unión del ribosoma endógeno por un sitio de unión del ribosoma artificial. Además, está claro que el mutante y/o transformante descrito en la presente memoria puede comprender además cambios genéticos adicionales en uno o más genes distintos dentro de su genoma como se describe además más adelante. El término microorganismo se refiere específicamente a una bacteria, más específicamente a una bacteria que pertenece a la familia de las

endobacterias. Esta bacteria se refiere preferiblemente a cualquier cepa que pertenece a la especie *Escherichia coli* tal como, pero no limitada a, *Escherichia coli* B, *Escherichia coli* C, *Escherichia coli* W, *Escherichia coli* K12, *Escherichia coli* Nissle. Más específicamente, este término se refiere a cepas de *Escherichia coli* cultivadas – denominadas cepas *E. coli* K12– que están bien adaptadas al ambiente de laboratorio y, a diferencia de las cepas de tipo silvestre, han perdido su capacidad para prosperar en el intestino. Ejemplos bien conocidos de las cepas *E. coli* K12 son K12 de tipo silvestre, W3110, MG1655, M182, MC1000, MC1060, MC1061, MC4100, JM101, NZN111 y AA200. La presente memoria descriptiva se refiere específicamente a una cepa de *Escherichia coli* mutada y/o transformada como se indicó anteriormente en donde dicha cepa de *E. coli* es una cepa K12. Más específicamente, la presente memoria descriptiva se refiere a una cepa de *Escherichia coli* mutada y/o transformada como se indicó anteriormente en donde dicha cepa K12 es *E. coli* MG1655.

La expresión “que conduce a una expresión o actividad modificada” indica que las mutaciones/transformaciones descritas anteriormente afectan a la transcripción y/o traducción y/o modificación postraduccional de dichos genes (*arcA* e *lclR*) en las proteínas de regulador transcripcional de la presente invención (*ArcA* e *lclR*) de tal manera que esta transcripción se ha reducido significativamente o incluso se ha abolido completamente en comparación con una cepa de tipo silvestre, que no se ha mutado o transformado en lo que respecta a ambos genes particulares descritos en la presente memoria. Por tanto, la presente memoria descriptiva se refiere a un microorganismo mutado y/o transformado tal como una cepa de *Escherichia coli* como se indicó anteriormente en donde dicha expresión modificada es una expresión reducida, y a un microorganismo mutado y/o transformado tal como una cepa de *Escherichia coli* como se indicó anteriormente en donde dicha expresión reducida es una expresión abolida.

La expresión “que regula al alza al menos uno de los genes del operón del ácido colánico” indica que la expresión de al menos 1, 2, 3, 4... o todos los genes que pertenecen al operón del ácido colánico se regula al alza significativamente ($= P > 0,05$) en comparación con la expresión de dichos genes en un microorganismo de tipo silvestre correspondiente que se cultiva en las mismas condiciones que el microorganismo mutado y/o transformado. Los genes que pertenecen al operón del ácido colánico son *wza*, *wzb*, *wzc*, *wcaA*, *wcaB*, *wcaC*, *wcaD*, *wcaE*, *wcaF*, *gmd*, *fcl*, *gmm*, *weal*, *cpsB*, *cpsG*, *wcaJ*, *wzx*, *wcaK*, *wcaL* y *wcaM* como se indica en la Fig. 3 y/o como se describe en (35). Asimismo, se regula al alza el gen *rcaA*, que codifica el regulador transcripcional del operón del ácido colánico (13, 36). Más específicamente, la expresión “que regula al alza al menos uno de los genes del operón del ácido colánico” o el regulador transcripcional del operón del ácido colánico indica que la regulación de al menos uno de los genes del operón del ácido colánico se regula al alza 6 a 8 veces en comparación con la expresión de los genes del operón del ácido colánico en el microorganismo de tipo silvestre correspondiente. Además, regular al alza genes del operón del ácido colánico como se describió anteriormente puede comprender sustituir el promotor natural por un “promotor artificial”, más específicamente, una combinación de la secuencia del promotor natural con secuencias de otras secuencias de promotor artificial. La combinación de la secuencia del promotor natural con la secuencia de otras secuencias de promotor artificial es más específicamente la sustitución del sitio de unión de factor sigma del promotor natural con un sitio de unión de factor sigma más fuerte. Se describen factores sigma tales como, pero que no se limitan a, sigma70, sigmaS, sigma24... (41), subunidades de ARN polimerasa que determinan la afinidad por secuencias de promotor y la tasa de transcripción de genes. La presente memoria descriptiva proporciona microorganismos que están cambiados genéticamente de tal manera que pueden producir eficazmente compuestos que forman parte de la ruta del ácido colánico. La expresión “compuestos que forman parte de la ruta del ácido colánico” se refiere a todos los compuestos, como se indica en la Figura 4, que parten de fructosa-6-P y dan como resultado ácido colánico extracelular. Más específicamente, esta expresión se refiere a los compuestos manosa-6-P, manosa-1-P, GDP-manosa, GDP-4-deshidro-6-desoximanosa, GDP-fucosa y ácido colánico. Por tanto, la presente memoria descriptiva se refiere específicamente al uso de los microorganismos mutados y/o transformados descritos en la presente memoria para la síntesis de ácido colánico y/o para la síntesis de GDP-fucosa. Como la GDP-fucosa es un precursor de oligosacáridos fucosilados tales como fucosillactosa, fucosillactobiosa y oligosacárido Lewis X o proteínas fucosiladas, y como estos azúcares tienen efectos terapéuticos, nutracéuticos, antiinflamatorios y prebióticos, la presente memoria descriptiva se refiere específicamente al uso de los microorganismos mutados y/o transformados descritos en la presente memoria para la síntesis de oligosacáridos fucosilados. En otras palabras, la presente invención se refiere a un procedimiento para la síntesis de ácido colánico y/o GDP-fucosa y/u oligosacáridos fucosilados en una bacteria que comprende generar la disrupción de los genes codificantes de los reguladores transcripcionales, la proteína de control de la respiración aeróbica *ArcA* y el regulador de la isocitrato liasa *lclR*, para regular al alza al menos uno de los genes del operón del ácido colánico, en donde dicho operón comprende los genes *cpsG*, *cpsB*, *gmd* y *fcl* o los genes *cpsG*, *cpsB*, *gmd*, *fcl* y *wza*. Más específicamente, la presente invención se refiere a un procedimiento como se describe en donde las mutaciones para *ArcA* e *lclR* se aplican en combinación con al menos una mutación que mejora la producción de compuestos fucosilados. Con el fin de producir eficazmente oligosacáridos fucosilados (véanse las Figuras 1, 2 y 5-10), las mutaciones descritas anteriormente en *arcA* e *lclR* se pueden aplicar en combinación con otras mutaciones que mejoran adicionalmente la producción de compuestos fucosilados. Algunas de estas otras mutaciones –no limitantes– son: a) la supresión de *wcaJ* del operón del ácido colánico, que detiene el inicio de la biosíntesis del ácido colánico y, por tanto, permite la acumulación de GDP-fucosa; b) la introducción de una fucosiltransferasa para enlazar la fucosa con diferentes moléculas aceptoras tales como lactosa; c) para la acumulación del precursor de la ruta biosintética de GDP-fucosa y además de la supresión de *wcaJ*, se desactiva al menos uno de los siguientes genes del operón del ácido colánico que no codifican la biosíntesis de GDP-fucosa: *gmm*, *wcaA*, *wcaB*, *wcaC*, *wcaD*, *wcaE*, *wcaF*, *weal*, *wcaJ*, *wcaK*, *wcaL*, *wzx*, *wza*, *wzb*, *wzc* y/o *wcaM*; d) para la producción de fucosillactosa, se desactiva *lacZ*, que codifica β -galactosidasa, para evitar la degradación de

lactosa; e) para acumular el precursor fructosa y fructosa-6-fosfato, se introduce una sucrosa fosforilasa o invertasa; f) puesto que la fructosa-6-fosfato se degrada fácilmente en la glicólisis, la glicólisis se debe interrumpir con el fin de dirigir toda la fructosa-6-fosfato en la dirección de GDP-fucosa y, por tanto, se desactivan los genes *pgi*, *pfkA* y *pfkB* (que codifican glucosa-6-fosfato isomerasa y fosfofructoquinasa A y B); g) reducir la degradación de proteína desactivando una proteasa codificada por un gen tal como *lon*; h) expresando constitutivamente una lactosa permeasa, se evitan subpoblaciones en el procedimiento de producción que son comunes para los sistemas de expresión de genes inducida por lactosa (19). En otras palabras, la presente invención se refiere a un procedimiento como se describió anteriormente para la síntesis de oligosacáridos fucosilados en donde una mutación que mejora la producción de compuestos fucosilados se selecciona del grupo que consiste en: la supresión del gen *wcaJ*, y/o desactivar los genes del operón del ácido colánico *gmm*, *wcaA*, *wcaB*, *wcaC*, *wcaD*, *wcaE*, *wcaF*, *weal*, *wcaJ*, *wcaK*, *wcaL*, *wzx*, *wza*, *wzb*, *wzc* y/o *wcaM*, y/o desactivar *lacZ*, y/o introducir una sucrosa fosforilasa o invertasa, y/o desactivar los genes *pgi*, *pfkA* y *pfkB*, y/o desactivar el gen *lon*, y/o introducir una fucosiltransferasa, y/o una lactosa permeasa. El término "introducir una fucosiltransferasa" se refiere a regular al alza o mejorar la expresión heteróloga de fucosiltransferasas que están comprendidas en, pero no se limitan a, las enzimas de las clases de enzimas EC2.4.1.65, 2.4.1.68, 2.4.1.69, 2.4.1.152, 2.4.1.214 y/o 2.4.1.221, y/o las familias de glicosiltransferasas GT1, GT2, GT10 GT11, GT23, GT37, GT65, GT68 y/o GT74, y/o que proceden de, pero no se limitan a, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Dictyostellium discoideum*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*,... y estas fucosiltransferasas catalizan la formación de enlaces $\alpha(1,2)$, $\alpha(1,3)$, $\alpha(1,4)$ o $(1,6)$ sobre otros azúcares tales como, pero que no se limitan a, galactosa, lactosa, lactoNbiosa, lactoMetraosa, lactosamina, lactoMetraosa, sialillactosas, disialillactosas, o proteínas fucosiladas, o ácidos grasos fucosilados, o aglicones fucosilados tales como, pero que no se limitan a, antivirales, antibióticos...

La presente memoria descriptiva proporciona el uso de un microorganismo mutado y/o transformado descrito en la presente memoria que comprende un cambio genético que conduce a una expresión y/o actividad modificada de los reguladores transcripcionales, la proteína de control de la respiración aeróbica ArcA y el regulador de la isocitrato liasa IclR, para regular al alza al menos uno de los genes del operón del ácido colánico, en donde dicho operón comprende los genes *cspG* y *cspB*, que codifican fosfomanomutasa y manosa-1-fosfato guanililtransferasa, que son necesarios para la biosíntesis de GDP-manosa. Como la GDP-manosa es un precursor de oligosacáridos manosilados y glicoconjugados manosilados. Estos oligosacáridos y glicoconjugados encuentran aplicaciones, por ejemplo, en el tratamiento de infecciones por bacterias gram-negativas, además, la GDP-manosa es importante para la humanización de glicosilaciones de proteína, que es esencial para la producción de ciertas proteínas terapéuticas (18, 30). Los oligosacáridos manosilados y los glicoconjugados manosilados también se usan para el guiado de fármacos, por ejemplo, los antivirales manosilados se pueden guiar específicamente al hígado y los riñones (7). Con el fin de producir eficazmente oligosacáridos manosilados (véanse las Figuras 1, 2, 5, 6 y 11), las mutaciones en *arcA* e *icIR* descritas anteriormente se pueden aplicar en combinación con otras mutaciones que mejoran adicionalmente la producción de compuestos manosilados. Algunas de estas otras mutaciones—no limitantes—son: a) se suprime el gen *gmd* del operón del ácido colánico, y/o b) en donde se suprime el gen *gmm* que codifica GDP-manosa hidrolasa, y/o c) en donde se suprimen los genes del operón del ácido colánico que no codifican reacciones de biosíntesis de GDP-manosa, los genes *gmm*, *wcaA*, *wcaB*, *wcaC*, *wcaD*, *wcaE*, *wcaF*, *weal*, *wcaJ*, *wcaK*, *wcaL*, *fcl*, *gmd*, *wzx*, *wza*, *wzb* y/o *wcaM*, y/o d) en donde se introduce un gen que codifica una sucrosa fosforilasa o una invertasa, y/o e) en donde se suprimen los genes *pgi*, *pfkA* y *pfkB*, que codifican fosfoglucosa isomerasa, fosfofructoquinasa A y fosfofructoquinasa B, respectivamente, y/o f) desactivar el gen *lon* que codifica una proteasa, y/o g) en donde se introduce un gen que codifica una manosiltransferasa. En otras palabras, la presente invención se refiere a un procedimiento como se describió anteriormente para la síntesis de ácido colánico y/o GDP-fucosa y/o oligosacáridos fucosilados para la síntesis de GDP-manosa y/o para la síntesis de oligosacáridos manosilados. La presente invención se refiere además a dicho procedimiento en donde se regulan al alza los genes *cpsG* y *cpsB* del operón del ácido colánico y en donde: a) se suprime el gen *gmd* del operón del ácido colánico, y/o b) en donde se suprime el gen *gmm*, y/o en donde se desactivan los genes del operón del ácido colánico *fcl*, *gmd*, *gmm*, *wcaA*, *wcaB*, *wcaC*, *wcaD*, *wcaE*, *wcaF*, *weal*, *wcaJ*, *wcaK*, *wcaL*, *wzx*, *wza*, *wzb*, *wzc* y/o *wcaM*, y/o d) en donde se introduce un gen que codifica una sucrosa fosforilasa o una invertasa, y/o e) en donde se suprimen los genes *pgi*, *pfkA* y *pfkB*, y/o f) desactivar el gen *lon*, y/o g) en donde se introduce un gen que codifica una manosiltransferasa. El término "introducir una manosiltransferasa" se refiere a regular al alza o mejorar la expresión heteróloga de manosiltransferasas que están comprendidas en, pero no se limitan a, las enzimas de las clases de enzimas EC 2.4.1.32, 2.4.1.B27, 2.4.1.B44, 2.4.1.48, 2.4.1.54, 2.4.1.57, 2.4.1.83, 2.4.1.109, 2.4.1.110, 2.4.1.119, 2.4.1.130, 2.4.1.131, 2.4.1.132, 2.4.1.142, 2.4.1.199, 2.4.1.217, 2.4.1.232, 2.4.1.246, 2.4.1.251, 2.4.1.252, 2.4.1.257, 2.4.1.258, 2.4.1.259, 2.4.1.260, 2.4.1.265 y/o 2.4.1.270, y/o las familias de glicosiltransferasas GT1, GT2, GT4, GT15, GT22, GT32, GT33, GT39, GT50 y/o GT58, y/o que proceden de, pero no se limitan a, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Dictyostellium discoideum*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*,... y estas manosiltransferasas catalizan la formación de enlaces $\alpha(1,2)$, $\alpha(1,3)$, $\alpha(1,4)$ o $(1,6)$ sobre otros azúcares tales como, pero que no se limitan a, galactosa, N-acetilglucosamina, ramnosa, lactosa, lactoNbiosa, lactoMetraosa, lactosamina, lactoMetraosa, sialillactosas, disialillactosas, o proteínas manosiladas, o ácidos grasos manosilados, o aglicones manosilados tales como, pero que no se limitan a, antivirales, antibióticos...

El término "expresión heteróloga" se refiere a la expresión de genes que no están presentes en la naturaleza en el huésped de producción, genes que se pueden sintetizar químicamente o recuperar de su huésped natural por medio de PCR, genes cuyos codones pueden estar optimizados para el huésped de producción o en los que se puede añadir una mutación puntual para mejorar la actividad o expresión enzimática. La expresión de genes heterólogos y/o

naturales se puede realizar indistintamente sobre el cromosoma, cromosomas artificiales o plásmidos y la transcripción se puede controlar por medio de promotores inducibles, constitutivos, naturales o artificiales y la traducción se puede controlar por medio de sitios de unión del ribosoma natural o artificial.

Por consiguiente, la presente invención se refiere además a bacteria mutada y/o transformada en la que los reguladores ArcA e IciR como se describió anteriormente, en combinación con los genes codificantes de las enzimas fosfoglucoisomerasa y fosfofructoquinasa, están desactivados. Más específicamente, la presente invención se refiere a estos organismos en donde la enzima fosfoglucoisomerasa está codificada por el gen *pgi* y en donde la enzima fosfofructoquinasa está codificada por el(los) gen(es) *pfkA* y/o *pfkB*.

La expresión "genes que se restituyen menos funcionales o no funcionales" se refiere a las tecnologías bien conocidas por un experto en la técnica tales como el uso de ARNip, ARNi, miARN, ARNas, mutar genes, desactivar genes, mutagénesis por transposones, etc., que se usan para cambiar los genes de tal manera que son menos capaces (es decir, estadísticamente significativamente "menos capaces" en comparación con un gen de tipo silvestre funcional) o completamente incapaces (tal como genes desactivados) de producir productos finales funcionales. El término "desactivación (de genes)", por tanto, se refiere a un gen que se restituye no funcional. El término "gen suprimido" o "supresión de genes", también se refiere a un gen que se restituye no funcional.

La presente invención se refiere además a una bacteria mutada y/o transformada como se describió en el párrafo anterior en donde dicho organismo se transforma además con un gen que codifica una sucrosa fosforilasa.

La presente invención también se refiere a una bacteria mutada y/o transformada como se describió anteriormente en donde, además, la actividad del gen que codifica una lactosa permeasa está aumentada. Dicha actividad se puede aumentar sobreexpresando dicho gen y/o transformando dichos organismos con un gen que codifica una lactosa permeasa.

La presente invención se refiere además a cualquier bacteria mutada y/o transformada como se describió anteriormente en donde al menos uno de los siguientes genes está desactivado se ha restituido menos funcional:

un gen que codifica una beta-galactosidasa, un gen que codifica una glucosa-1-fosfato adenililtransferasa, un gen que codifica una glucosa-1-fosfatasa, un gen que codifica fosfogluconato deshidratasa, un gen que codifica 2-ceto-3-desoxigluconato-6-fosfato aldolasa, un gen que codifica una glucosa-1-fosfato uridiltransferasa, un gen que codifica una UDP-glucosa-4-epimerasa, un gen que codifica una UDP-glucosa:galactosa-1-fosfato uridiltransferasa, un gen que codifica una UDP-galactopiranos mutasa, un gen que codifica una UDP-galactosa:(glucosil)lipopolisacárido-1,6-galactosiltransferasa, un gen que codifica una UDP-galactosiltransferasa, un gen que codifica una UDP-glucosiltransferasa, un gen que codifica una UDP-glucuronato transferasa, un gen que codifica una UDP-glucosa transferasa al vehículo lipídico, un gen que codifica una GDP-manosa hidrolasa, un gen que codifica una UDP-azúcar hidrolasa, un gen que codifica una manosa-6-fosfato isomerasa, un gen que codifica una UDP-N-acetilglucosamina enoilpiruvil transferasa, un gen que codifica una UDP-N-acetilglucosamina acetiltransferasa, un gen que codifica una UDP-N-acetilglucosamina-2-epimerasa, un gen que codifica una undecaprenil-fosfato alfa-N-acetilglucosaminil transferasa, un gen que codifica una glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa, y/o un gen que codifica una L-glutamina:D-fructosa-6-fosfato aminotransferasa, un gen que codifica una manosa-6-fosfato isomerasa, un gen que codifica una sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa, un gen que codifica una manitol-1-fosfato-5-deshidrogenasa, un gen que codifica una alulosa-6-fosfato 3-epimerasa, un gen que codifica una invertasa, un gen que codifica una maltasa, un gen que codifica una trehalasa, un gen que codifica un fosfotransferasa transportadora de azúcar, un gen que codifica una proteasa, o un gen que codifica una hexoquinasa. El término "al menos uno" indica que al menos 1, pero también 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 o los 33 genes se desactivan o restituyen menos funcionales.

En la presente memoria se describe además el uso de un microorganismo mutado y/o transformado tal como una cepa *Escherichia coli* que comprende un cambio genético que conduce a una expresión modificada de los reguladores transcripcionales, la proteína de control de la respiración aeróbica ArcA y regulador de la isocitrato liasa IciR, para regular al alza al menos uno de los siguientes genes relacionados con la resistencia a ácidos: *ydeP*, *ydeO*, *hdeA*, *hdeD*, *gadB*, *gadC*, *gadE*, *gadX*, *gadW* y/o *sip* (17, 22). Estos genes normalmente se expresan en condiciones de fase estacionaria; sin embargo, el microorganismo mutado y/o transformado es capaz de mejorar la expresión de estos genes relacionados con la resistencia a ácidos en la fase de crecimiento exponencial. Por tanto, la presente invención se refiere al uso como se describió anteriormente para la síntesis de ácidos o moléculas sensibles al pH tales como, pero que no se limitan a, glucosamina, que es sensible al pH y se debe producir a pH bajo (12). Los ácidos orgánicos tales como, pero que no se limitan a, ácido pirúvico, ácido succínico, adípico, ácido siálico, oligosacáridos sialilados (p. ej., sialilactosa, azúcares Lewis X de sialilo...), oligosacáridos acetilados (quitinas, quitosanos...), oligosacáridos sulfonados (heparanos y heparosanos)... se producen preferiblemente a pH bajo con fines de procesamiento aguas abajo (4). En otras palabras, en la presente memoria se describe un procedimiento para la síntesis de ácidos, ácido siálico, oligosacáridos sialilados o glucosamina que comprende cambiar genéticamente los reguladores transcripcionales, la proteína de control de la respiración aeróbica ArcA y el regulador de la isocitrato liasa IciR, para regular al alza al menos uno de los siguientes genes relacionados con la resistencia a ácidos: *ydeP*, *ydeO*, *hdeA*, *hdeD*, *gadB*, *gadC*, *gadE*, *gadX*, *gadW* y/o *sip*.

La presente invención se ilustrará ahora mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Un cribado mediante RT-qPCR de alto rendimiento de los microorganismos descritos en la presente memoria se configuró con la tecnología OpenArray® de Biotrove. En este experimento, la transcripción de 1800 genes se midió en 4 cepas (tipo silvestre, $\Delta arcA$, $\Delta iclR$, $\Delta arcA \Delta iclR$) en dos condiciones (quimiostática y por lotes). Los datos se procesaron usando una herramienta de ajuste de curvas en R (25, 34) y normalización de cuantiles, el error en los datos se calculó usando estadística bayesiana (20, 21, 31).

Material y métodos

Cepas y plásmidos

La *Escherichia coli* MG1655 [$\square^+$, F⁻, *rph*-1] se obtuvo de la Colección de Cultivos de Bacterias de los Países Bajos (NCCB). La *Escherichia coli* BL21(DE3) se obtuvo de Novagen. La *Escherichia coli* MG1655 $\square ackA-ptA$, $\square poxB$, $\square pppc$ ppc-p37 (10), las desactivaciones únicas *E. coli* MG1655 $\square arcA$ and *E. coli* MG1655 $\square iclR$ y la doble desactivación *E. coli* MG1655 $\square arcA$, $\square iclR$ se construyeron en el Laboratorio de Genética y Microbiología (MICR) usando el método de Datsenko y Wanner (9).

Medios

El medio de caldo Luria (LB) consistió en 1 % de triptona peptona (Difco, Erembodegem, Bélgica), 0,5 % de extracto de levadura (Difco) y 0,5 % de cloruro sódico (VWR, Leuven, Bélgica). El medio del matraz de agitación contenía 2 g/l de NH_4Cl , 5 g/l de $(NH_4)_2SO_4$, 2,993 g/l de KH_2PO_4 , 7,315 g/l de K_2HPO_4 , 8,372 g/l de MOPS, 0,5 g/l de NaCl, 0,5 g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 16,5 g/l de glucosa- H_2O , 1 ml/l de solución de vitamina, 100 μ l/l de solución de molibdato y 1 ml/l de solución de selenio. El medio se ajustó a un pH de 7 con KOH 1 M.

La solución de vitamina consistió en 3,6 g/l de $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, 5 g/l de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1,3 g/l de $MnCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,38 g/l de $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,5 g/l de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,94 g/l de $ZnCl_2$, 0,0311 g/l de H_3BO_4 , 0,4 g/l de $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ y 1,01 g/l de tiamina-HCl. La solución de molibdato contenía 0,967 g/l de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$. La solución de selenio contenía 42 g/l de SeO_2 .

El medio mínimo para fermentaciones contenía 6,75 g/l de NH_4Cl , 1,25 g/l de $(NH_4)_2SO_4$, 1,15 g/l de KH_2PO_4 , 0,5 g/l de NaCl, 0,5 g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 16,5 g/l de glucosa- H_2O , 1 ml/l de solución de vitamina, 100 μ l/l de solución de molibdato y 1 ml/l de solución de selenio con la misma composición como se describió anteriormente.

Condiciones de cultivo

Un precultivo, de una única colonia sobre una placa LB, se incubó en 5 ml de medio LB durante 8 horas a 37 °C en un agitador orbital a 200 rpm. A partir de este cultivo, se transfirieron 2 ml a 100 ml de medio mínimo en un matraz de agitación de 500 ml y se incubaron durante 16 horas a 37 °C en un matraz orbital a 200 rpm. Se utilizó 4 % de inóculo en un recipiente de cultivo de 2 l Biostat B Plus con 1,5 l de volumen de trabajo (Sartorius Stedim Biotech, Melsungen, Alemania). Las condiciones de cultivo fueron: 37 °C, agitación a 800 rpm y un caudal de gas de 1,5 l/min. Las condiciones aeróbicas se mantuvieron llenando de aire, las condiciones anaeróbicas se obtuvieron impregnando con gas el cultivo con una mezcla de 3 % de CO_2 y 97 % de N_2 . El pH se mantuvo en 7 con H_2SO_4 0,5 M y KOH 4 M. El gas de escape se enfrió a 4 °C mediante un refrigerante de gas de escape (Frigomix 1000, Sartorius Stedim Biotech, Melsungen, Alemania). Se añadió 10 % de solución de agente antiespumante de silicona (BDH 331512K, VWR Int Ltd., Poole, Inglaterra) cuando subió la formación de espuma durante la fermentación (aproximadamente 10 μ l). El gas emitido se midió con un analizador de gas emitido EL3020 (ABB Automation GmbH, 60488 Frankfurt am Main, Alemania).

Todos los datos se registraron con el sistema MFCS/win v3.0 de Sartorius (Sartorius Stedim Biotech, Melsungen, Alemania).

Todas las cepas se cultivaron al menos dos veces y las desviaciones estándar proporcionadas de los rendimientos y las tasas se basaron en al menos 10 puntos de datos tomados durante los experimentos repetidos.

Metodología de toma de muestras

El biorreactor contiene en su interior una tubería de cosecha (aguja espinal BD, 1,2 x 152 mm (BD Medical Systems, Franklin Lakes, NJ - EE. UU.) conectada a un puerto del reactor, enlazada en el exterior a un tubo Masterflex-14 (Cole-Parmer, Antwerpen, Bélgica) seguido de un puerto de cosecha con un septo para toma de muestras. El otro lado de este puerto de cosecha está conectado de vuelta al recipiente del reactor con un tubo Masterflex-16. Este sistema se denomina bucle de toma de muestras rápido. Durante la toma de muestras, el caldo del reactor se bombea alrededor en el bucle de toma de muestras. Se ha estimado que, a un caudal de 150 ml/min, el caldo del reactor necesita 0,04 s para alcanzar el puerto de cosecha y 3,2 s para volver a entrar al reactor. A un nivel de pO_2 de 50 %, hay alrededor de 3 mg/l de oxígeno en el líquido a 37 °C. El nivel de pO_2 no debe caer nunca por debajo de 20 % para evitar condiciones microaeróbicas. Por tanto, se pueden consumir 1,8 mg/l de oxígeno durante el tránsito a través del bucle

de cosecha. Suponiendo una velocidad de absorción de oxígeno de 0,4 g de oxígeno/g de biomasa/h (la velocidad máxima de absorción de oxígeno encontrada a $\mu_{\text{máx}}$), esto da para 5 g/l de biomasa, una velocidad de absorción de oxígeno de 2 g/l/h o 0,56 mg/l/s, que multiplicada por 3,2 s (tiempo de residencia en el bucle) da 1,8 mg/l de consumo de oxígeno.

- 5 Con el fin de extinguir el metabolismo de células durante la toma de muestras, el caldo del reactor se aspiró a través del puerto de cosecha en una jeringa llena con 62 g de perlas de acero inoxidable preenfriadas a -20 °C, para enfriar 5 ml de caldo inmediatamente a 4 °C. La toma de muestras fue seguida inmediatamente de centrifugación en frío (15 000 g, 5 min, 4 °C). Durante los experimentos por lotes, se tomó una muestra para medidas de $\text{DO}_{600\text{nm}}$ y RT-qPCR usando el bucle de toma de muestras rápido y el método de toma de muestras con perlas inoxidable frías.

10 RT-qPCR

- El ARNm se extrajo con el equipo de reactivos RNeasy (Qiagen, Venlo, Países Bajos). La calidad y cantidad de ARN se comprobó con un espectrofotómetro ND-1000 de nanogotas (Nanodrop technologies, Wilmington, EE. UU.). Las relaciones 260:280 (nm) y 260:230 (nm) se encontraron entre 1,8 y 2 y fueron necesarios al menos 100 ng/ μl para análisis adicional. El ADNc se sintetizó con cebadores aleatorios con el equipo de reactivos para síntesis de la primera cadena de ADNc RevertAid™ H minus (Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania). Por último, la expresión genética de 1800 genes se midió con la plataforma de PCR en tiempo real OpenArray de Biotrove. Los cebadores para el ensayo RT-PCR se diseñaron con herramientas de diseño de cebadores a partir de la base de datos de cebadores (23).

- La mezcla de reacción estuvo compuesta como se describe en el manual del usuario del sistema de qPCR en tiempo real OpenArray™ de Biotrove. En resumen, se fabricó una mezcla maestra con 26,4 μl de LightCycler® DNA Master SYBR® Green I (Roche applied Science), 1,1 μl de SYBR GREEN I (100x solución madre, Sigma S9430), 8,8 μl de glicerol (Sigma G5150), 5,3 μl de Pluronic® F68 (10 % de solución madre, Invitrogen), 2,64 μl de BSA (Sigma A7906), 26,4 μl de cloruro de magnesio (solución madre 25 mM, suministrada en el equipo de reactivos LightCycler® de Roche applied Science), 21,1 μl de formamida HiDi™ (Applied biosystems) y 94,66 μl de agua estéril exenta de RNasa, lo que dio como resultado una mezcla madre de 186,4 μl , que fue suficiente para cargar 1 OpenArray™. Para 1 subconjunto ordenado (cada OpenArray está subdividida en 48 subconjuntos ordenados en los que se puede cargar 1 muestra), se mezclaron 1,5 μl de muestra (con una concentración de 100 ng/ μl) con 3,5 μl de mezcla maestra, como control negativo, el agua se usó como blanco. La mezcla muestra-mezcla maestra se cargó en una placa de carga (placa de polipropileno negro de volumen bajo y 384 pocillos MatriPlate™, Biotrove) en una campana exenta de RNasa. Se cargó una placa de carga completa con un cargador automático (Biotrove) y puntas de carga en las OpenArray. Estas OpenArray se sumergieron a continuación en fluido de inmersión OpenArray™ en un estuche de qPCR en tiempo real OpenArray™. El estuche se selló con pegamento para sellado del estuche y se incubó en la estación de sellado del estuche, que polimeriza el pegamento con luz UV.

Métodos analíticos

- La densidad de células del cultivo se supervisó frecuentemente midiendo la densidad óptica a 600 nm (espectrofotómetro Uvikom 922, BRS, Bruselas, Bélgica). El peso en seco de células se obtuvo mediante centrifugación (15 min, 5000 g, rotor GSA, Sorvall RC-5B, Goffin Meyvis, Kapellen, Bélgica) de 20 g de caldo del reactor en tubos de tipo Falcon presecados y pesados. Los sedimentos de lavaron posteriormente una vez con 20 ml de solución fisiológica (9 g/l de NaCl) y se secaron a 70 °C hasta un peso constante. Para poder convertir las mediciones de $\text{DO}_{600\text{nm}}$ en concentraciones de biomasa, se realizó una curva de correlación de la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ a la concentración de biomasa. Las concentraciones de glucosa y ácidos orgánicos se determinaron en un sistema de CLAR Prostar de Varian (Varian, Sint-Katelijne-Waver, Bélgica), usando una columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Eke, Bélgica) calentada a 65 °C, equipada con una precolumna de 1 cm, usando H_2SO_4 5 mM (0,6 ml/min) como fase móvil. Se usó un detector de doble onda UV-VIS (210 nm y 265 nm) (Prostar 325 de Varian) y un detector de índice de refracción diferencial (Merck LaChrom L-7490, Merck, Leuven, Bélgica) para la detección de picos. Dividiendo las absorciones de los picos a 265 y 210 nm se pudieron identificar los picos. La división da como resultado un valor constante, típico para un determinado compuesto (fórmula de Beer-Lambert).

La glucosa, fructosa, sucrosa, fucosillactosa y glucosa-1-fosfato se midieron mediante CLAR con una columna Hypercarb y se detectaron con un detector de EMEM (Antonio et al., 2007; Nielsen et al., 2006).

Métodos genéticos

- 50 Todas las cepas mutantes se construyeron por medio de los métodos descritos a continuación.

Los plásmidos se mantuvieron en la *E. coli* DH5 α huésped (F⁻, $\phi 80\text{dlacZ}\Delta\text{M15}$, $\Delta(\text{lacZYA-argF})\text{U169}$, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hdsR17*{*rk*, *mk*⁺}, *phoA*, *supE44*, λ , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*).

- Plásmidos. Los plásmidos pKD46 (plásmido auxiliar para Red, resistencia a ampicilina), pKD3 (contiene un gen de resistencia a cloranfenicol (*cat*) flanqueado por FRT), pKD4 (contiene un gen de resistencia a kanamicina (*kan*) flanqueado por FRT), y pCP20 (expresa actividad recombinasa FLP) se usaron para la construcción de mutantes. El plásmido pBluescript (Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania) se usó para construir los derivados de pKD3 y pKD4 con una biblioteca de promotores, o con alelos que llevaban una mutación puntual.

Mutaciones. Las mutaciones consistieron en la rotura de genes (desactivación, KO). Se introdujeron usando el concepto de Datsenko y Wanner (9). Los cebadores para las estrategias de mutación se describen en la Tabla 1.

Los transformantes que llevaban un plásmido auxiliar para Red se hicieron crecer en 10 ml de medio LB con ampicilina (100 mg/ml y L-arabinosa (10 mM) a 30 °C hasta una DO_{600nm} de 0,6. Las células se hicieron electrocompetentes lavándolas con 50 ml de agua helada, una primera vez, y con 1 ml de agua helada, una segunda vez. A continuación, las células se resuspendieron en 50 µl de agua helada. Se realizó electroporación con 50 µl de células y 10-100 ng de producto de ADN bicatenario lineal usando un Gene Pulser™ (BioRad) (600 Ω, 25 µFD y 250 voltios).

Después de la electroporación, las células se añadieron a 1 ml de medio LB incubado 1 h a 37 °C y, por último, se diseminaron sobre LB-agar que contenía 25 mg/l de cloranfenicol o 50 mg/l de kanamicina para seleccionar transformantes resistentes a antibióticos. Los mutantes seleccionados se verificaron mediante PCR con cebadores aguas arriba y aguas abajo de la región modificada y se hicieron crecer en LB-agar a 42 °C para la pérdida del plásmido auxiliar. Los mutantes se ensayaron para determinar la sensibilidad a ampicilina.

ADN bicatenario lineal. Los amplicones de ADNbc se obtuvieron mediante PCR usando pKD3, pKD4 y sus derivados como molde. Los cebadores usados tenían una parte de la secuencia complementaria al molde y otra parte complementaria al lado del ADN cromosómico donde debe tener lugar la recombinación (Tabla 1). Para la KO, la región de homología se diseñó 50 nt aguas arriba y 50 nt aguas abajo del codón de iniciación y detención del gen de interés. Para la KI, se tuvo que respetar el punto de partida transcripcional (+1). Los productos de la PCR se purificaron mediante PCR, se digirieron con DpnI, se repurificaron de un gel de agarosa y se suspendieron en tampón de elución (Tris 5 mM, pH 8,0).

Eliminación del gen de resistencia a antibióticos. Los mutantes seleccionados (resistentes a cloranfenicol o kanamicina) se transformaron con plásmido pCP20, que es un plásmido resistente a ampicilina y cloranfenicol que presenta replicación sensible a la temperatura e inducción térmica de la síntesis de FLP. Los transformantes resistentes a ampicilina se seleccionaron a 30 °C, después de lo que, unos cuantos se purificaron de colonias en LB a 42 °C y a continuación se ensayaron para determinar la pérdida de toda la resistencia a antibióticos y del plásmido auxiliar de FLP. Las desactivaciones y activaciones de genes se comprobaron con cebadores de control (Fw/Rv-gen-out). Estos cebadores se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1 Cebadores usados para crear *E. coli* MG1655 $\square$ *arcA*, *E. coli* MG1655 $\square$ *iclR* y la doble desactivación *E. coli* MG1655 $\square$ *arcA*, $\square$ *iclR* y todas las demás desactivaciones o activaciones genéticas

Nombre del cebador	Secuencia
<i>lacZ</i>	
FW_LacZ_P1	CATAATGGATTTCCTTACGCGAAATACGGGCAGACATGGCCTGCCCGGTTATTAggtgtaggctggagctgcttc (SEQ ID N° 7)
RV_LacZ_P2	GTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTcatatgaa tatectccttag (SEQ ID N° 8)
FW_LacZ_out	GCGGTTGGAATAATAGCG (SEQ ID N° 9)
RV_LacZ_out	CAGGTTTCCCGACTGGAAAG (SEQ ID N° 10)
<i>glgC</i>	
FW-glgC-P1	Agaccgccggttttaagcagcgggaaacatctctgaacatacatgtaaaacctgcagtgtaggctggagctgcttc (SEQ ID N° 11)
RV-glgC-P2	Gtctggcagggacctgcacacggattgtgtgtgttccagagatgataaaaaaggagttagtccatagaatatactccttag (SEQ ID N° 12)
FW-glgC-out	Gcgaatatcgggaaatgcagg (SEQ ID N° 13)
RV-glgC-out	Cagagattgttttacctgctgg (SEQ ID N° 14)
<i>agp</i>	

ES 2 733 307 T3

FW_agp_P1	CATATTTCTGTCACTCTTTAGTGATTGATAACAAAAGAGGTGCCAGGAgtagtaggctggagctgcttc (SEQ ID N° 15)
RV_agp_P2	TAAAAACGTTTAACCAGCGACTCCCCCGCTTCTCGCGGGGAGTTTTCTGcatatgaat atcctccttag (SEQ ID N° 16)
FW_agp_out	GCCACAGGTGCAATTATC (SEQ ID N° 17)
RV_agp_out	CATTTTCGAAGTCGCCGGGTACG (SEQ ID N° 18)
<i>pgi</i>	
Fw-pgi-P1	GGCGCTACAATCTTCCAAAGTCACAATTCTCAAAATCAGAAGAGTATTGCgttaggctggagctgcttc (SEQ ID N° 19)
Rv-pgi-P2	GGTTGCCGATGCGGCGTGAACGCCTTATCCGGCCTACATATCGACGATGcatatgaat atcctccttag (SEQ ID N° 20)
Fw_pgi_out (2)	GGCTCCTCCAACACCGTTAC (SEQ ID N° 21)
Rv_pgi_out (2)	TACATATCGGCATCGACCTG (SEQ ID N° 22)
<i>pfkA</i>	
Fw-pfkA-out	TACCGCCATTTGGCCTGAC (SEQ ID N° 23)
Rv-pfkA-out	AAAGTGCCTTTGTCCATGC (SEQ ID N° 24)
Fw-pfkA-P1	GACTTCCGGCAACAGATTTTCATTTTGCATTCCAAAGTTCAGAGGTAGTCgttaggctggagctgcttc (SEQ ID N° 25)
Rv-pfkA-P2	GCTTCTGTCATCGGTTTCAGGGTAAAGGAATCTGCCTTTTTCCGAAATCcatatgaata tcctccttag (SEQ ID N° 26)
<i>pfkB</i>	
Fw-pfkB-out	TAGCGTCCCTGGAAAGGTAAC (SEQ ID N° 27)
Rv-pfkB-out	TCCCTCATCATCCGTCATAG (SEQ ID N° 28)
Fw-pfkB-P1	CACTTTCCGCTGATTCGGTGCCAGACTGAAATCAGCCTATAGGAGGAAATGgttaggctggagctgcttc (SEQ ID N° 29)
Rv-pfkB-P2	GTTGCCGACAGGTGGTGATGATCCCCCAATGCTGGGGGAATGTTTTTgcatatgaat atcctccttag (SEQ ID N° 30)
<i>arcA</i>	
FW-arcA-P1	Ggttgaaaaataaaaaacggcgctaaaaagcgccggttttttttgacggtggtaaagccga gttaggctggagctgcttc (SEQ ID N° 31)
RV-arcA-P2	Ggtcagggacttttgtacttcctgtttcgatttagttggcaatttaggttagcaaaccat atgaatatcctccttag (SEQ ID N° 32)
FW-arcA-out	Ctgccgaaaatgaaagccagta (SEQ ID N° 33)

ES 2 733 307 T3

RV-arcA-out	Ggaaagtgcacatcaagaacgcaa (SEQ ID N° 34)
iclR	
FW-iclR-P1	Ttgccactcaggtatgatgggcagaatattgcctctgcccgccagaaaaaggtgtaggc tgagctgcttc (SEQ ID N° 35)
RV-iclR-P2	Gttcaacattaactcatcggatcagttcagtaactattgcattagctaacaataaaaaca tatgaatatcctccttag (SEQ ID N° 36)
FW-iclR-out	Cggtggaatgagatcttgcca (SEQ ID N° 37)
RV-iclR-out	Acttgctcccgacacgctca (SEQ ID N° 38)
FW_iclR_P8	TTGCCACTCAGGTATGATGGGCAGAATATTGCCTCTGCCCGCCAGAAAAAGccgcttac agacaagctgtg (SEQ ID N° 39)
RV_iclR_P9	GTTCAACATTAACATCATCGGATCAGTTCAGTAACATATTGCATTAGCTAACAATAAAAAag ccatgacccggaattac (SEQ ID N° 40)
Rv-iclR- scarless KO stap 2	CTATTGCATTAGCTAACAATAAACTTTTTCTGGCGGGCAGAGG (SEQ ID N° 41)
Fw-iclR- scarless KO stap 2	CCTCTGCCCCGCCAGAAAAAGTTTTATTGTTAGCTAATGCAATAGTTAC (SEQ ID N° 42)
wcaJ	
Fw_wcaJ_out	GCCAGCGCGATAATCACCAG (SEQ ID N° 43)
Rv_wcaJ_out	TGCGCCTGAATGTGGAATC (SEQ ID N° 44)
Fw-wcaJ_2- P1	TTTTGATATCGAACCAGACGCTCCATTCGCGGATGTACTCAAGGTCGAACgtgtaggct ggagctgcttc (SEQ ID N° 45)
Rv-wcaJ_2- P2	TCTATGGTGCAACGCTTTTCAGATATCACCATCATGTTTGCCGGACTATGcatatgaat atcctccttag (SEQ ID N° 46)
fw_wcaJ_H1'	TCAATATGCCGCTTTGTTAACGAAACCTTTGAACACCGTCAGGAAAACGATTTTGATAT CGAACCAGACG (SEQ ID N° 47)
Rv_wcaJ_H2'	TGACAAATCTAAAAAAGCGCGAGCGAGCGAAAACCAATGCATCGTTAATCTCTATGGTG CAACGCTTTTC (SEQ ID N° 48)
Fw_wcaJ_H1' _2	CGCTTTGTTAACGAAACCTTTGAACACCGTCAGGAAAACGATTTTGATATCGAACCAGA CGCTCCATTCG (SEQ ID N° 49)
lon	
FW-lon-P1	CAGTCGTGTCATCTGATTACCTGGCGGAAATTAACTAAGAGAGAGCTCTgtgtaggct ggagctgcttc (SEQ ID N° 50)
oMEMO100_RV -lon-P2	CGAATTAGCCTGCCAGCCCTGTTTTTATTAGTGCATTTTGCGCGAGGTCAcatatgaat atcctccttag (SEQ ID N° 51)

ES 2 733 307 T3

oMEMO101_FW-lon-out	AGCGCAACAGGCATCTGGTG (SEQ ID N° 52)
oMEMO102_RV-lon-out	TATATCAGGCCAGCCATCCC (SEQ ID N° 53)
lacZYA:P22-lacY	
Fw_lacZYA_c hl	GCTGAACTTGTAGGCCTGATAAGCGCAGCGTATCAGGCAATTTTATAATCTTCATTTA AATGGCGCGC (SEQ ID N° 54)
rv_lacZYA_c hl	GCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTCGCCTACCT GTGACGGAAG (SEQ ID N° 55)
fw_P22lacY-KI_P1	GCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTGTGTAGGCT GGAGCTGCTTC (SEQ ID N° 56)
rv_P22lacY-KI	GCTGAACTTGTAGGCCTGATAAGCGCAGCGTATCAGGCAATTTTATAATCTTAAGCGA CTTTCATTACCC (SEQ ID N° 57)
fw_lacZYA_H 1'	CGACGCTTGTTCCTGCGCTTTGTTTCATGCCGGATGCGGCTAATGTAGATCGCTGAACTT GTAGGCTG (SEQ ID N° 58)
rv_lacZYA_H 2'	CATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGC AATTAATGTG (SEQ ID N° 59)
pfkA:P22-BaSP	
Fw-pfkA-P1	GACTTCCGGCAACAGATTTTCATTTTGCATTCCAAAGTTCAGAGGTAGTCgtgtaggctg gagctgcttc (SEQ ID N° 60)
Rv-pfkA-pCXP22_P2	GCTTCTGTCATCGGTTTCAGGGTAAAGGAATCTGCCTTTTCCGAAATCaagcttgcat gcctgcatcc (SEQ ID N° 61)
FW_kan	AGAGGCTATTCGGCTATGAC (SEQ ID N° 62)
Fw_baSP_seq	CGCCATGTTGGAATGGGAGG (SEQ ID N° 63)
Fw_pfkA_H1_ext	TGATTGTTATACTATTTGCACATTCGTTGGATCACTTCGATGTGCAAGAAGACTTCCGG CAACAGATTTTC (SEQ ID N° 64)
Rv_pfkA_H2_ext	AATTGCAGAATTCATGTAGGCCTGATAAGCGAAGCGCATCAGGCATTTTGTCTCTGTC ATCGGTTTCAG (SEQ ID N° 65)
Fw-pfkA-out	TACCGCCATTTGGCCTGAC (SEQ ID N° 66)
Rv-pfkA-out	AAAGTGCCTTTGTCCATGC (SEQ ID N° 67)
adhE:P22-frk	
Fw-adhE-pCXP22-P1	ATCGGCATTGCCCAGAAGGGGCCGTTTATGTTGCCAGACAGCGCTACTGAgtaggct ggagctgcttc (SEQ ID N° 68)
Rv-adhE-	ATTTCGAGCAGATGATTTACTAAAAAAGTTTAACATTATCAGGAGAGCATTaagcttgca

ES 2 733 307 T3

pCXP22-P2	tgcctgcatcc (SEQ ID N° 69)
Fw-adhE-H1 '	AAGCCGTTATAGTGCCTCAGTTTAAGGATCGGTCAACTAATCCTTAAGTATCGGCATT GCCCAGAAG (SEQ ID N° 70)
Rv-adhE-H2 '	TTGATTTTTCATAGGTAAAGCAAATCATCACCGCACTGACTATACTCTCGTATTCGAGCA GATGATTTACTAAAAAAG (SEQ ID N° 71)
FW_adhE_out	GCGTCAGGCAGTGTTGTATC (SEQ ID N° 72)
RV_adhE_out	CTGGAAGTGACGCATTAGAG (SEQ ID N° 73)
ldhA:P14- FT_H. pylori	
FW_ldhA_out	tgtcattacttacacatcccgc (SEQ ID N° 74)
RV_ldhA_out	gcattcaatacgggtattgtgg (SEQ ID N° 75)
Fw-ldhA- pCXP22_P1	CATTGGGGATTATCTGAATCAGCTCCCTGGAATGCAGGGGAGCGGCAAGgtgtaggct ggagctgcttc (SEQ ID N° 76)
Rv-ldhA- pCXP22_P2	TATTTTGTAGTAGCTTAAATGTGATTCAACATCACTGGAGAAAAGTCTTATGaagcttgca tgcctgcatcc (SEQ ID N° 77)
Fw-ldhA-H1 '	CAATTACAGTTTCTGACTCAGGACTATTTTAAGAATAGAGGATGAAAGGTCATTGGGGA TTATCTGAATCAG (SEQ ID N° 78)
Rv-ldhA-H2 '	GAATTTTTCATATCGCCATAGCTTTCAATTAAATTTGAAATTTTGAAAATATTTTGA GTAGCTTAAATGTGATTCAAC (SEQ ID N° 79)
Fw-ldhA- long homol	TTCACCGCTAAAGCGGTTAC (SEQ ID N° 80)
Rv-ldhA- long homol	CGCGTAATGCGTGGGCTTTC (SEQ ID N° 81)
promCA:P14	
pCXP14_SP_F w	CCGGCATATGGTATAATAGGG (SEQ ID N° 82)
yegH_rc_pur e_rv	ACGGCTTGCTGGCCATCA (SEQ ID N° 83)
fw_P14- CA_KI_tetA	CGAATATAAGGTGACATTATGGTAATTGAATATTGGCTTCCAATAATGCTACGGCCCC AAGGTCCAA (SEQ ID N° 84)
rv_P14- CA_KI_tetA	AATATTGTCAACCTAAAGAACTCCTAAAAACCATATTGAATGACACTTATTGGCTTCA GGGATGAGGCG (SEQ ID N° 85)
fw_P14- CA_KI_overl apA	TCCCCACTACGTGGACCTTG (SEQ ID N° 86)
rv_P14- CA_KI_overl	CATATGGTATAATAGGGAAATTTCCATGGCGGCCGCTCTAGAAGAAGCTTGGGATCCGT CGACCTCGGCATTATTGGAAAGCCAATATTC (SEQ ID N° 87)

apA	
fw_P14- CA_KI_overl apB	GCCGCCATGGAAATTTCCCTATTATACCATATGCCGGCCAAGATGTCAAGAACTTATA GAATGAAGTAAGTGTTCATTCAATATGG (SEQ ID N° 88)
fw_P14- CA_KI_H1	AATATTGTCAACCTAAAGAACTCCTAAAAACCATATTGAATGACACTTACTTCATTCT ATAAGTTTCTTGAC (SEQ ID N° 89)
rv_P14- CA_KI_H2	CGAATATAAGGTGACATTATGGTAATTGAATATTGGCTTTCCAATAATGCCGAGGTCTGA CGGATCCCAAGCTTC (SEQ ID N° 90)

Transformación. Los plásmidos se transformaron en células competentes con CaCl_2 usando el procedimiento simplificado de Hanahan (16) o por medio de electroporación como se describió anteriormente.

Métodos de cálculo

5 Introducción

Se realizaron diferentes experimentos con diferentes cepas. En total se ensayaron 8 condiciones diferentes. Hubo variación en el contexto genético (WT, desactivación de *iclR*, desactivación de *arcA* y desactivación de *iclR-arcA* combinada) y el modo de fermentación (quimioestática, por lotes). Cada experimento se repitió dos veces.

10 Cuando se analizaron las muestras en el aparato de BioTrove, se obtuvo una curva de qPCR (fluorescencias en función del número de ciclos) y una curva de fusión (fluorescencias en función de la temperatura) para cada muestra. Esos datos se exportaron del programa de BioTrove y se analizaron adicionalmente en R. El análisis se dividió en dos etapas: primero se ajustaron las curvas de qPCR y se calcularon los valores de Ct, y en la segunda etapa los valores de Ct se convirtieron a datos de expresión.

Cálculo de las curvas de qPCR

15 Los datos de la curva de qPCR sin procesar se extrajeron del programa de BioTrove y se importaron en R (1). Las curvas se ajustaron a un modelo sigmoide de 5 parámetros, con el paquete R para qPCR (25, 34). El máximo de la segunda derivada de esas curvas se usó como valor de Ct. No se aplicó normalización a los datos antes del ajuste de las curvas. Sin embargo, se retiraron los resultados discrepantes. La detección de los resultados discrepantes se realizó usando el procedimiento siguiente:

20 Ajustar el modelo a los datos.

Calcular los residuos estadísticos (definidos como las fluorescencias medidas menos las calculadas con el modelo).

Suponiendo que los residuos estadísticos están distribuidos normalmente, calcular la media y la desviación estándar de los residuos estadísticos.

Usando esta media y esta desviación estándar, se calcula el intervalo de 95 %.

25 Todos los puntos de datos para los que los residuos estadísticos cayeron fuera de este intervalo de 95 % se consideraron valores discrepantes.

La curva se reajustó sin los valores discrepantes.

Esto se repitió hasta que ya no se detectaron valores discrepantes. Usando este procedimiento, los datos no se tienen normalizar antes del ajuste, ni se deben retirar los primeros puntos de datos.

30 Se deben ajustar muchas curvas (1800 genes para un experimento). Por lo tanto, era inviable comprobar manualmente cada curva y se tuvieron que aplicar métodos automatizados para rechazar las curvas malas. Para ello, se extrajeron diferentes parámetros de las curvas: el valor del número de ciclos al que se producía el máximo de la primera derivada (D1), el valor del número de ciclos al que se producía el máximo de la segunda derivada (D2), la fluorescencia mínima (Fmín) y la fluorescencia máxima (Fmáx). Combinando los valores de esos parámetros se evaluó la validez de la curva y el grado de expresión. En la siguiente sección se explica cómo se hace esto.

35

Filtrado de los datos

Para algunas combinaciones gen-experimento, no se detectó amplificación. Esto se puede deber a un abanico de razones:

La expresión es demasiado baja y 32 ciclos (el número de ciclos para todos los conjuntos ordenados de BioTrove se ajustó a 32) no son suficientes para detectar la expresión. En este caso, el Ct real no se puede determinar y se encuentra en algún punto entre 32 e infinito.

No hay expresión. En este caso, el Ct real es infinito.

- 5 Fracaso técnico: cebadores no adecuados, carga errónea (es muy difícil cargar uniformemente los conjuntos ordenados de BioTrove, especialmente los orificios a los lados del conjunto ordenado están frecuentemente vacíos), etc. En este caso, el Ct real puede variar entre 0 e infinito.

10 Algunos genes no se expresan realmente y ajustar su valor de Ct a algo que no sea infinito no es correcto. Para los genes que se expresan, pero para los que el valor de la expresión, debido a fracasos técnicos o limitaciones, no es conocido, ajustar el valor de Ct a infinito no es correcto. Asimismo, usar valores arbitrarios que están fuera del intervalo de expresión complica las rutinas de cálculo y las rutinas de visualización. Por lo tanto, se optó por retirar las combinaciones gen-experimento para las que no se detectaron datos de expresión correctos.

Un caso obvio de pares gen-experimento para los que no se detectó expresión son aquellos para los que no se pudo ajustar la curva a los datos de qPCR. A continuación, se detallan casos menos obvios.

- 15 Es habitual para los genes expresados que los valores de fluorescencia cubran un cierto intervalo. Los puntos de datos para los que este intervalo no era lo suficientemente alto se descartaron, ya que señalaban a curvas muy mal ajustadas y a datos generalmente malos. El intervalo de fluorescencia mínimo se ajustó a 400 (por tanto, $F_{\max} - F_{\min} > 400$).

20 En una curva de amplificación buena, la primera (D1) y segunda (D2) derivadas están bastante próximas entre sí (véase la documentación de la función SOD en el paquete de qPCR (25)). Por lo tanto, todos los puntos de datos para los que la diferencia entre D1 y D2 era mayor que un valor arbitrario (se usó 7) se descartaron.

25 Para cada par de cebadores, se realizó un experimento de qPCR sin añadir ADN. Solo se añadió agua. Normalmente, no se debería observar expresión en esas muestras. Sin embargo, se detectó amplificación en agua para algunos pares de cebadores. Los genes para los que el valor de Ct (como se mencionó antes, se usó D2) era superior al valor de Ct del agua menos 5 se descartaron, ya que no se podía excluir que la fluorescencia procediera de la amplificación de los cebadores y no del ADN añadido.

Normalización y cálculo de los contrastes

30 Antes de calcular las diferencias de expresión, los valores de Ct se tienen que normalizar. Como se midieron tantos genes (1800), se pudo usar normalización de cuantiles (33). Los 1800 genes medidos se dividieron en 3 tipos de conjuntos ordenados, que contenían cada uno 600 genes. La normalización de cuantiles se realizó para cada tipo de conjunto ordenado por separado. Se construyó una tabla en la que las filas representaban los diferentes genes y las columnas los diferentes experimentos (T1, véase Ecuaciones 1). Cada columna se clasificó independientemente (T2) y se guardó la posición original de los elementos. Los valores de esta nueva tabla se sustituyeron con el valor medio en las diferentes filas (T3). Y, por último, esta tabla se transformó para que las posiciones de los valores correspondieran otra vez a las posiciones originales (T4).

$$T_1 = \begin{bmatrix} 2 & 4 \\ 6 & 8 \\ 4 & 12 \end{bmatrix} \quad T_2 = \begin{bmatrix} 2 & 4 \\ 6 & 8 \\ 4 & 12 \end{bmatrix} \quad T_3 = \begin{bmatrix} 3 & 3 \\ 6 & 6 \\ 9 & 9 \end{bmatrix} \quad T_4 = \begin{bmatrix} 3 & 3 \\ 6 & 6 \\ 9 & 9 \end{bmatrix}$$

35 Ecuaciones 1: Ejemplo de normalización de cuantiles

40 Las expresiones diferenciales se calcularon con los datos normalizados. Esto se realizó con el paquete R limma, que usa una estrategia bayesiana para calcular las relevancias estadísticas de las diferencias (31,32). Limma se adaptó para que fuera capaz de asumir datos perdidos: el paquete limma original descarta todos los valores de expresión de un gen en los diferentes experimentos cuando un valor de un experimento no está disponible. Esto dificulta el análisis cuando se tienen muchas condiciones diferentes, ya que, para cada gen para el que una de las condiciones experimentales no produce valores de expresión, se debe generar una matriz de contraste diferente que omita esa condición experimental. Por lo tanto, la función para ajustar los contrastes se adaptó para omitir puntos de datos con datos perdidos.

45 Las expresiones diferenciales se calcularon entre los valores de Ct y el valor medio de Ct para un determinado gen. Por tanto, cuanto más alto es el valor, más baja es la expresión. Para cada gen, se generaron representaciones gráficas que presentaban esas diferencias. Sin embargo, en esas curvas, los valores de Ct se invirtieron, por lo que

cuanto más alto era el valor, más alta era la expresión.

Ejemplo 1: Efecto de las supresiones del gen *arcA* e *iclR* sobre la expresión genética de la biosíntesis de ácido colánico

Las Figuras 1 y 2 presentan el patrón de expresión de genes implicados en la biosíntesis de ácido colánico (35). Las mutaciones de desactivación de *arcA* o *iclR* únicas no afectaron a la expresión del operón en comparación con la cepa del tipo silvestre en condiciones por lotes y quimiostáticas. La cepa doble mutante, $\Delta arcA \Delta iclR$, sin embargo, mejoró la regulación de los genes del operón del ácido colánico 6 a 8 veces en comparación con el tipo silvestre y las cepas mutantes únicas en condiciones quimiostáticas y por lotes. Ambos reguladores tienen, por tanto, un efecto sorprendentemente cooperativo sobre la expresión de este operón que es independiente de la condición de cultivo que se aplica. Examinando la red reguladora de este operón, no se pudo encontrar un enlace directo entre ambos, ArcA e IclR, y el factor de transcripción que controla el operón, RcsA (Figura 5). Solo ArcA está conectada con RcsA por medio de otros 3 factores de transcripción, que también están regulados al alza. Sin embargo, la cepa mutante con supresión de un único gen $\Delta ArcA$ no afectó a la transcripción del operón.

Ejemplo 2: Efecto de las supresiones del gen *arcA* e *iclR* sobre la expresión genética de los genes de la biosíntesis de GDP-fucosa

Las Figuras 4 y 6 presentan la relación del operón del ácido colánico con la biosíntesis de GDP-fucosa. En la Figura 6 se presenta la regulación al alza de genes específicos de la biosíntesis de GDP-fucosa. Estas mutaciones, por tanto, mejoran la biosíntesis de GDP-fucosa, que es un precursor de oligosacáridos fucosilados tales como fucosillactosa, fucosillactobiosa y oligosacárido Lewis X o proteínas fucosiladas. Estos azúcares y proteínas, como ya se indicó anteriormente, tienen aplicaciones en usos terapéuticos como nutracéuticos, como componentes de la leche materna humana en la que tienen efectos antiinflamatorios y prebióticos (5, 8, 27).

Ejemplo 3: Mejora de la biosíntesis de GDP-fucosa y oligosacárido fucosilado

Las mutaciones $\Delta ArcA \Delta iclR$ aplicadas en combinación con otras mutaciones mejoran la producción de compuestos fucosilados. "Otra" primera modificación genética que mejora dicha producción es la supresión de *wcaJ* del operón colánico, que detiene el inicio de la biosíntesis de ácido colánico y, por tanto, la acumulación de GDP-fucosa. Además, se debe introducir una fucosiltransferasa para enlazar la fucosa con diferentes moléculas aceptoras tales como lactosa. El metabolismo se modifica a continuación adicionalmente para acumular el precursor de la ruta biosintética de GDP-fucosa. Estas modificaciones se presentan en la Figura 7. Además de *wcaJ*, se desactivan los genes del operón del ácido colánico que no codifican reacciones de biosíntesis de GDP-fucosa, tales como *gmm*, *wcaA*, *wcaB*, *wcaC*, *wcaD*, *wcaE*, *wcaF*, *wcaI*, *wcaK*, *wcaL* y/o *wcaM*. Para la producción de fucosillactosa, se desactiva *lacZ*, que codifica β -galactosidasa, para evitar la degradación de lactosa y se mejora la expresión de *lacY*, que codifica una lactosa permeasa, por medio de un promotor constitutivo fuerte.

Ejemplo 4: Mejora de la producción de GDP-fucosa y oligosacárido fucosilado por medio de un metabolismo dividido con sucrosa como sustrato.

Para acumular el precursor de GDP-fucosa fructosa y fructosa-6-fosfato, se introduce una sucrosa fosforilasa o invertasa. Como la fructosa-6-fosfato se degrada fácilmente en la glicólisis, la glicólisis se interrumpe con el fin de dirigir toda la fructosa-6-fosfato en la dirección de GDP-fucosa. Por tanto, se desactivan los genes *pgi*, *pfkA* y *pfkB*, que codifican glucosa-6-fosfato isomerasa y fosfofructoquinasa A y B. Por último, se introduce una fucosiltransferasa para enlazar la fucosa a una molécula aceptora.

La velocidad de crecimiento de la cepa de tipo silvestre se ve algo afectada cuando se hace crecer en sucrosa después de la introducción de una sucrosa fosforilasa (BaSP) (plásmido con secuencia SEQ ID N° 2) (Tabla 2), sin embargo, la introducción de mutaciones de *pgi* y mutaciones dobles de *pfkA* y *pfkB* condujo a una reducción significativa de la velocidad de crecimiento, esta fue extremadamente baja ($0,02 \text{ h}^{-1}$). La combinación de todas las mutaciones (Δpgi y $\Delta pfkA$ y $\Delta pfkB$) condujo a la velocidad de crecimiento más lenta, sin embargo, la velocidad de crecimiento en sucrosa y glucosa fue sorprendentemente similar a la del mutante único *pgi*.

Tabla 2: velocidades de crecimiento específicas de las cepas con desactivación de la glicólisis en un medio mínimo con glucosa y sucrosa

Cepa	Velocidad de crecimiento en glucosa (h^{-1})	Velocidad de crecimiento en sucrosa (h^{-1}) (Cepas transformadas con plásmido que contiene BaSP)
Tipo silvestre	0,64	0,41
Δpgi	0,18	0,23
$\Delta pfkA \Delta pfkB$	0,02	n.d.
$\Delta pgi \Delta pfkA \Delta pfkB$	0,23	0,24

SEQ ID N° 2: Secuencia de plásmido con sucrosa fosforilasa BaSP

AATTCGGAGGAAACAAAGATGGGGGGTTCTCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGC
ATGAAAAACAAGGTGCAGCTCATCACTTACGCCGACCGCCTTGGCGACGGCACCATCAAG
TCGATGACCGACATTCTGCGCACCCGCTTCGACGGCGTGTACGACGGCGTTCACATCCTG
CCGTTCTTCACCCCGTTTCGACGGCGCCGACGCAGGCTTCGACCCGATCGACCACACCAAG
GTCGACGAACGTCTCGGCAGCTGGGACGACGTCGCCGAACCTCTCCAAGACCCACAACATC
ATGGTCGACGCCATCGTCAACCACATGAGTTGGGAATCCAAGCAGTTCCAGGACGTGCTG
GCCAAGGGCGAGGAGTCCGAATACTATCCGATGTTCCCTCACCATGAGCTCCGTGTTCCCG
AACGGCGCCACCGAAGAGGACCTGGCCGGCATCTACCGTCCGCGTCCGGGCCTGCCGTTT
ACCCACTACAAGTTCGCCGGCAAGACCCGCCTCGTGTGGGTCAGCTTCACCCCGCAGCAG
GTGGACATCGACACCGATTCCGACAAGGGTTGGGAATACCTCATGTCGATTTTCGACCAG
ATGGCCGCCTCTCACGTCAGCTACATCCGCCTCGACGCCGTCGGCTATGGCGCCAAGGAA
GCCGGCACCAGCTGCTTCATGACCCCGAAGACCTTCAAGCTGATCTCCCGTCTGCGTGAG
GAAGGCGTCAAGCGCGGTCTGGAAATCCTCATCGAAGTGCACTCCTACTACAAGAAGCAG
GTCGAAATCGCATCCAAGGTGGACCGCGTCTACGACTTCGCCCTGCCTCCGCTGCTGCTG
CACGCGCTGAGCACCGGCCACGTCGAGCCCGTCGCCCCTGGACCGACATACGCCCGAAC
AACGCCGTCACCGTGCTCGATACGCACGACGGCATCGGCGTGATCGACATCGGCTCCGAC
CAGCTCGACCGCTCGCTCAAGGGTCTCGTGCCGGATGAGGACGTGGACAACCTCGTCAAC
ACCATCCACGCCAACCCACGGCGAATCCAGGCAGCCACTGGCGCCGCCGCATCCAAT

CTCGACCTCTACCAGGTCAACAGCACCTACTATTTCGGCGCTCGGGTGCAACGACCAGCAC
 TACATCGCCGCCCGCGCGGTGCAGTTCTTCCTGCCGGGCGTGCCGCAAGTCTACTACGTC
 GGCGCGCTCGCCGGCAAGAACGACATGGAGCTGCTGCGTAAGACGAATAACGGCCGCGAC
 ATCAATCGCCATTACTACTCCACCGCGGAAATCGACGAGAACCTCAAGCGTCCGGTTCGTC
 AAGGCCCTGAACGCGCTCGCCAAGTTCGCAACGAGCTCGACGCGTTCGACGGCACGTTT
 TCGTACACCACCGATGACGACACGTCCATCAGCTTCACCTGGCGCGGCGAAACCAGCCAG
 GCCACGCTGACGTTTCGAGCCGAAGCGCGGTCTCGGTGTGGACAACGCTACGCCGGTTCGCC
 ATGTTGGAATGGGAGGATTCCGCGGGAGACCACCGTTTCGGATGATCTGATCGCCAATCCG
 CCTGTGCTCGCCTGACTGCAGGTGCACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCAG
 GCATGCAAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCAGCCTGATACAGATTAAA
 TCAGAACGCAGAAGCGGTCTGATAAAACAGAATTTGCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTC
 CCACCTGACCCCATGCCGAACCTCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGG
 TCTCCCCATGCGAGAGTAGGGAACCTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAA
 AGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAA
 TCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCCGAGGGTGGCGGGCAGGACG
 CCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTT
 TCGTTTTCTACAACTCTTTTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTC
 ATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATT
 CAACATTTCCGTGTGCGCCTTATTCCCTTTTTTTCGCGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCT
 CACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGT
 TACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAAGCT
 TTTCCAATGATGAGCACTTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGAC
 GCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTAC
 TCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTCT
 GCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCG
 AAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGG
 GAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTACAGCA
 ATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAA
 CAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTT
 CCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATC
 ATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGG
 AGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATT
 AAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTT
 CATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATC
 CCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCT
 TCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTA
 CCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGC

TTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCAC
 TTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCT
 GCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGAT
 AAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACG
 ACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCCGAA
 GGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGG
 GAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCTGGGTTTCGCCACCTCTGA
 CTTGAGCGTCGATTTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGC
 AACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTCT
 GCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCT
 CGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTG
 ATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATATGGTGCACTCTC
 AGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTG
 ACTGGGTCATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTT
 GTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGAGCTCGATATC
 CCGGGCGGCCGCTTCATTTATAAATTTCTTGACATTTTGAATAGATGTGATATAATGTG
 TACATATCCATGGCGGCCGCTCTAGAAGAAGCTTGGGATCCGTCGACCTCG

Los redireccionamientos de flujo y las mutaciones para la biosíntesis de GDP-fucosa y oligosacárido fucosilado en un metabolismo dividido se presentan en la Figura 8, ambos para una cepa que expresa una invertasa y sucrosa fosforilasa heterólogas. Además de *wcaJ*, se desactivan los genes del operón del ácido colánico que no codifican reacciones de biosíntesis de GDP-fucosa, tales como *gmm*, *wcaA*, *wcaB*, *wcaC*, *wcaD*, *wcaE*, *wcaF*, *weal*, *wcaK*, *wcaL* y/o *wcaM*. Para la producción de fucosillactosa, se desactiva *lacZ*, que codifica β -galactosidasa, para evitar la degradación de lactosa y se mejora la expresión de *lacY*, que codifica una lactosa permeasa, por medio de un promotor constitutivo fuerte.

Ejemplo 5: Mejora de la producción de GDP-fucosa y oligosacárido fucosilado por medio de un metabolismo dividido con glucosa como sustrato.

Cuando los genes *pgi*, *pfkA* y *pfkB* están desactivados, el carbono, absorbido como glucosa, solo se puede metabolizar por medio de la ruta de la pentosa fosfato. Debido a las propiedades bioquímicas de esta ruta, se forma fructosa-6-fosfato (Figuras 9 y 10). Para formar biomasa se debe formar gliceraldehído-3-fosfato, que se forma mediante las reacciones de transcetolasa codificadas por *tktA* y *tktB* en *E. coli*. Este gliceraldehído-3-fosfato se forma junto con fructosa-6-fosfato a partir de xilulosa-5-fosfato y eritrosa-5-fosfato. Esta, a su vez, se forma junto con fructosa-6-fosfato a partir de gliceraldehído-3-fosfato y pseudoheptulosa-7-fosfato por medio de reacciones de transaldolasa codificadas por *talA* y *talB*. Para equilibrar todas estas reacciones juntas, el flujo se debe distribuir entre xilulosa-5-fosfato y ribosa-5-fosfato, de tal forma que, a partir de 1 mol de glucosa, se forman 2/3 moles de xilulosa-5-fosfato y 1/3 moles de ribosa-5-fosfato. Para impulsar estas reacciones de equilibrio, la fructosa-6-fosfato se retira de la ruta de la pentosa fosfato mediante la ruta de la biosíntesis de GDP-fucosa y oligosacárido fucosilado. Además de *wcaJ*, se desactivan los genes del operón del ácido colánico que no codifican reacciones de biosíntesis de GDP-fucosa, tales como *gmm*, *wcaA*, *wcaB*, *wcaC*, *wcaD*, *wcaE*, *wcaF*, *weal*, *wcaK*, *wcaL* y/o *wcaM*. Para la producción de fucosillactosa, se desactiva *lacZ*, que codifica β -galactosidasa, para evitar la degradación de lactosa y se mejora la expresión de *lacY*, que codifica una lactosa permeasa, por medio de un promotor constitutivo fuerte.

Ejemplo 6: Producción de 2-fucosillactosa fermentativa con una fucosiltransferasa procedente de *Helicobacter pylori*

La cepa mutante en la que los genes *lacZ*, *glgC*, *agp*, *pfkA*, *pfkB*, *pgi*, *arcA*, *iclR*, *wcaJ* están desactivados y *lacY* se expresó por medio de expresión constitutiva para garantizar expresión en todas las condiciones de cultivo, se transformó adicionalmente con una fucosiltransferasa procedente de *Helicobacter pylori* y una sucrosa fosforilasa

procedente de *Bifidobacterium adolescentis*, que también se expresaron constitutivamente. Los promotores constitutivos proceden de la biblioteca de promotores descrita por De Mey *et al.* 2007. Esta cepa se cultivó en un medio como se describió en los materiales y métodos, sin embargo, con 30 g/l de sucrosa y 50 g/l de lactosa. Esto dio como resultado la formación de 2-fucosillactosa como se presenta en la Figura 13 y 14.

5 Ejemplo 7: Producción de fucosillactosa fermentativa con una fucosiltransferasa procedente de *Dictyostellium discoideum*

La cepa mutante en la que los genes *lacZ*, *glgC*, *agp*, *pfkA*, *pfkB*, *pgi*, *arcA*, *iclR*, *wcaJ* están desactivados y *lacY* se expresó por medio de expresión constitutiva para garantizar la expresión en todas las condiciones de cultivo, se transformó adicionalmente con una fucosiltransferasa procedente de *Dictyostellium discoideum* y una sucrosa fosforilasa procedente de *Bifidobacterium adolescentis*, que también se expresaron constitutivamente. Los promotores constitutivos proceden de la biblioteca de promotores descrita por De Mey *et al.* 2007. Esta cepa se cultivó en un medio como se describió en los materiales y métodos, sin embargo, con 30 g/l de sucrosa y 50 g/l de lactosa. Esto dio como resultado la formación de 2-fucosillactosa como se presenta en la Figura 13 y 14.

15 Ejemplo 8: Mejora de la producción de GDP-manosa y oligosacárido manosilado por medio de un metabolismo dividido con sucrosa como sustrato

Para acumular los precursores de GDP-manosa fructosa y fructosa-6-fosfato, se introduce una sucrosa fosforilasa o invertasa. Como la fructosa-6-fosfato se degrada fácilmente en la glicólisis, la glicólisis se interrumpe con el fin de dirigir toda la fructosa-6-fosfato en la dirección de GDP-fucosa. Por tanto, se desactivan los genes *pgi*, *pfkA* y *pfkB* que codifican glucosa-6-fosfato isomerasa y fosfofructoquinasa A y. Por último, se introduce una manosiltransferasa para enlazar la manosa a una molécula aceptora. Para evitar la degradación de GDP-manosa, se deben desactivar los genes *gmm* y *gmd* en el operón del ácido colánico. Además, se desactivan los genes que no codifican reacciones de biosíntesis de GDP-manosa, tales como *wcaA*, *wcaB*, *wcaC*, *wcaD*, *wcaE*, *wcaF*, *weal*, *wcaJ*, *wcaK*, *wcaL* y/o *wcaM*.

Ejemplo 9: Regulación al alza de genes relacionados con la resistencia a ácidos

De forma similar a la regulación al alza del operón del ácido colánico, también se regulan al alza los genes relacionados con la resistencia a ácidos en una cepa doble mutante $\Delta ArcA \Delta iclR$ en comparación con la cepa de tipo silvestre y las cepas mutantes únicas. Estos genes hacen una cepa más resistente a pH bajo, lo que es beneficioso para la producción de ácidos (4) o la producción de glucosamina (12), que no es estable a pH neutro y alto. La Figura 12 presenta el patrón de expresión genética de estos genes relacionados con la resistencia a ácidos e indica hasta 8 veces de aumento de la expresión en la cepa doble mutante.

30 Ejemplo 10: Producción discontinua de 2-fucosillactosa

Se construyó una cepa mutante por medio de metodologías de ingeniería genética descritas anteriormente con el genotipo siguiente:

$\Delta lacZYA::P22-lacY \Delta glgC \Delta agp \Delta pgi \Delta pfkA-P22-baSP \Delta pfkB \Delta arcA \Delta iclR::sl \Delta wcaJ \Delta lon \Delta adhE-P14-frk + pCXP14-FT_H.$
pylori (un vector con secuencia SEQ ID N° 1). Los promotores P22 y P14 proceden de la biblioteca de promotores construida por De Mey *et al.* (11) y se clonaron de forma similar a la metodología descrita por Aerts *et al.* (2). “::sl” marca una supresión de gen sin cicatrices, por tanto, sin un sitio FRT que permanece en el cromosoma.

Esta cepa se cultivó en un biorreactor como se describió en materiales y métodos, en el medio mineral con 30 g/l de sucrosa y 50 g/l de lactosa. Después de la fase por lotes, el biorreactor se alimentó con 500 g/l de sucrosa, 50 g/l de lactosa y 1 g/l de sulfato de magnesio heptahidratado. Esto condujo a la acumulación de 27,5 g/l de fucosillactosa en el sobrenadante.

SEQID N° 1: pCXP14-FT_ *H. pylori*

CGCGTTGGATGCAGGCATGCAAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCAGCC
TGATACAGATTAAATCAGAACGCAGAAGCGGTCTGATAAAACAGAATTTGCCTGGCGGCA
GTAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCCATGCCGAAGTCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGCCG
ATGGTAGTGTGGGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGGAAGTCCAGGCATCAAATAAAACGA
AAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTC
CTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCGGAGGG
TGGCGGGCAGGACGCCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCATCCTG
ACGGATGGCCTTTTTGCGTTTCTACAACTCTTTTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAA
ATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGA
AGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCC
TTCTGTTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGG
GTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTT
GCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTAT
TATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATG
ACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAG
AATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAA
CGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACACAACATGGGGGATCATGTAAGTC
GCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCA
CGATGCCTACAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACTC
TAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTC
TGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTG
GGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTA
TCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAG
GTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAGTGTGAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGA
TTGATTTAAACTTCATTTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATC
TCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAA
AGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAA
AAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTT
CGAAGGTAAGTGGCTTACAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGT
AGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCC
TGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGAC
GATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCA
GCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCG
CCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAG
GAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGGT
TTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTAT
GGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTTGCTGGCCTTTTTGCTC

Ejemplo 11: Producción discontinua de 2-fucosillactosa con un promotor híbrido de ácido colánico

Se construyó un promotor híbrido de ácido colánico basado en la información del genoma y las secuencias de la biblioteca de promotores descrita por De Mey et al (11).

Δ lacZYA::P22-lacY Δ glgC Δ agp Δ pgi Δ pfkA::P22-BaSP Δ pfkB Δ arcA Δ iclR::sl Δ wcaJ Δ lon Δ adhE-P14-frk Δ ldhA::P14-FT_ *H. pylori* Δ promCA:P14

Esta cepa se cultivó en un biorreactor como se describió en materiales y métodos, en el medio mineral con 30 g/l de sucrosa y 20 g/l de lactosa. Después de la fase por lotes, el biorreactor se alimentó con 500 g/l de sucrosa, 20 g/l de lactosa y 1 g/l de sulfato de magnesio heptahidratado. Esto condujo a la acumulación de 26 g/l de fucosillactosa en el sobrenadante con conversión prácticamente estequiométrica de lactosa. Aumentar las concentraciones de alimentación de lactosa conduce además a títulos de fucosillactosa finales aumentados y conversión estequiométrica de lactosa.

Referencias:

2006. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. R-Development Core Team, Vienna, Austria.

Aerts, D., T. Verhaeghe, M. De Mey, T. Desmet, and W. Soetaert. 2010. A constitutive expression system for high throughput screening. *Engineering in Life Sciences* 10:DOI: 10.1002/elsc.201000065.

Alper, H., C. Fischer, E. Nevoigt, and G. Stephanopoulos. 2005. Tuning genetic control through promoter engineering. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 102:12678-12683.

Beauprez, J. 2010. Metabolic modelling and engineering of *Escherichia coli* for succinate production. PhD. Ghent University, Ghent.

Bode, L. 2006. Recent Advances on Structure, Metabolism, and Function of Human Milk Oligosaccharides. *The Journal of Nutrition* 136:2127-2130.

Canton, B., A. Labno, and D. Endy. 2008. Refinement and standardization of synthetic biological parts and devices. *Nat Biotech* 26:787-793.

Cavallaro, G., L. Maniscalco, P. Caliceti, S. Salmaso, A. Semenzato, and G. Giammona. 2004. Glycosylated Macromolecular Conjugates of Antiviral Drugs with a Polyaspartamide. *Journal of Drug Targeting* 12:593-605.

Coppa, G. V., L. Zampini, T. Galeazzi, and O. Gabrielli. 2006. Prebiotics in human milk: a review. *Digestive and Liver Disease* 38:S291-S294.

Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 97:6640-6645.

De Mey, M., G. J. Lequeux, J. J. Beauprez, J. Maertens, E. Van Horen, W. K. Soetaert, P. A. Vanrolleghem, and E. J. Vandamme. 2007. Comparison of different strategies to reduce acetate formation in *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*.

De Mey, M., J. Maertens, G. J. Lequeux, W. K. Soetaert, and E. J. Vandamme. 2007. Construction and model-based analysis of a promoter library for *E. coli*: an indispensable tool for metabolic engineering. *BMC Biotechnology* 7:34-48.

Deng, M.-D., D. K. Severson, A. D. Grund, S. L. Wassink, R. P. Burlingame, A. Berry, J. A. Running, C. A. Kunesh, L. Song, T. A. Jerrell, and R. A. Rosson. 2005. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for industrial production of glucosamine and N-acetylglucosamine. *Metabolic Engineering* 7:201-214.

Ebel, W., and J. E. Trempy. 1999. *Escherichia coli* RcsA, a Positive Activator of Colanic Acid Capsular Polysaccharide Synthesis, Functions To Activate Its Own Expression. *Journal of bacteriology* 181:577-584.

Foster, J. W. 2004. *Escherichia coli* acid resistance: Tales of an amateur acidophile. *Nature Reviews Microbiology* 2:898-907.

Hammer, K., I. Mijakovic, and P. R. Jensen. 2006. Synthetic promoter libraries - tuning of gene expression. *TRENDS in Biotechnology* 24:53-55.

Hanahan, D., J. Jessee, and F. R. Bloom. 1991. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods in Enzymology* 204:63-113.

Hommais, F., E. Krin, J.-Y. Coppée, C. Lacroix, E. Yeramian, A. Danchin, and P. Bertin. 2004. GadE (YhiE): a novel activator involved in the response to acid environment in *Escherichia coli*. *Microbiology* 150:61-72.

Jigami, Y. 2008. Yeast Glycobiology and Its Application. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 72:637-648.

Keasling, J. D. 1999. Gene-expression tools for the metabolic engineering of bacteria. Trends in Biotechnology 17:452-460.

Lequeux, G. 2008. Metabolic modelling and analysis for the optimization of *Escherichia coli* as a production host. Ghent University, Ghent.

Lequeux, G., L. Johansson, J. Maertens, P. Vanrolleghem, and G. Liden. 2005. Metabolic flux analysis of C- and P-limited shikimic acid producing *E. coli*. Journal of Biotechnology 118:S121-S121.

Masuda, N., and G. M. Church. 2003. Regulatory network of acid resistance genes in *Escherichia coli*. Molecular Microbiology 48:699-712.

Pattyn, F., F. Speleman, A. De Paepe, and J. Vandesompele. 2003. RTPrimerDB: The Real-Time PCR primer and probe database. Nucleic Acids Research 31:122-123.

Perrenoud, A., and U. Sauer. 2005. Impact of global transcriptional regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, and Mlc on glucose catabolism in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 187:3171-3179.

Ritz, C., and A.-N. Spiess. 2008. qpcR: an R package for sigmoidal model selection in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis. Bioinformatics 24:1549-1551.

Salis, H. M., E. A. Mirsky, and C. A. Voigt. 2009. Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression. Nat Biotech 27:946-950.

Seed, B., and J. Holgersson. 1999. Fucosyltransferase genes and uses thereof patent US5858752.

Shalel-Levanon, S., K. Y. San, and G. N. Bennett. 2005. Effect of ArcA and FNR on the expression of genes related to the oxygen regulation and glycolysis pathway in *Escherichia coli* under growth conditions. Biotechnology and Bioengineering 92:147-159.

Shalel-Levanon, S., K. Y. San, and G. N. Bennett. 2005. Effect of oxygen on the *Escherichia coli* ArcA and FNR regulation systems and metabolic responses. Biotechnology and Bioengineering 89:556-564.

Smith, S., A. D. Elbein, and Y. T. Pan. 1999. Inhibition of Pathogenic Bacterial Binding by High Mannose Oligosaccharides patent US5939279.

Smyth, G. K. 2005. limma: Linear models for microarray data, p. 397-420. In R. Gentleman, V. Carey, W. Huber, R. A. Irizarry, and S. Dudoit (ed.), Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor. Springer.

Smyth, G. K. 2004. Linear Models and Empirical Bayes Methods for Assessing Differential Expression in Microarray Experiments. Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology 3:3.

Smyth, G. K., and T. Speed. 2003. Normalization of cDNA microarray data. Methods 31:265-273.

Spiess, A.-N., C. Feig, and C. Ritz. 2008. Highly accurate sigmoidal fitting of real-time PCR data by introducing a parameter for asymmetry. BMC Bioinformatics 9:221.

Stevenson, G., K. Andrianopoulos, M. Hobbs, and P. R. Reeves. 1996. Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. Journal of Bacteriology 178:4885-4893.

Stout, V., A. Torres-Cabassa, M. R. Maurizi, D. Gutnick, and S. Gottesman. 1991. RcsA, an unstable positive regulator of capsular polysaccharide synthesis. Journal of bacteriology 173:1738-1747.

Sunnarborg, A., D. Klumpp, T. Chung, and D. C. Laporte. 1990. Regulation of the glyoxylate bypass operon: cloning and characterization of IclR. Journal of Bacteriology 172:2642-2649.

Waegeman, H. J., J. Beauprez, H. Moens, J. Maertens, M. De Mey, M. R. Foulquie-Moreno, J. J. Heijnen, D. Charlier, and W. Soetaert. 2010. Effect of *iclR* and *arcA* knockouts on biomass formation and metabolic fluxes in *Escherichia coli* K12 and its implications on understanding the metabolism of *Escherichia coli* BL21 (DE3). BMC microbiology 11:1-17.

Waegeman, H. J., J. Beauprez, H. Moens, J. Maertens, M. De Mey, M. R. Foulquie-Moreno, J. J. Heijnen, D. Charlier, and W. Soetaert. 2011. Effect of *iclR* and *arcA* knockouts on biomass formation and metabolic fluxes in *Escherichia coli* K12 and its implications on understanding the metabolism of *Escherichia coli* BL21 (DE3). BMC microbiology 11:1-17.

Warnecke, T., and R. T. Gill. 2005. Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining

applications. Microbial Cell Factories 4.

Listado de secuencias

<110> UNIVERSITEIT GENT

<120> Microorganismos mutantes para sintetizar oligosacáridos colánicos, manosilados y / o fucosilados.

<130> UG-061-PCT

<150> EP11194103.5

<151> 2011-12-16

<160> 90

<170> Patente en versión 3.3

<210> 1

<211> 3638

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Vector

<400> 1

cgcggttgat	gcaggcatgc	aagcttggct	gttttggcgg	atgagagaag	attttcagcc	60
tgatacagat	taaatacagaa	cgcagaagcg	gtctgataaa	acagaatttg	cctggcgcca	120
gtagcgcggt	ggtcccacct	gaccccatgc	cgaactcaga	agtgaacgc	cgtagcgccg	180
atggtagtgt	ggggtctccc	catgcgagag	tagggaactg	ccaggcatca	aataaaacga	240
aaggctcagt	cgaaagactg	ggcctttcgt	tttatctgtt	gtttgtcgg	gaacgctctc	300
ctgagtagga	caaataccgcc	gggagcggat	ttgaacgttg	cgaagcaacg	gcccggaggg	360
tggcgggcag	gacgcccgcc	ataaactgcc	agggcatcaaa	ttaagcagaa	ggccatcctg	420
acggatggcc	tttttgcgtt	tctacaaaact	ctttttgttt	atttttctaa	atacattcaa	480
atatgtatcc	gctcatgaga	caataaccct	gataaatgct	tcaataatat	tgaaaaagga	540
agagtatgag	tattcaacat	ttccgtgtcg	cccttattcc	cttttttgcg	gcattttgcc	600
ttcctgtttt	tgctcaccga	gaaacgctgg	tgaagtaaa	agatgctgaa	gatcagttgg	660
gtgcacgagt	gggttacatc	gaactggatc	tcaacagcgg	taagatcctt	gagagttttc	720
gccccgaaga	acgtttttcca	atgatgagca	cttttaaagt	tctgctatgt	ggcgcggtat	780
tatcccgtgt	tgacgcccgg	caagagcaac	tcggtgcgg	catacactat	tctcagaatg	840
acttggttga	gtactcacca	gtcacagaaa	agcatcttac	ggatggcatg	acagtaagag	900
aattatgcag	tgctgccata	accatgagtg	ataaactg	ggccaactta	cttctgacaa	960
cgatcgagg	accgaaggag	ctaaccgctt	ttttgcacaa	catgggggat	catgtaactc	1020
gccttgatcg	ttgggaaccg	gagctgaatg	aagccatacc	aaacgacgag	cgtgacacca	1080
cgatgcctac	agcaatggca	acaacgttgc	gcaaactatt	aactggcgaa	ctacttactc	1140

ES 2 733 307 T3

tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcgga taaagttgca ggaccacttc	1200
tgcgctcggc ccttcgggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg	1260
ggctctcggc tatcattgca gcaactgggc cagatggtaa gccctcccgat atcgtagtta	1320
tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag	1380
gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga	1440
ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc	1500
tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa	1560
agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgctggt aatctgctgc ttgcaaacaa	1620
aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca actctttttc	1680
cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt	1740
agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgtc ctgctaattcc	1800
tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac	1860
gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca	1920
gcttgagcgc aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg	1980
ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggg aagcggcagg gtcggaacag	2040
gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt	2100
ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat	2160
ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg ccttttgctc	2220
acatgttctt tctcgcgtta tcccctgatt ctgtggataa ccgtattacc gcctttgagt	2280
gagctgatac cgctcgccgc agccgaacga ccgagcgcag cgagtcagtg agcgaggaag	2340
cggaaagagcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcacct gtgcgggtatt tcacaccgca	2400
tatggtgcac tctcagtaca atctgctctg atgccgcata gttaagccag tatacactcc	2460
gctatcgcta cgtgactggg tcatggctgc gccccgacac ccgccaacac ccgctgacgc	2520
gccctgacgg gcttgtctgc tcccggcatc cgcttacaga caagctgtga ccgtctccgg	2580
gagagctcga tatcccgggc ggccgccttc attctataag tttcttgaca tcttggccgg	2640
catatggtat aatagggaaa tttccatggc ggccgctcta gaagaagctt gggatccgtc	2700
gacctcgaat tcggaggaaa caaagatggc ctttaaagtt gttcagattt gtggtggtct	2760
gggcaatcag atgtttcagt atgcatttgc aaaaagcctg cagaaacata gcaatacacc	2820
ggttctgctg gatattacca gctttgattg gagcaatcgt aaaatgcagc tggaaactgtt	2880
tccgattgat ctgccgtatg caagcgaaaa agaaattgca attgccaaaa tgcagcatct	2940
gccgaaactg gttcgtaatg ttctgaaatg catgggtttt gatcgtgtga gccaaagaaat	3000
cgtgtttgaa tatgaaccga aactgctgaa aaccagccgt ctgacctatt tttatggcta	3060

ES 2 733 307 T3

```

ttttcaggat cgcggttatt ttgatgcaat tagtccgctg atcaaacaga cctttaccct 3120
gcctccgcct ccggaaaatg gtaataacaa aaaaaaagaa gaagagtatc atcgtaaact 3180
ggcactgatt ctggcagcaa aaaatagcgt gtttgtgcat attcgtcgcy gtgattatgt 3240
tggtattggt tgtcagctgg gcacgatta tcagaaaaaa gcaactggaat acatggcaaa 3300
acgtgttccg aatatggaac tgtttgtgtt ttgcgaggac ctggaattta cccagaatct 3360
ggatctgggc tatccgttta tggatatgac caccctgat aaagaggaag aggcattattg 3420
ggatatgctg ctgatgcaga gctgtaaaca tggattattt gccaacagca cctatagtgt 3480
gtgggcagca tatctgatta ataaccgga aaaaatcatt attggtccga aacattggct 3540
gtttggccat gaaaacatcc tgtgtaaaga atgggtgaaa atcgaaagcc actttgaagt 3600
gaaaagccag aaatataatg cctaataaga gctcccaa 3638

```

<210> 2
 <211> 4311
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> plásmido

```

<400> 2
aattcggagg aaacaaagat ggggggttct catcatcatc atcatcatgg tatggctagc 60
atgaaaaaca aggtgcagct catcacttac gccgaccgcc ttggcgacgg caccatcaag 120
tcgatgaccg acattctgcy caccgccttc gacggcgtgt acgacggcgt tcacatcctg 180
ccgttcttca ccccgttcga cggcgccgac gcaggcttcg acccgatcga ccacaccaag 240
gtcgacgaac gtctcggcag ctgggacgac gtcgccgaac tctccaagac ccacaacatc 300
atggtcgacg ccatcgtcaa ccacatgagt tgggaatcca agcagttcca ggacgtgctg 360
gccaaggcgg aggagtccga atactatccg atgttcctca ccatgagctc cgtgttcccg 420
aacggcgcca ccgaagagga cctggccggc atctaccgtc cgcgtccggg cctgccgttc 480
accactaca agttcgccgg caagaccgc ctcgtgtggg tcagcttcac cccgcagcag 540
gtggacatcg acaccgatc cgacaagggt tgggaatacc tcatgtcgat tttcgaccag 600
atggccgcct ctcaagtcag ctacatccgc ctcgacgccg tcggctatgg cgccaaggaa 660
gccggcacca gctgcttcat gacccggaag accttaagc tgatctcccg tctgcgtgag 720
gaaggcgtca agcgggtctt ggaaatcctc atcgaagtgc actcctacta caagaagcag 780
gtcgaaatcg catccaaggt ggaccgcgtc tacgacttcg ccctgcctcc gctgctgctg 840
cacgcgctga gcaccggcca cgtcgagccc gtcgccact ggaccgacat acgcccgaac 900
aacgccgtca ccgtgctcga tacgcacgac ggcatcggcg tgatcgacat cggctccgac 960

```

ES 2 733 307 T3

cagctcgacc gctcgtctcaa gggctctcgtg ccggatgagg acgtggacaa cctcgtcaac 1020
 accatccacg ccaacaccca cggcgaatcc caggcagcca ctggcgccgc cgcattcaat 1080
 ctcgacctct accaggtcaa cagcacctac tattcggcgc tcgggtgcaa cgaccagcac 1140
 tacatcgccg cccgcgcggg gcagttcttc ctgccgggcg tgcgcgaagt ctactacgtc 1200
 ggcgcgctcg ccggcaagaa cgacatggag ctgctgcgta agacgaataa cggccgcgac 1260
 atcaatcgcc attactactc caccgcggaa atcgacgaga acctcaagcg tccggtcgtc 1320
 aaggccctga acgcgtcgc caagtctcgc aacgagctcg acgcgttcga cggcacgttc 1380
 tcgtacacca ccgatgacga cactccatc agcttcacct ggcgcgccga aaccagccag 1440
 gccacgctga cgttcgagcc gaagcgcggg ctgggtgtgg acaacgctac gccggtcggc 1500
 atgttggaat gggaggattc cgcgggagac caccgttcgg atgatctgat cgccaatccg 1560
 cctgtcgtcg cctgactgca ggtcgaccat atgggagagc tcccaacgcg ttggatgcag 1620
 gcatgcaagc ttggctgttt tggcggatga gagaagattt tcagcctgat acagattaaa 1680
 tcagaacgca gaagcgggtc gataaaacag aatttgcctg gcggcagtag cgcggtggtc 1740
 ccacctgacc ccatgccgaa ctcaagaagt aaacgccgta gcgccgatgg tagtgtgggg 1800
 tctcccatg cgagagtagg gaactgccag gcatcaaata aaacgaaagg ctgagtcgaa 1860
 agactgggccc tttcgtttta tctgttgttt gtccgtgaac gctctcctga gtaggacaaa 1920
 tccgcgggga gcggatttga acgttcgcaa gcaacggccc ggagggtggc gggcaggacg 1980
 cccgccataa actgccaggc atcaaattaa gcagaaggcc atcctgacgg atggcctttt 2040
 tgcgtttcta caaactcttt ttgtttattt ttctaaatac attcaaatat gtatccgctc 2100
 atgagacaat aacctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt 2160
 caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct 2220
 caccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt 2280
 tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt 2340
 tttccaatga tgagcacttt taaagtctg ctatgtggcg cggattatc ccgtgttgac 2400
 gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata cactattctc agaatgactt ggttgagtac 2460
 tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcattgacag taagagaatt atgcagtgtc 2520
 gccataacca tgagtataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg 2580
 aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcggttg 2640
 gaaccggagc tgaatgaagc catacctaac gacgagcgtg acaccacgat gcctacagca 2700
 atggcaacaa cgttcgcgaa actattaact ggcgaactac ttactctagc tttccggcaa 2760
 caattaatag actggtatga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcgccctt 2820
 ccggtcggct ggtttattgc tgataaatct ggagccgggt agcgtgggtc tcgcggtatc 2880

ES 2 733 307 T3

attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tcccgatcg tagttatcta cacgacgggg 2940
 agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctactgatt 3000
 aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt 3060
 catttttaat ttaaaaggat ctaggtgaag atcctttttg ataatctcat gaccaaaatc 3120
 ccttaacgtg agtttttcgtt ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct 3180
 tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta 3240
 ccagcggtgg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc 3300
 ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac 3360
 ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctgctctgct taatcctgtt accagtggct 3420
 gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttgact caagacgata gttaccggat 3480
 aaggcgagc ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac agcccgctt ggagcgaacg 3540
 acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gcttcccgaa 3600
 gggagaaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg 3660
 gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga 3720
 cttgagcgtc gatTTTTgtg atgctcgtca gggggcgga gcctatggaa aaacgccagc 3780
 aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct 3840
 gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt attaccgcct ttgagtgagc tgataccgct 3900
 cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag tcagtgagcg aggaagcgga agagcgctg 3960
 atgcggtatt ttctccttac gcatctgtgc ggtatttcac accgcatatg gtgcactctc 4020
 agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta agccagtata cactccgcta tcgctacgtg 4080
 actgggtcat ggctgcgccc cgacacccgc caacacccgc tgacgcgccc tgacgggctt 4140
 gtctgctccc ggcatccgct tacagacaag ctgtgaccgt ctccgggaga gctcgatata 4200
 ccgggcgggc gcttcattta taaatttctt gacatttttg aatagatgtg atataatgtg 4260
 tacatatcca tggcgggcgc tctagaagaa gcttgggatc cgtcgacctc g 4311

<210> 3
 <211> 340
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Promotor

<400> 3
 tgtttattta tcactttggc agagtaatta tcctgtgcac tattaatagc aatgtcgcca 60
 tgcacattta ccttgcagtt aattgaataa aaatttaact ggcatcagtc ctaaaaaat 120
 tgatttcata cgcaggctat tgacagaata attcagactg gtctttcagg catccagaca 180
 cgctaccgcc cctgggcttt tagctaccaa tacactgatt tagtttaatt tttcacaccc 240
 tctcagcatg cagtcgttga tgagaaaggg ttattacgga aattaacttc cgaatataag 300
 gtgacattat ggtaattgaa tattggcttt ccaataatgc 340

<210> 4

ES 2 733 307 T3

	<211> 101	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Promotor	
	<400> 4	
	cgaggtcgac ggatcccaag cttcttctag agcggccgcc atggaaattt ccctattata	60
10	ccatatgccg gccaagatgt caagaaactt atagaatgaa g	101
	<210> 5	
	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Promotor	
	<400> 5	
20	taagtgtcat tcaatatggg ttttaggagt ttcttaggt tgac 44	
	<210> 6	
	<211> 485	
	<212> ADN	
25	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Promotor	
30	<400> 6	
	tgtttattta tcactttggc agagtaatta tcctgtgcac tattaatagc aatgtcgcca	60
	tgcacattta ccttgcagtt aattgaataa aaatttaact ggcatcagtc ctaaaaaat	120
	tgatttcac cgcaggctat tgacagaata attcagactg gtctttcagg catccagaca	180
	cgctaccgcc cctggctttt tagctaccaa tacactgatt tagtttaatt ttccacaccc	240
	tctcagcatg cagtcgttga tgagaaaggg ttattacgga aattaacttc cgaatataag	300
	gtgacattat ggtaattgaa tattggcttt ccaataatgc cgaggtcgac ggatcccaag	360
	cttcttctag agcggccgcc atggaaattt ccctattata ccatatgccg gccaagatgt	420
	caagaaactt atagaatgaa gtaagtgtca ttcaatatgg tttttaggag tttctttagg	480
	ttgac	485
	<210> 7	
	<211> 74	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Cebador	
40	<400> 7	
	cataatggat ttccttacgc gaaatacggg cagacatggc ctgcccgtt attagtgtag	60
	gctggagctg cttc	74
	<210> 8	
	<211> 71	
	<212> ADN	
45	<213> secuencia artificial	

ES 2 733 307 T3

	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 8		
	gtatgttggtg ttgaattgtg agcggataac aatttcacac aggaaacagc tcatatgaat	60	
5	atcctcctta g	71	
	<210> 9		
	<211> 18		
	<212> ADN		
10	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
15	<400> 9		
	gcggttgga taatagcg 18		
	<210> 10		
	<211> 20		
20	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
25	<400> 10		
	caggttccc gactgaaag 20		
	<210> 11		
	<211> 75		
30	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> Cebador		
	<400> 11		
	agaccgccgg ttttaagcag cgggaacatc tctgaacata catgtaaaac ctgcagtgtg	60	
40	ggctggagct gcttc	75	
	<210> 12		
	<211> 82		
	<212> ADN		
45	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
50	<400> 12		
	gtctggcagg gacctgcaca cggattgtgt gtgttcaga gatgataaaa aaggagttag	60	
	tccatatgaa taccctcctt ag	82	
	<210> 13		
	<211> 21		
	<212> ADN		
55	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
60	<400> 13		
	gcgaatatcg ggaaatgcag g 21		

5 <210> 14
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 10 <400> 14
 cagagattgt ttacctgct gg 22

 15 <210> 15
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Cebador

 <400> 15
 catatctctg tcacactctt tagtgattga taacaaaaga ggtgccagga gtgtaggctg 60

 gagctgcttc 70

 25 <210> 16
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Cebador

 <400> 16
 taaaaacggt taaccagcga ctccccgct tctcgcgggg gagttttctg catatgaata 60

 tcttccttag 70

 35 <210> 17
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Cebador

 <400> 17
 gccacaggtg caattatc 18

 45 <210> 18
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Cebador

 <400> 18
 catttcgaa gtcgcccggg acg 23

 55 <210> 19
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 60 <220>

ES 2 733 307 T3

<223> Cebador

<400> 19

ggcgcgtacaa tcttccaaag tcacaattct caaaatcaga agagtattgc gtgtaggctg 60

gagctgcttc 70

5

<210> 20

<211> 70

<212> ADN

<213> secuencia artificial

10

<220>

<223> Cebador

<400> 20

ggttgccgga tgcggcgtga acgccttata cggcctacat atcgacgatg catatgaata 60

tcttccttag 70

15

<210> 21

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

20

<220>

<223> Cebador

<400> 21

ggctcctcca acaccgttac 20

<210> 22

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

30

<220>

<223> Cebador

<400> 22

tacatatcgg catcgacctg 20

<210> 23

<211> 19

<212> ADN

<213> secuencia artificial

40

<220>

<223> Cebador

<400> 23

taccgccatt tggcctgac 19

<210> 24

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

50

<220>

<223> Cebador

<400> 24

aaagtgcgt ttgtcatgc 20

<210> 25

<211> 69

60

ES 2 733 307 T3

	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 25	
	gacttccggc aacagatttc attttgcatt ccaaagttca gaggtagtcg tgtaggctgg	60
	agctgcttc	69
10	<210> 26	
	<211> 69	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 26	
	gcttctgtca tcggtttcag ggtaaaggaa tctgcctttt tccgaaatcc atatgaatat	60
	cctccttag	69
20	<210> 27	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 27	
30	tagcgtccct ggaaaggtaa c 21	
	<210> 28	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
40	<400> 28	
	tccctcatca tccgtcatag 20	
	<210> 29	
	<211> 71	
45	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
50	<400> 29	
	cactttccgc tgattcgggtg ccagactgaa atcagcctat aggaggaaat ggtgtaggct	60
	ggagctgctt c	71
	<210> 30	
55	<211> 70	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Cebador	

ES 2 733 307 T3

	<400> 30 gttgccgaca ggttggtgat gattcccca atgctggggg aatgtttttg catatgaata	60
	tcctccttag	70
5	<210> 31 <211> 79 <212> ADN <213> secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador	
	<400> 31 ggttgaaaaa taaaaacggc gctaaaaagc gccgtttttt ttgacggtgg taaagccgag	60
15	tgtaggctgg agctgcttc	79
20	<210> 32 <211> 76 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador	
	<400> 32 ggtcaggac ttttgtactt cctgtttcga ttagttggc aatttaggta gcaaaccata	60
25	tgaatatacct ccttag	76
30	<210> 33 <211> 22 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador	
35	<400> 33 ctgccgaaaa tgaaagccag ta 22	
40	<210> 34 <211> 22 <212> ADN <213> secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador	
45	<400> 34 ggaaagtgc tcaagaacgc aa 22	
50	<210> 35 <211> 71 <212> ADN <213> secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador	
	<400> 35 ttgccactca ggtatgatgg gcagaatatt gcctctgcc gccagaaaaa ggtgtaggct	60
	ggagctgctt c	71

ES 2 733 307 T3

	<210> 36	
	<211> 77	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 36	
	gttcaacatt aactcatcgg atcagttcag taactattgc attagctaac aataaaacat	60
10	atgaatatcc tccttag	77
	<210> 37	
	<211> 21	
	<212> ADN	
15	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
20	<400> 37	
	cgggtggaatg agatcttgcg a 21	
	<210> 38	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
30	<400> 38	
	acttgctccc gacagctca 20	
	<210> 39	
35	<211> 71	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Cebador	
	<400> 39	
	ttgccactca ggtatgatgg gcagaatatt gcctctgccc gccagaaaa gccgcttaca	60
	gacaagctgt g	71
45	<210> 40	
	<211> 77	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 40	
	gttcaacatt aactcatcgg atcagttcag taactattgc attagctaac aataaaaagc	60
55	catgaccggg gaattac	77
	<210> 41	
	<211> 44	
60	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	

ES 2 733 307 T3

<220>
 <223> Cebador

5 <400> 41
 ctattgcatt agctaacaat aaaactttt ctggcgggca gagg 44

10 <210> 42
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador

15 <400> 42
 cctctgcccg ccagaaaaag tttattgtt agctaataca atagttac 48

20 <210> 43
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cebador

25 <400> 43
 gccagcgcga taatcaccag 20

30 <210> 44
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

35 <220>
 <223> Cebador

35 <400> 44
 tgcgcctgaa tgtggaatc 19

40 <210> 45
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador

45 <400> 45
 ttttgatatc gaaccagacg ctccattcgc ggatgtactc aaggtcgaac gtgtaggctg 60

50 gagctgcttc 70

50 <210> 46
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

55 <220>
 <223> Cebador

55 <400> 46
 tctatggtgc aacgcttttc agatatcacc atcatgtttg ccggactatg catatgaata 60

60 tcctccttag 70

<210> 47

	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 47		
	tcaatatgcc gctttgttaa cgaaaccttt gaacaccgtc aggaaaacga ttttgatatac	60	
	gaaccagacg	70	
10	<210> 48		
	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador		
	<400> 48		
	tgacaaatct aaaaaagcgc gagcgagcga aaaccaatgc atcgtaaatac tctatggtgc	60	
20	aacgcttttc	70	
	<210> 49		
	<211> 70		
	<212> ADN		
25	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
30	<400> 49		
	cgctttgtta acgaaacctt tgaacaccgt caggaaaacg attttgatat cgaaccagac	60	
	gctccattcg	70	
	<210> 50		
	<211> 70		
35	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
40	<400> 50		
	cagtcgtgtc atctgattac ctggcggaat ttaactaag agagagctct gtgtaggctg	60	
	gagctgcttc	70	
	<210> 51		
45	<211> 70		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
50	<223> Cebador		
	<400> 51		
	cgaattagcc tgccagccct gtttttatta gtgcattttg cgcgagggtca catatgaata	60	
	tcctccttag	70	
55	<210> 52		
	<211> 20		
	<212> ADN		

<213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 5
 <400> 52
 agcgcaacag gcacatgggtg 20
 <210> 53
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador
 <400> 53
 tatatcaggc cagccatccc 20
 20 <210> 54
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador
 <400> 54
 gctgaacttg taggcctgat aagcgacgag tatcaggcaa tttttataat cttcatttaa 60
 atggcgcgcg 69
 30 <210> 55
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador
 <400> 55
 gcgcaacgca attaatgtga gttagctcac tcattaggca ccccaggctt cgcctacctg 60
 40 tgacggaag 69
 <210> 56
 <211> 70
 <212> ADN
 45 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 56
 gcgcaacgca attaatgtga gttagctcac tcattaggca ccccaggctt gtgtaggctg 60
 gagctgcttc 70
 <210> 57
 <211> 70
 55 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Cebador

ES 2 733 307 T3

	<400> 57	
	gctgaacttg taggcctgat aagcgcagcg tatcaggcaa tttttataat cttaagcgac	60
	ttcattcacc	70
5	<210> 58 <211> 68 <212> ADN <213> secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador	
	<400> 58	
	cgacgcttgc tcctgcgctt tgttcacgcc ggatgaggct aatgtagatc gctgaacttg	60
	taggcctg	68
15	<210> 59 <211> 69 <212> ADN <213> secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador	
	<400> 59	
	cattaatgca gctggcacga cagggttccc gactggaaag cgggcagtga gcgcaacgca	60
25	attaatgtg	69
	<210> 60 <211> 69 <212> ADN <213> secuencia artificial	
30	<220> <223> Cebador	
	<400> 60	
	gacttcgggc aacagatttc attttgcatt ccaaagttca gaggtagtcg tgtaggctgg	60
35	agctgcttc	69
	<210> 61 <211> 69 <212> ADN <213> secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador	
45	<400> 61	
	gcttctgtca tcggtttcag ggtaaaggaa tctgcctttt tccgaaatca agcttgcacg	60
	cctgcatcc	69
50	<210> 62 <211> 20 <212> ADN <213> secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador	
	<400> 62	
	agaggctatt cggctatgac 20	

ES 2 733 307 T3

<210> 63
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 10 <400> 63
 cgccatgttg gaatggagg 20

 <210> 64
 <211> 70
 15 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 20
 <400> 64
 tgattgttat actatttgca cattcgttgg atcacttcga tgtgcaagaa gacttccggc 60

 aacagatttc 70

 <210> 65
 <211> 70
 25 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 30
 <400> 65
 aattgcagaa ttcatgtagg cctgataagc gaagcgcac aggcattttt gcttctgtca 60

 tcggtttcag 70

 <210> 66
 <211> 19
 35 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 40
 <400> 66
 taccgccatt tggcctgac 19
 45
 <210> 67
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 67
 55 aaagtgcgct ttgtccatgc 20

 <210> 68
 <211> 70
 <212> ADN
 60 <213> secuencia artificial

 <220>

ES 2 733 307 T3

	<223> Cebador	
	<400> 68	
	atcggcattg cccagaagg ggcgtttatg ttgccagaca gcgctactga gtgtaggctg	60
5	gagctgcttc	70
	<210> 69	
	<211> 70	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 69	
	attcgagcag atgatttact aaaaaagttt aacattatca ggagagcatt aagcttgcac	60
15	gcctgcatcc	70
	<210> 70	
	<211> 68	
	<212> ADN	
20	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
25	<400> 70	
	aagccgttat agtgcctcag ttttaaggatc ggtcaactaa tccttaactg atcggcattg	60
	cccagaag	68
	<210> 71	
	<211> 77	
30	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
35	<400> 71	
	ttgattttca taggttaagc aaatcatcac cgcactgact atactctcgt attcgagcag	60
	atgatttact aaaaaag	77
	<210> 72	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Cebador	
	<400> 72	
	gcgtcaggca gtgtgtatc 20	
50	<210> 73	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 73	
	ctggaagtga cgcattagag 20	

5 <210> 74
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 10 <400> 74
 tgtcattact tacacatccc gc 22

 15 <210> 75
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 20 <400> 75
 gcattcaata cgggtattgt gg 22

 25 <210> 76
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Cebador

 <400> 76
 cattggggat tatctgaatc agctcccctg gaatgcaggg gagcggcaag gtgtaggctg 60

 gagctgcttc 70

 35 <210> 77
 <211> 70
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Cebador

 <400> 77
 tatttttagt agcttaaagt tgattcaaca tcaactggaga aagtcttatg aagcttgcat 60

 gcctgcatcc 70

 45 <210> 78
 <211> 72
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Cebador

 <400> 78
 caattacagt ttctgactca ggactatddd aagaatagag gatgaaaggt cattggggat 60

 tatctgaatc ag 72

 60 <210> 79
 <211> 80
 <212> ADN

ES 2 733 307 T3

<213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 5
 <400> 79
 gaatttttca atatogccat agcttttcaat taaatttgaa attttgtaaa atatttttag 60
 tagcttaaatt gtgattcaac 80
 <210> 80
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Cebador
 <400> 80
 ttcaccgcta aagcggttac 20
 20 <210> 81
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Cebador
 <400> 81
 cgcgtaatgc gtgggcttc 20
 30 <210> 82
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador
 <400> 82
 40 ccggcatatg gtataatagg g 21
 <210> 83
 <211> 18
 <212> ADN
 45 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 50 <400> 83
 acggcttgct ggccatca 18
 <210> 84
 <211> 68
 55 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 60 <400> 84
 cgaatataag gtgacattat ggtaattgaa tattggcttt ccaataatgc tacggcccca 60
 aggtccaa 68

ES 2 733 307 T3

<210> 85
 <211> 70
 <212> ADN
 5 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 10 <400> 85
 aatattgtca acctaaagaa actcctaaaa accatattga atgacactta ttggcttcag 60

 ggatgaggcg 70

 <210> 86
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 20

 <400> 86
 tcccgactac gtggacctg 20

 <210> 87
 <211> 90
 25 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 30

 <400> 87
 catatggtat aatagggaaa tttccatggc ggccgctcta gaagaagctt gggatccgtc 60

 gacctcggca ttattggaaa gccaatattc 90

 35 <210> 88
 <211> 86
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 40

 <400> 88
 gccgcatgg aaatttccct attataccat atgccggcca agatgtcaag aaacttatag 60

 aatgaagtaa gtgtcattca atatgg 86
 45

 <210> 89
 <211> 73
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 50

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 89
 aatattgtca acctaaagaa actcctaaaa accatattga atgacactta cttcattcta 60
 55 taagtttctt gac 73

 <210> 90
 <211> 74
 <212> ADN

ES 2 733 307 T3

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

5

<400> 90

cgaatataag gtgacattat ggtaattgaa tattggcttt ccaataatgc cgaggtcgac 60

ggatcccaag cttc 74

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para regular al alza al menos uno de los genes del operón del ácido colánico en una bacteria en comparación con la expresión de dichos genes dentro de una bacteria de tipo silvestre correspondiente, comprendiendo el método generar la disrupción de los genes codificantes de los reguladores transcripcionales, la proteína de control de la respiración aeróbica ArcA y el regulador de la isocitrato liasa IclR, en donde dicho operón comprende los genes *cpsG*, *cpsB*, *gmd* y *fcl* que codifican una fosfomanomutasa, una manosa-1-fosfato guanililtransferasa, GDP-manosa 4,6-deshidratasa y GDP-fucosa sintasa, respectivamente.
- 10 2. El método según la reivindicación 1, en donde dicha regulación al alza al alza de al menos uno de los genes del operón del ácido colánico está precedida por la regulación al alza del regulador transcripcional de dicho operón del ácido colánico *rcaA*.
3. El método según las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho microorganismo es una cepa de *Escherichia coli*, en donde dicha cepa de *E. coli* es específicamente una cepa K12 o, en donde dicha cepa K12 es más específicamente *E. coli* MG1655.
- 15 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde al menos uno de los genes del operón del ácido colánico es regulado al alza 6 a 8 veces en comparación con la expresión del operón del ácido colánico en la bacteria de tipo silvestre correspondiente.
- 20 5. Un procedimiento para la síntesis de ácido colánico y/o GDP-fucosa y/u oligosacáridos fucosilados en una bacteria, que comprende: generar la disrupción de los genes codificantes de los reguladores transcripcionales, la proteína de control de la respiración aeróbica ArcA y el regulador de la isocitrato liasa IclR, en dicha bacteria para regular al alza al menos uno de los genes del operón del ácido colánico, en donde dicho operón comprende los genes *cpsG*, *cpsB*, *gmd* y *fcl*.
- 25 6. El procedimiento según la reivindicación 5, en donde una mutación que mejora la producción de compuestos fucosilados se selecciona del grupo que consiste en: la supresión del gen *wcaJ*; desactivación de los genes del operón del ácido colánico *gmm*, *wcaA*, *wcaB*, *wcaC*, *wcaD*, *wcaE*, *wcaF*, *weal*, *wcaJ*, *wcaK*, *wcaL*, *wzx*, *wza*, *wzb*, *wzc* y/o *wcaM*; desactivación de *lacZ*; introducción de una sucrosa fosforilasa o invertasa; desactivación de los genes *pgi*, *pfkA* y *pfkB*; desactivación del gen *lon*; introducción de una fucosiltransferasa y/o una lactosa permeasa; o combinaciones de las mismas.
- 30 7. El procedimiento según la reivindicación 5, para la síntesis de GDP-manosa y/o para la síntesis de oligosacáridos manosilados.
8. El procedimiento según la reivindicación 7, en donde se regulan al alza los genes *cpsG* y *cpsB* del operón del ácido colánico y en donde:
 - a) se suprime el gen *gmd* del operón del ácido colánico, y/o
 - b) en donde se suprime el gen *gmm*, y/o
 - 35 c) en donde se desactivan los genes del operón del ácido colánico *fcl*, *gmd*, *gmm*, *wcaA*, *wcaB*, *wcaC*, *wcaD*, *wcaE*, *wcaF*, *weal*, *wcaJ*, *wcaK*, *wcaL*, *wzx*, *wza*, *wzb*, *wzc* y/o *wcaM*, y/o
 - d) en donde se introduce un gen que codifica una sucrosa fosforilasa o una invertasa, y/o
 - e) en donde se suprimen los genes *pgi*, *pfkA* y *pfkB*, y/o
 - f) se desactiva el gen *lon*, y/o
 - g) en donde se introduce un gen codificante de una manosiltransferasa.
- 40 9. Una bacteria mutada y/o transformada en la que los reguladores ArcA e IclR, en combinación con los genes codificantes de las enzimas fosfoglucoasa isomerasa y fosfofructoquinasa, están desactivados.
10. La bacteria mutada y/o transformada según la reivindicación 9, en donde la enzima fosfoglucoasa isomerasa está codificada por el gen *pgi* y en donde la enzima fosfofructoquinasa está codificada por el(los) gen(es) *pfkA* y/o *pfkB*.
- 45 11. La bacteria mutada y/o transformada según la reivindicación 9 o 10, en donde dicho organismo se transforma adicionalmente con un gen codificante de una sucrosa fosforilasa o invertasa.
12. La bacteria mutada y/o transformada según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde la actividad del gen codificante de una lactosa permeasa está aumentada.
13. La bacteria mutada y/o transformada según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde al menos uno de los siguientes genes está desactivado o se ha hecho menos funcional:

un gen codificante de una beta-galactosidasa, un gen codificante de una glucosa-1-fosfato adenililtransferasa, un gen
 codificante de una glucosa-1-fosfatasa, un gen codificante de fosfogluconato deshidratasa, un gen codificante de 2-
 ceto-3-desoxigluconato-6-fosfato aldolasa, un gen codificante de una glucosa-1-fosfato uridiltransferasa, un gen
 5 codificante de una UDP-glucosa-4-epimerasa, un gen codificante de una UDP-glucosa:galactosa-1-fosfato
 uridiltransferasa, un gen codificante de una UDPgalactopiranos mutasa, un gen codificante de una UDP-
 galactosa:(glucosil)lipopolisacárido-1,6-galactosiltransferasa, un gen codificante de una UDP-galactosiltransferasa, un
 gen codificante de una UDP-glucosiltransferasa, un gen codificante de una UDP-glucuronato transferasa, un gen
 10 codificante de una UDP-glucosa transferasa al vehículo lipídico, un gen codificante de una GDP-manosa hidrolasa, un
 gen codificante de una UDP-azúcar hidrolasa, un gen codificante de una manosa-6-fosfato isomerasa, un gen
 codificante de una UDP-N-acetilglucosamina enoilpiruvil transferasa, un gen codificante de una UDP-N-
 acetilglucosamina acetiltransferasa, un gen codificante de una UDP-Nacetilglucosamina-2-epimerasa, un gen
 codificante de una undecaprenil-fosfato alfa-N-acetilglucosaminil transferasa, un gen codificante de una glucosa-6-
 15 fosfato-1-deshidrogenasa, y/o un gen codificante de una L-glutamina:D-fructosa-6-fosfato aminotransferasa, un gen
 codificante de una manosa-6-fosfato isomerasa, un gen codificante de una sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa, un gen
 codificante de una manitol-1-fosfato-5-deshidrogenasa, un gen codificante de una alulosa-6-fosfato 3-epimerasa, un
 gen codificante de una invertasa, un gen codificante de una maltasa, un gen codificante de una trehalasa, un gen
 codificante de un fosfotransferasa transportadora de azúcar, un gen codificante de una proteasa, o un gen codificante
 de una hexoquinasa.

Figura 1

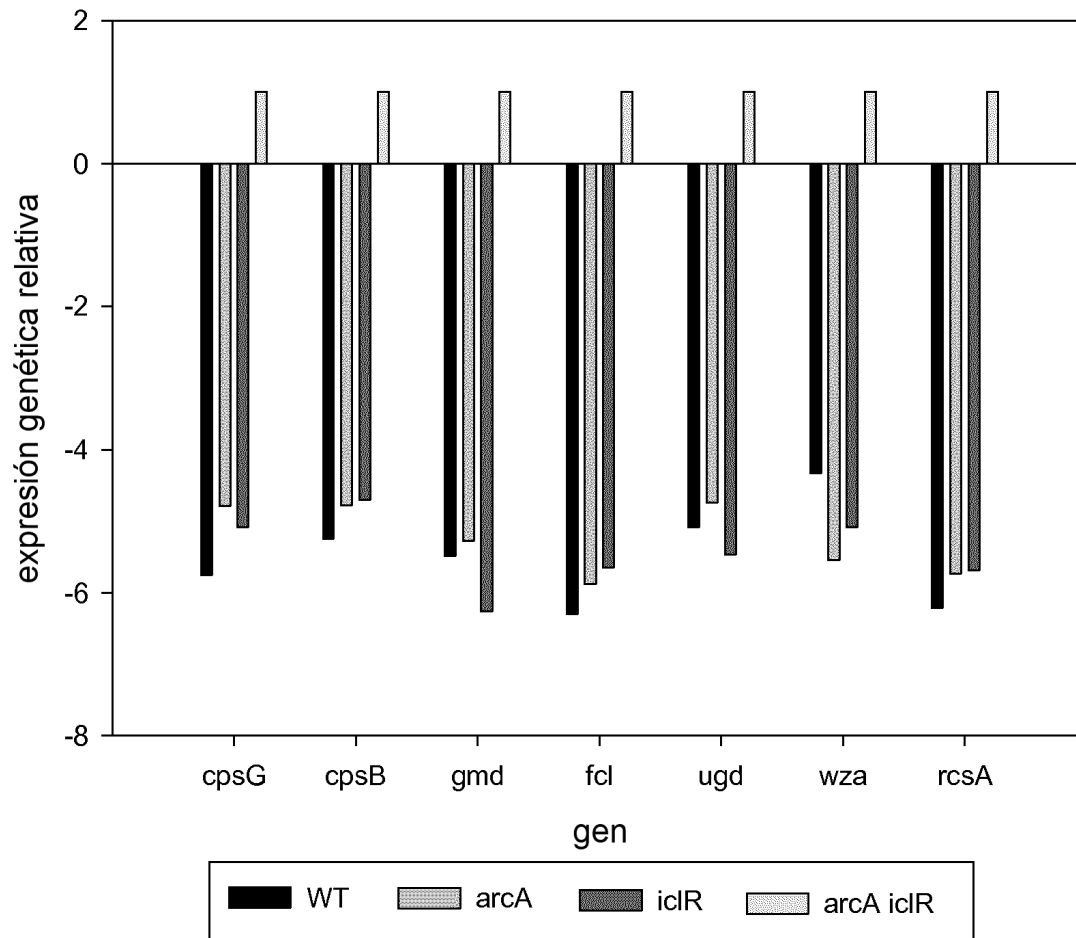


Figura 2

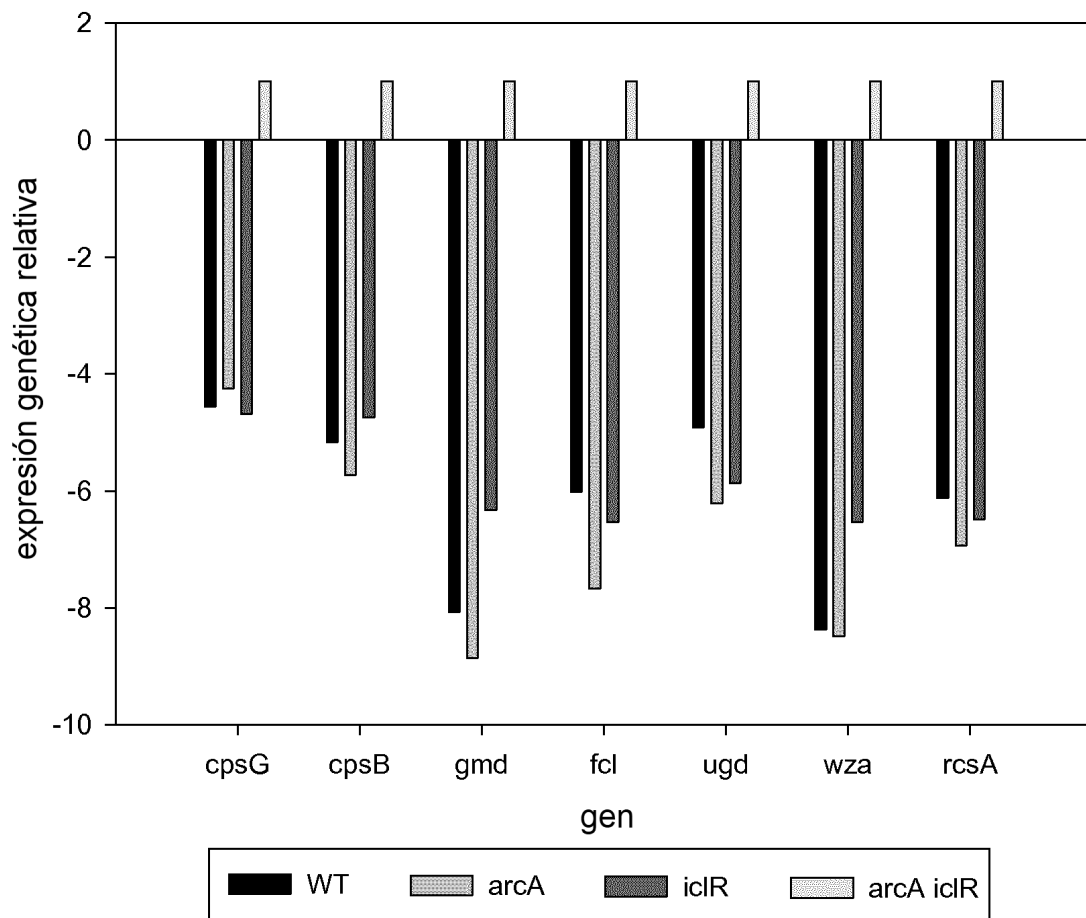


Figura 3

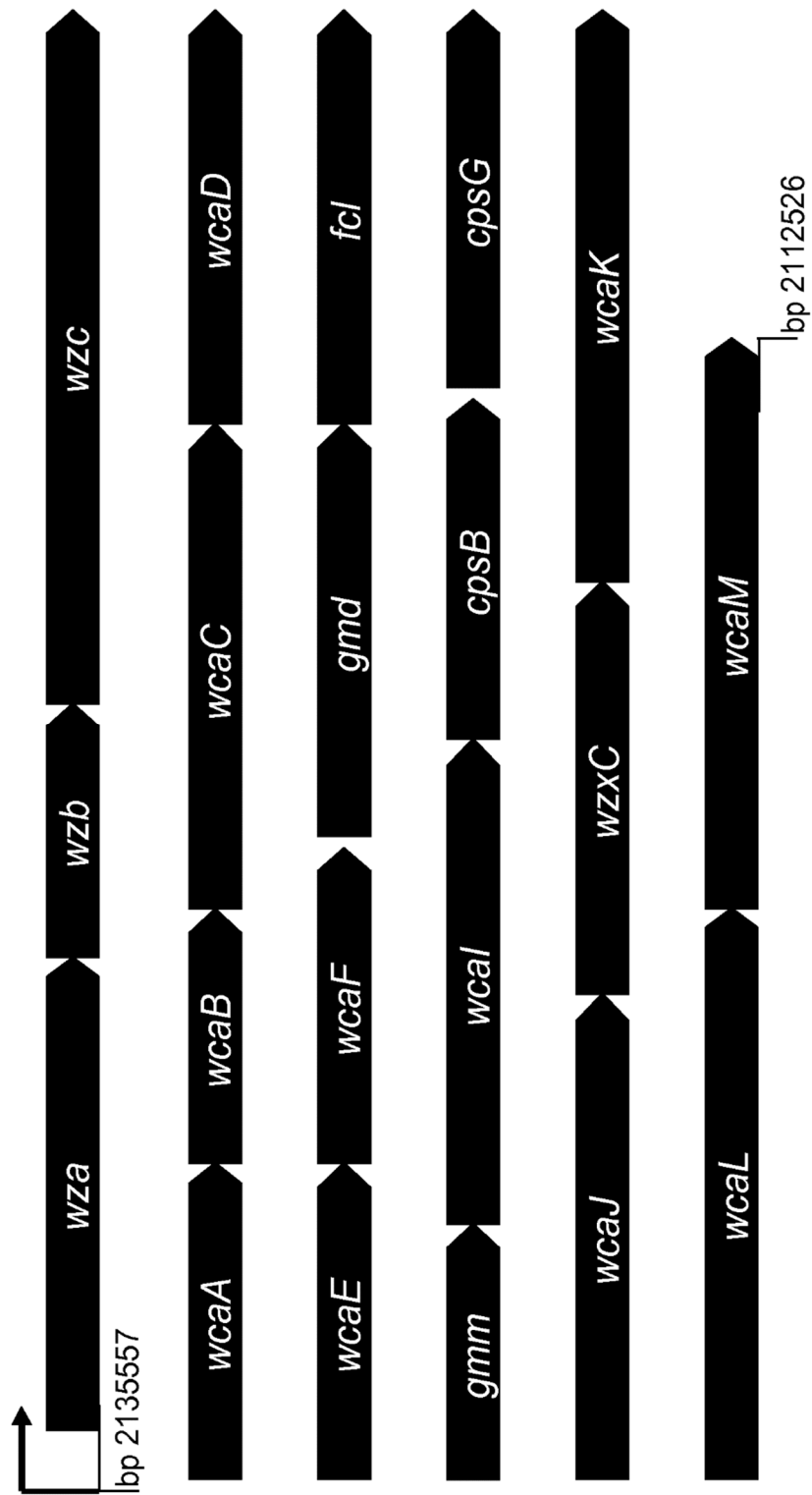


Figura 4

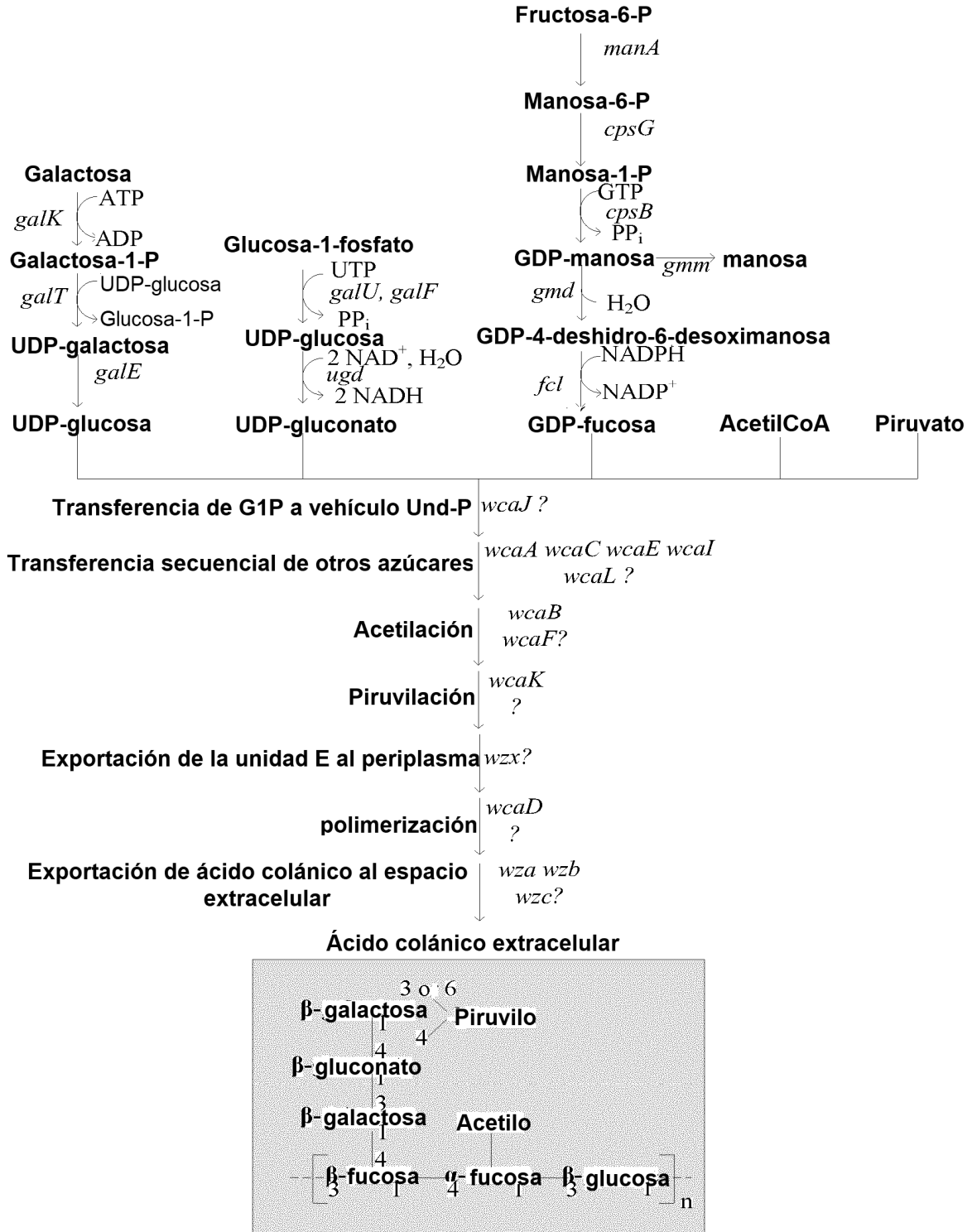


Figura 5

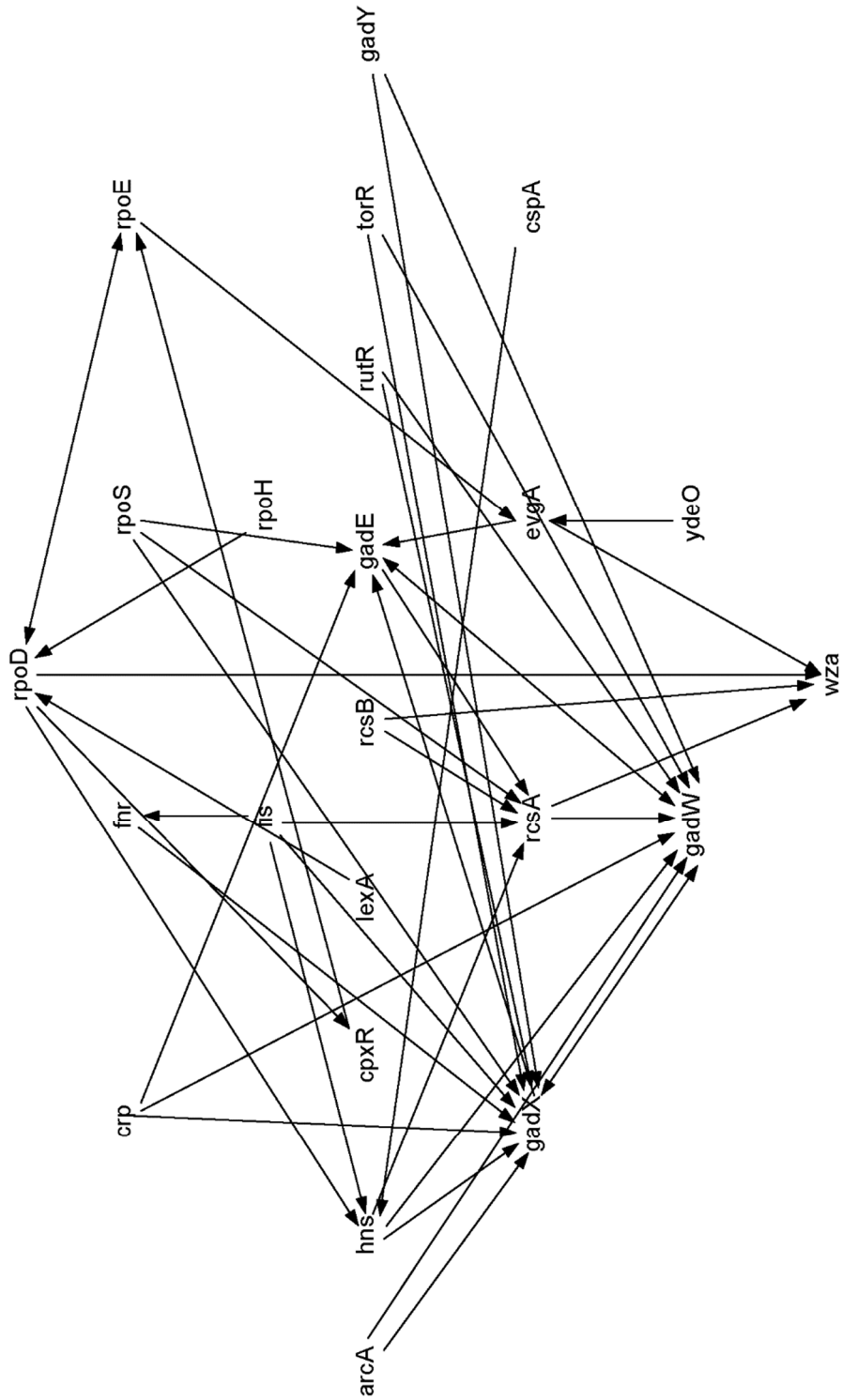


Figura 6

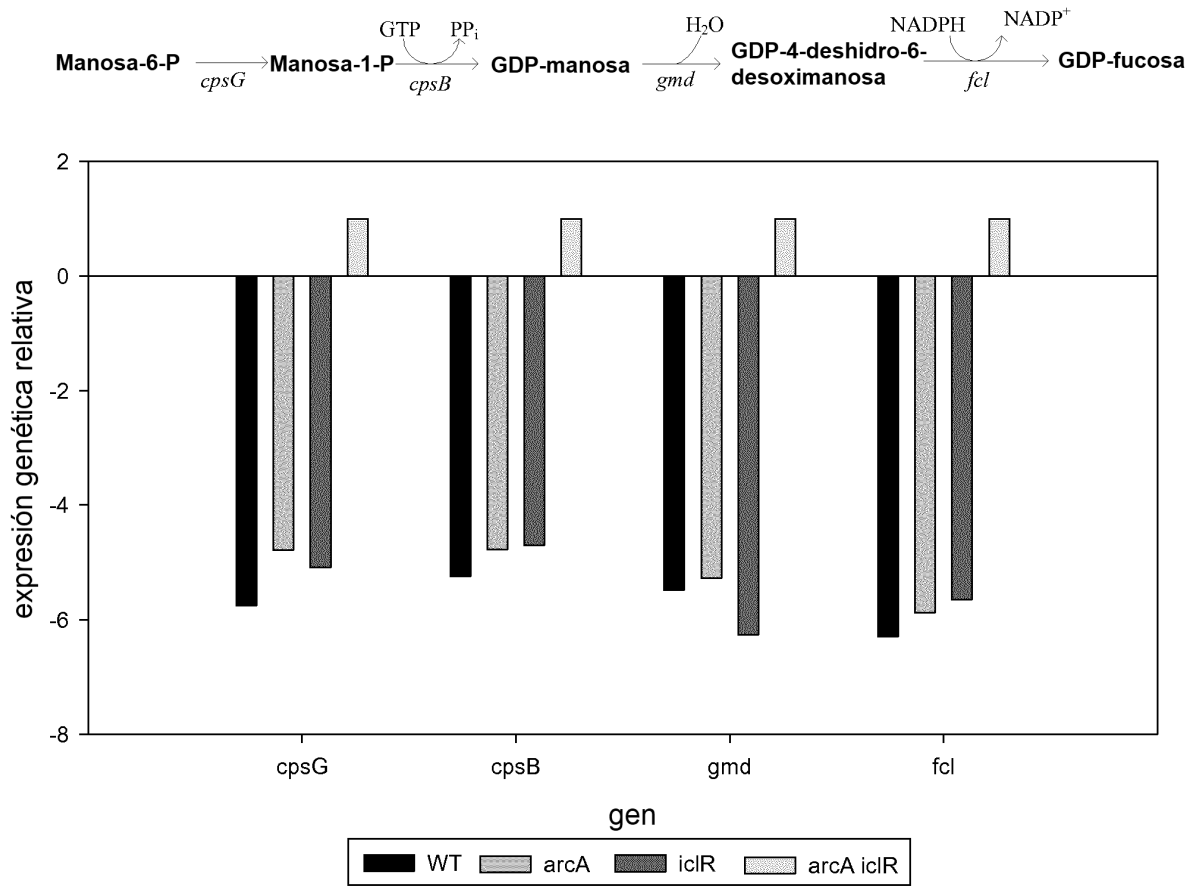


Figura 7

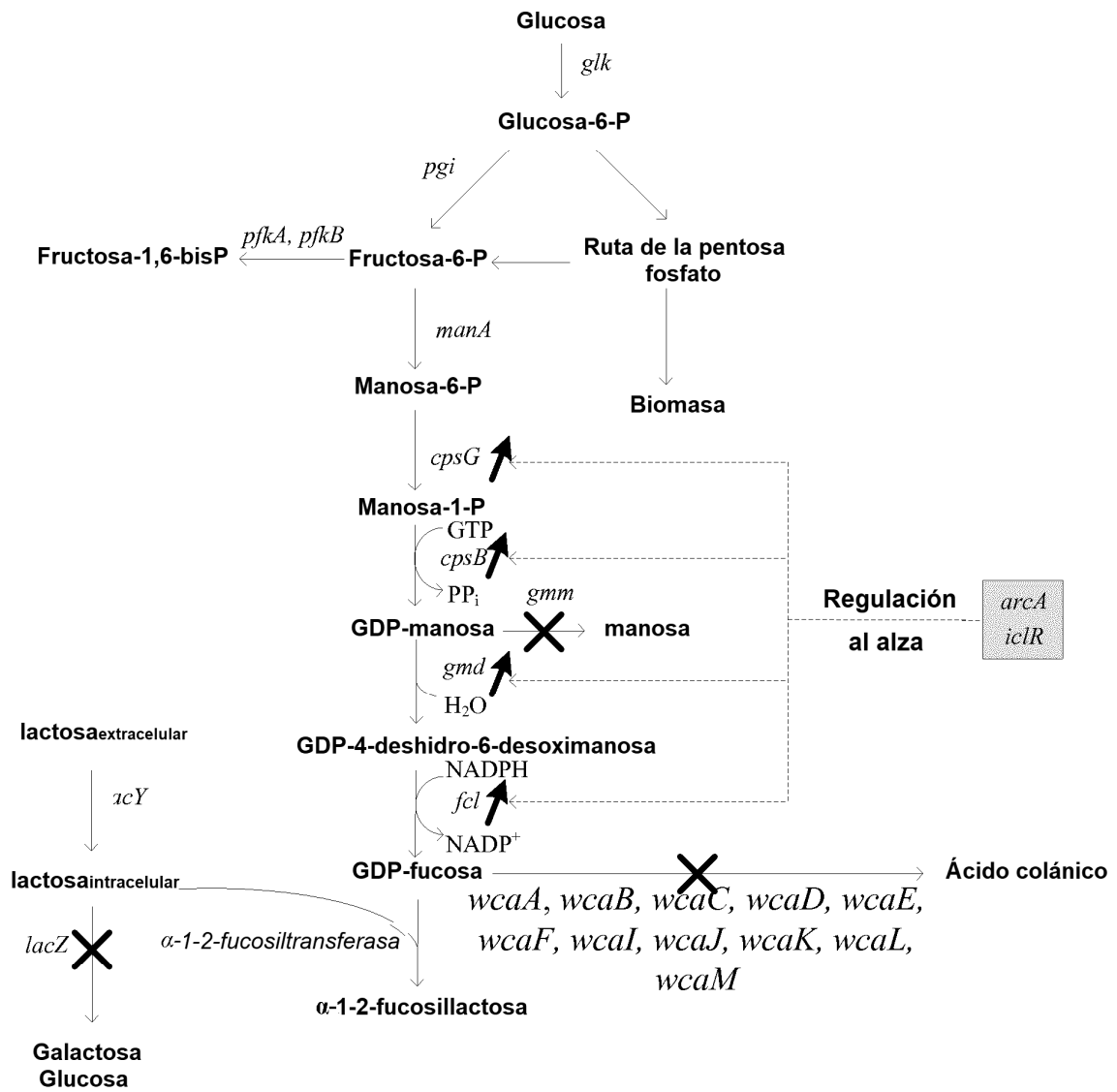


Figura 8

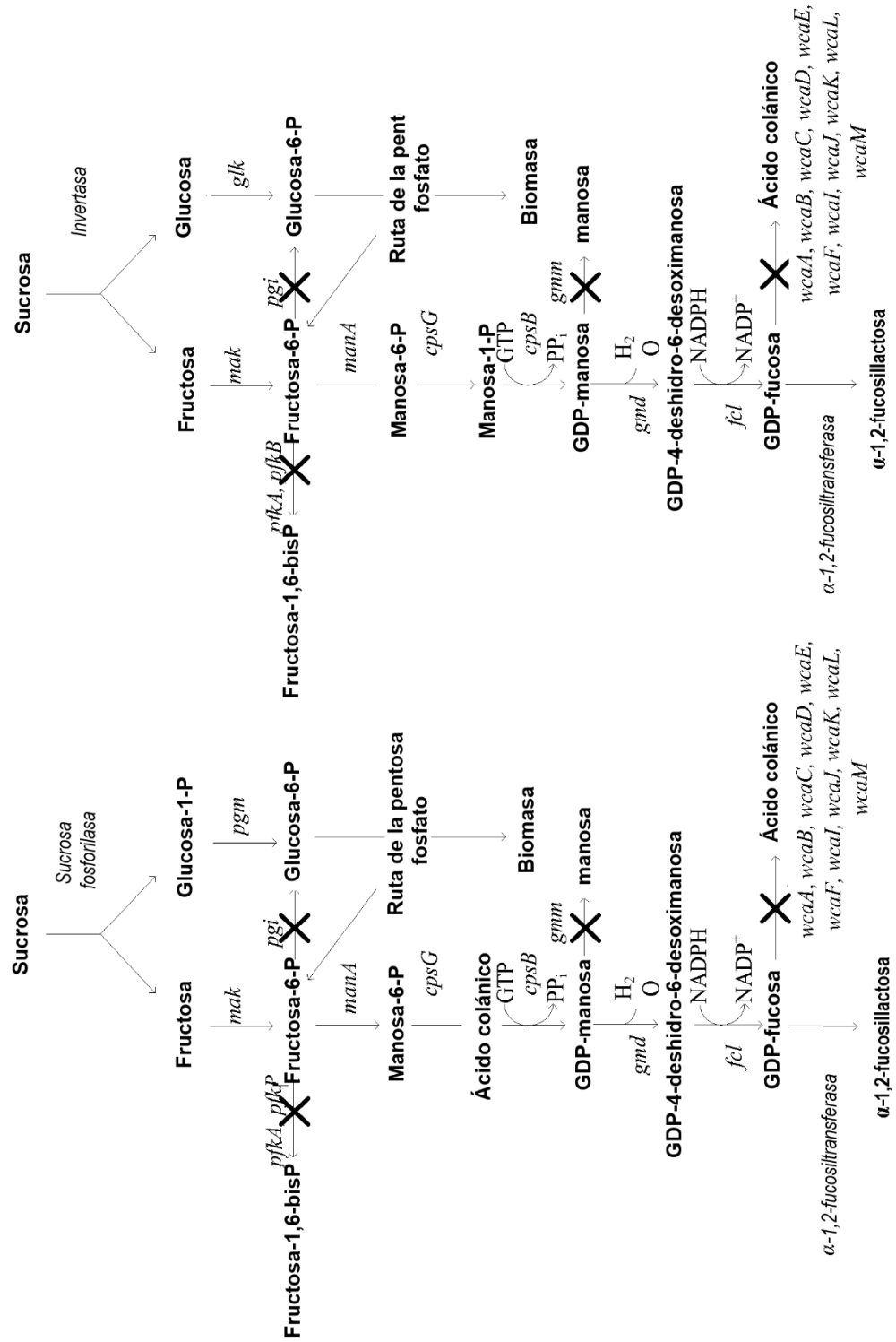


Figura 9

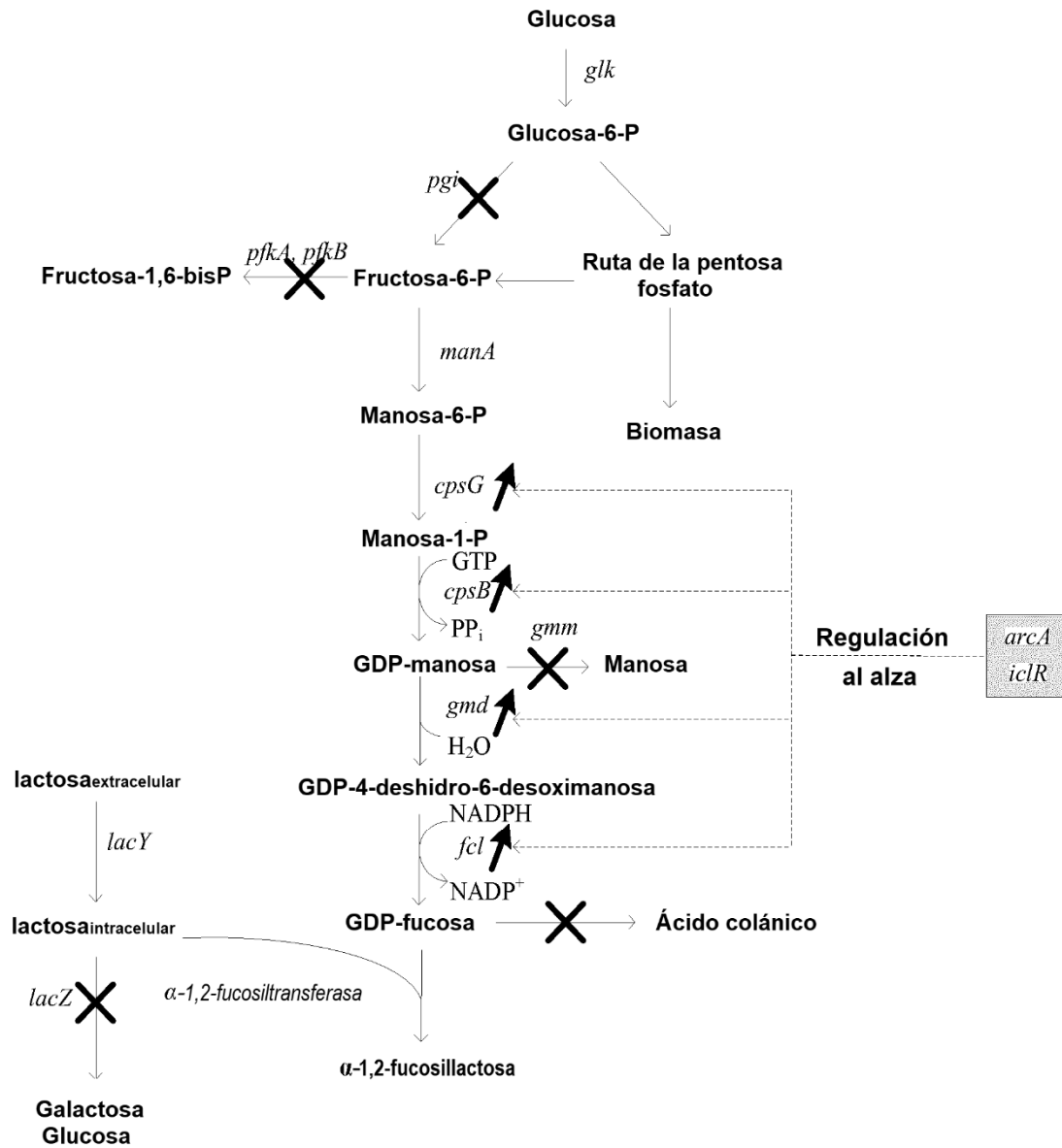


Figura 10

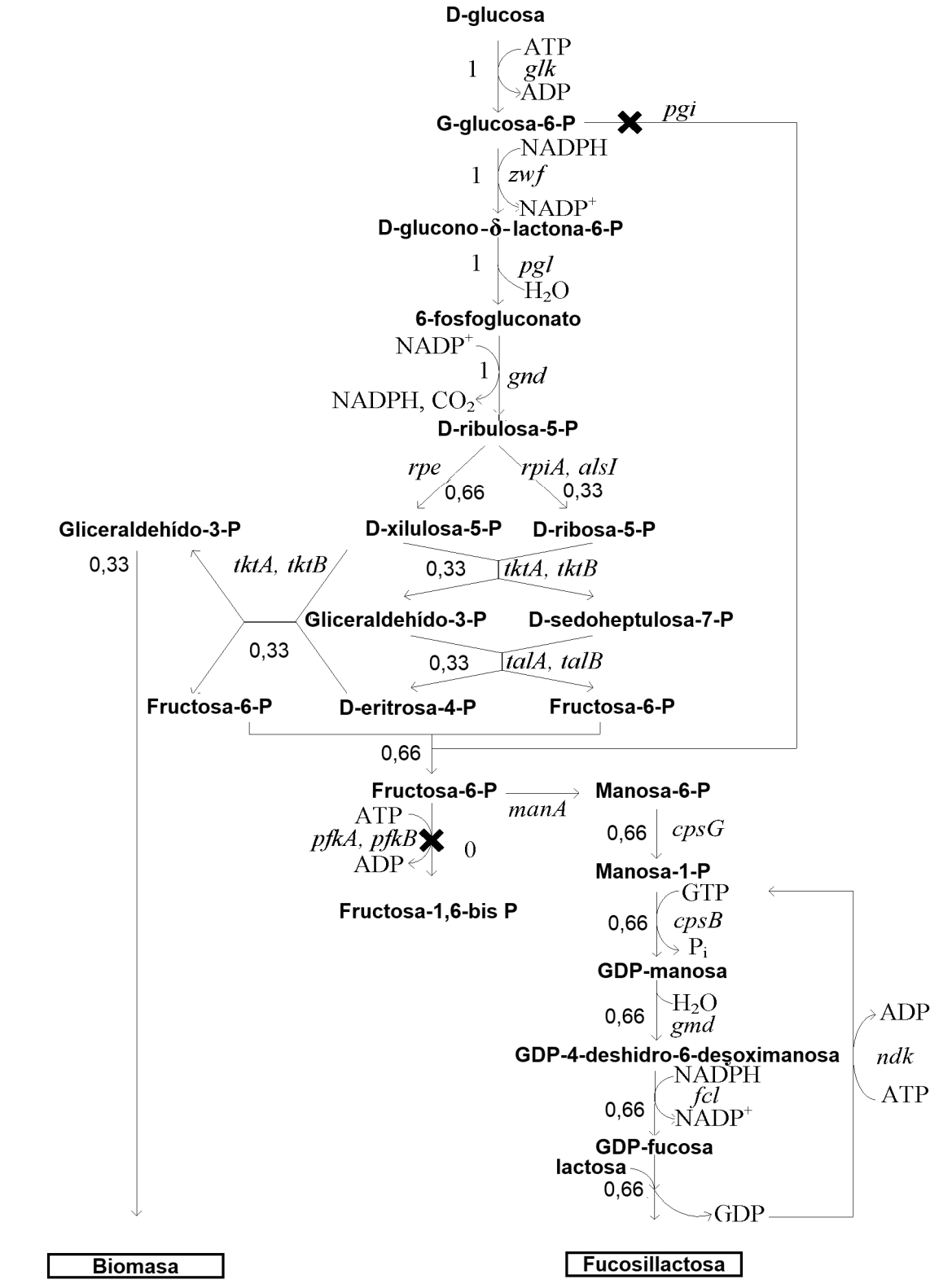


Figura 11

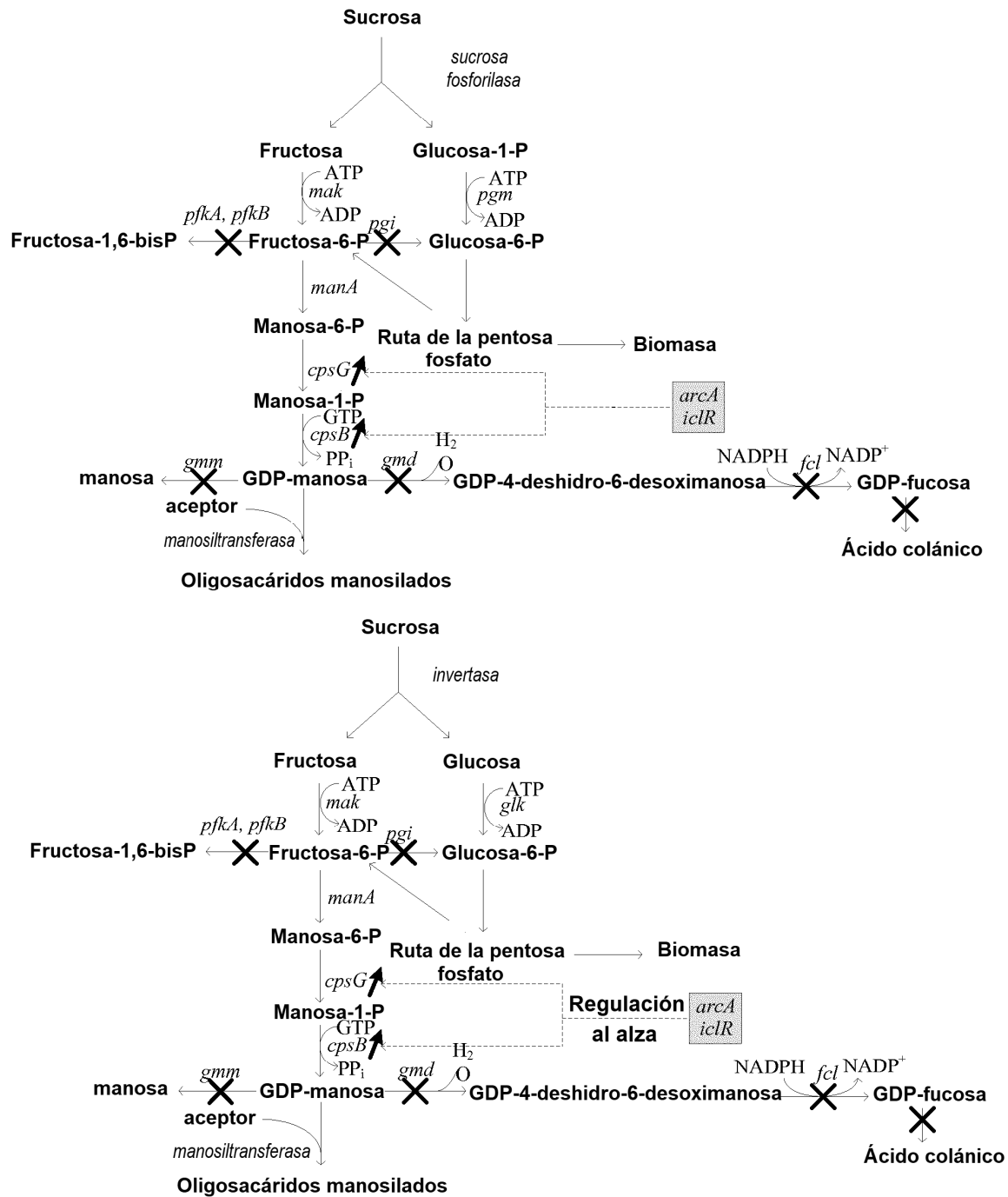


Figura 12

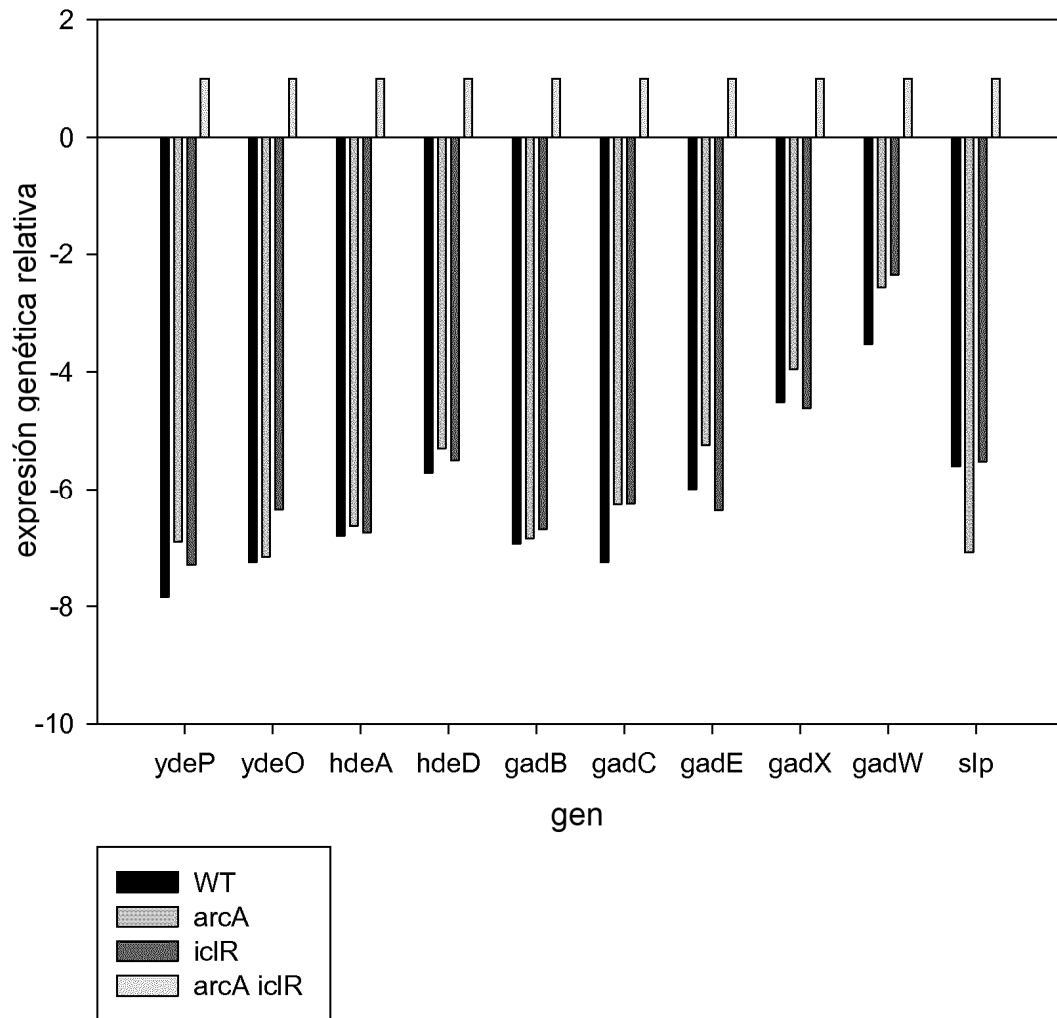


Figura 13

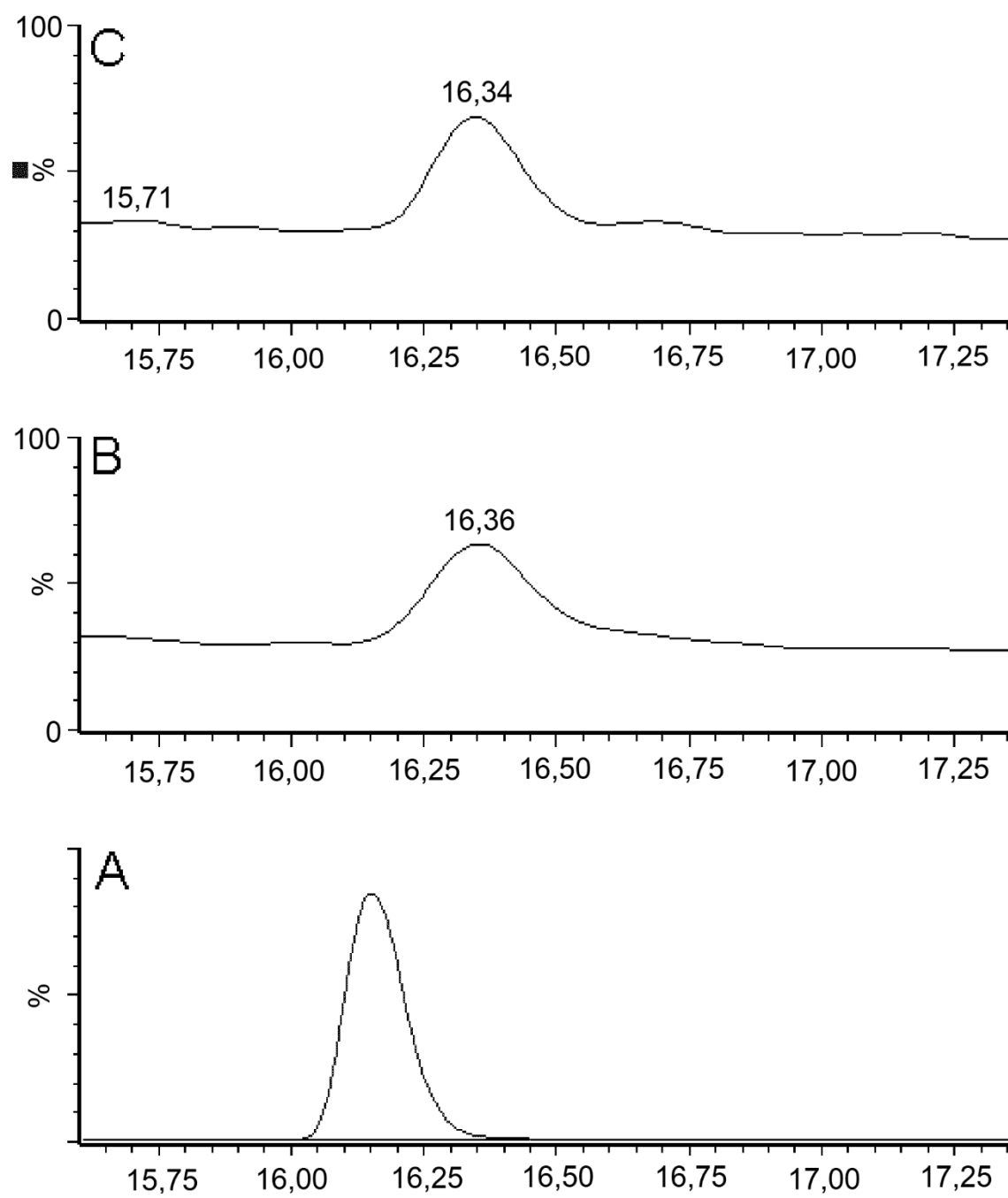


Figura 14

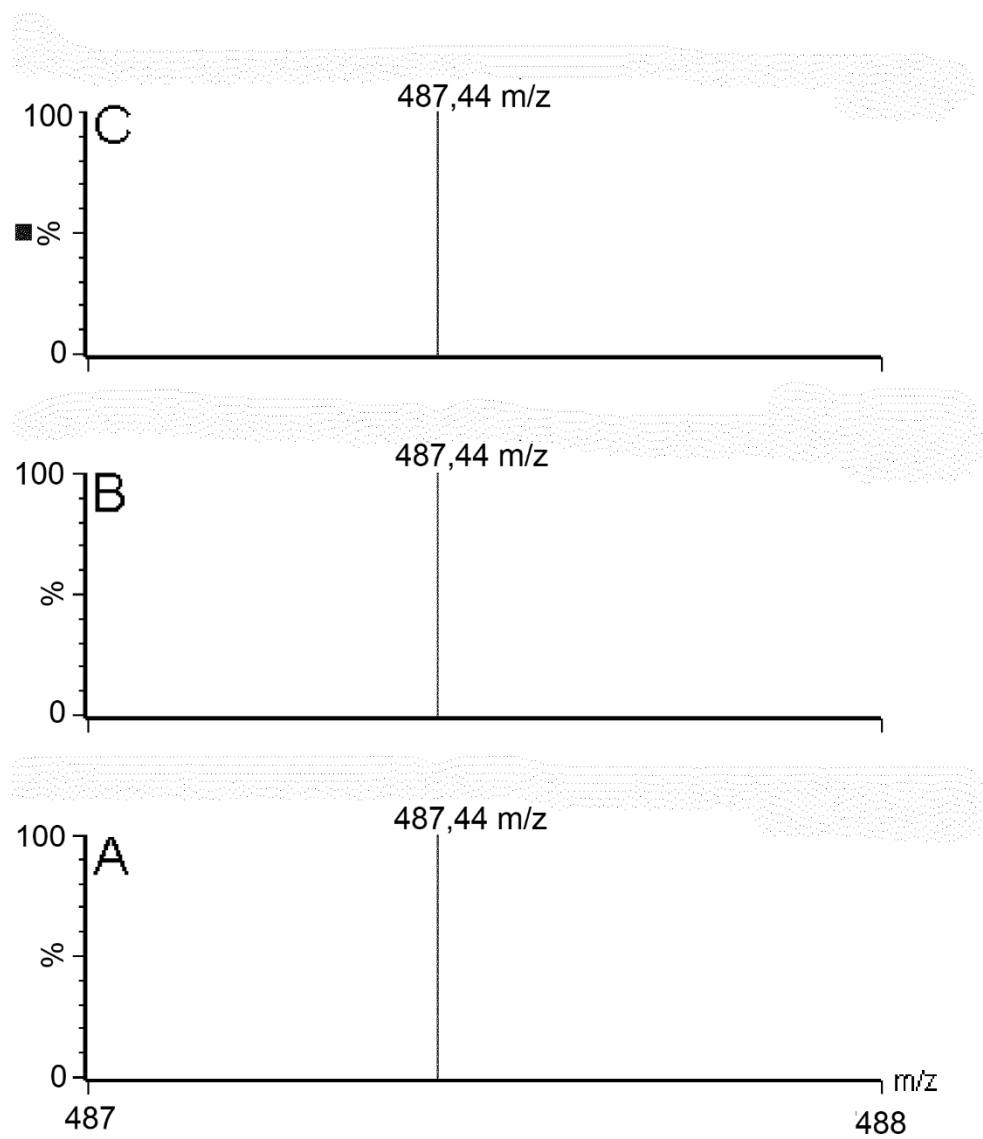


Figura 15

Parte de secuencia UTR (SEQ ID N° 3)

TGTTTATTTATCACTTTGGCAGAGTAATTATCCTGTGCACTATTAATAGCAATGTCGCCA
TGCACATTTACCTTGCAGTTAATTGAATAAAAAATTTAACTGGCATCAGTCCTAAAAAAT
TGATTTTCATCCGCAGGCTATTGACAGAATAATTCAGACTGGTCTTTCAGGCATCCAGACA
CGCTACCGCCCCCTGGCTTTTTAGCTACCAATACACTGATTTAGTTTAATTTTTTCACACCC
TCTCAGCATGCAGTCGTTGATGAGAAAGGGTTATTACGGAAATTAAGTTCCGAATATAAG
GTGACATTATGGTAATTGAATATTGGCTTTCCAATAATGC

Parte de secuencia de promotor artificial (SEQ ID N° 4)

CGAGGTCGACGGATCCCAAGCTTCTTCTAGAGCGGCCGCCATGGAAATTTCCCTATTATA
CCATATGCCGGCCAAGATGTCAAGAACTTATAGAATGAAG

Parte de secuencia de regulón (SEQ ID N° 5)

TAAGTGTCATTCAATATGGTTTTTAGGAGTTTCTTTAGGTTGAC

Secuencia de promotor completa (SEQ ID N° 6)

TGTTTATTTATCACTTTGGCAGAGTAATTATCCTGTGCACTATTAATAGCAATGTCGCCAT
GCACATTTACCTTGCAGTTAATTGAATAAAAAATTTAACTGGCATCAGTCCTAAAAAATTG
ATTTTCATCCGCAGGCTATTGACAGAATAATTCAGACTGGTCTTTCAGGCATCCAGACACGC
TACCGCCCCCTGGCTTTTTAGCTACCAATACACTGATTTAGTTTAATTTTTTCACACCCTCTC
AGCATGCAGTCGTTGATGAGAAAGGGTTATTACGGAAATTAAGTTCCGAATATAAGGTGAC
ATTATGGTAATTGAATATTGGCTTTCCAATAATGCCGAGGTCGACGGATCCCAAGCTTCTT
CTAGAGCGGCCGCCATGGAAATTTCCCTATTATACCATATGCCGGCCAAGATGTCAAGAAA
CTTATAGAATGAAGTAAGTGTCATTCAATATGGTTTTTAGGAGTTTCTTTAGGTTGAC