

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 978**

51 Int. Cl.:

C12P 19/18 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2012** **E 12190801 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017** **EP 2728009**

54 Título: **Proceso de producción de monosacáridos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.11.2017

73 Titular/es:

JENNEWEIN BIOTECHNOLOGIE GMBH (100.0%)
Maarweg 32
53619 Rhienbrettbach, DE

72 Inventor/es:

JENNEWEIN, STEFAN y
PARSCHAT, KATJA

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 640 978 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

Proceso de producción de monosacáridos

La presente invención se refiere a un proceso de producción de monosacáridos, en particular para producir L-fucosa u otros monosacáridos escasos, por ejemplo, ácido N-acetilneuramínico, por el cual se usa un microorganismo en el proceso de producción.

Los hidratos de carbono son necesarios en todas las formas de vida, haciéndose cargo de funciones vitales en el almacenamiento de energía, función estructural, señalización, almacenamiento de información, etc. Para esta tarea, la naturaleza sintetiza varios monosacáridos importantes como glucosa, manosa, fructosa, fucosa, ribosa, ácido siálico, etc., y varios secundarios para aplicaciones más especializadas como, por ejemplo, D-alosa.

Mientras que algunos monosacáridos pueden obtenerse de la naturaleza en grandes cantidades y a coste razonable (por ejemplo, glucosa y fructosa), la mayoría de los monosacáridos son bastante escasos y pueden encontrarse en la naturaleza solo en pequeñas cantidades como, por ejemplo, L-fucosa (6-desoxi-L-galactosa).

Para la producción de monosacáridos comercial, como fuentes se usan casi exclusivamente los oligosacáridos obtenidos de la naturaleza. Estos oligosacáridos son hidrolizados con ácido y a partir de los monosacáridos liberados se purifican los azúcares individuales. Debido a la alta similitud química de los monosacáridos (que se diferencian principalmente entre sí solo por la orientación de los grupos hidroxilo individuales), la separación de monosacáridos individuales en forma pura es bastante laboriosa y costosa.

La L-fucosa representa un azúcar tan raro, que actualmente se obtiene mediante la hidrólisis de oligosacáridos complejos, bien de algas o bien de origen bacteriano. Para la purificación de monosacáridos individuales a partir de hidrolizados complejos, frecuentemente tienen que emplearse productos químicos perjudiciales como, por ejemplo, acetato de plomo y cantidades excesivas de disolventes orgánicos. Por tanto, el aislamiento de monosacáridos individuales de un hidrolizado complejo de oligosacáridos es exigente (debido a la alta similitud química de los monosacáridos individuales liberados) y medioambientalmente peligroso (debido al excesivo uso de productos químicos tóxicos, tales como carbonato de plomo). También la disponibilidad de oligosacáridos ricos en un cierto azúcar puede estar bastante limitada en la naturaleza y también ser altamente variable debido a cambios estacionales. La L-fucosa representa un monosacárido escaso tal que se obtiene tradicionalmente por la hidrólisis ácida de polisacáridos que contienen fucosa. La fucosa deriva principalmente del polisacárido fucoidano, un monosulfato de fucano presente en todas las algas marinas marrones comunes que comprenden las familias Fucaceae y Laminariaceae. Hoy en día, la L-fucosa se obtiene en grandes cantidades principalmente por la recogida de algas marinas marrones que pertenecen a la familia Fucaceae, que pueden encontrarse en todo el mundo, pero en altas cantidades en las orillas europeas del océano Atlántico. La recogida a gran escala de algas marinas marrones de las orillas del mar produce problemas ambientales y está limitada por ciertas leyes de protección ambiental.

Por ejemplo, el documento JP 2000351790 desvela un método de extracción de fucoidano y de obtención y separación de un oligosacárido que contiene fucosa del fucoidano extraído.

Además de la hidrólisis del fucoidano a partir de alga marina común, recientemente una publicación de patente mostró que la L-fucosa también puede obtenerse mediante la hidrólisis de polisacáridos bacterianos que contienen L-fucosa que se producen naturalmente: el documento WO 2012/034996 A1 desvela una cepa que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, cepa que es capaz de producir polisacáridos extracelulares que contienen L-fucosa. Para la producción de L-fucosa, los polisacáridos producidos por la cepa se recuperan y se someten a hidrólisis, por ejemplo mediante tratamiento con ácido sulfúrico o ácido clorhídrico.

El documento WO 2010/101158 A1 desvela un método de producción de un monosacárido a partir de celulosa o hemicelulosa cultivando *E. coli* recombinante transformada con diferentes glucosidasas, tales como beta-glucosidasa, galactosidasa, etc., de *Clostridium cellulovorans*.

Además de la extracción de L-fucosa a partir de hidrolizados de poli- u oligosacárido, se han desarrollado varias rutas de síntesis para L-fucosa a partir de otros monosacáridos, como L-arabinosa, D-galactosa, L-ramnosa, D-manosa y D-glucosa. Generalmente, los rendimientos de estas síntesis químicas son frecuentemente bastante pobres e implican varias etapas. Además de implicar varias etapas sintéticas, tiene que usarse una amplia química de grupos de protección para la síntesis química de L-fucosa. En general, la síntesis química a gran escala de monosacáridos no ha demostrado ser económicamente viable en comparación con la extracción de la naturaleza.

Así, actualmente, la preparación de cualquier monosacárido en forma pura requiere un esfuerzo significativo en la purificación de otros monosacáridos del monosacárido diana, que frecuentemente implica grandes volúmenes de disolventes orgánicos y otros productos químicos perjudiciales. Como consecuencia, la exclusiva acumulación de un único monosacárido deseado como, por ejemplo, L-fucosa sería de inmensa ayuda. La mayoría de los microorganismos están limitados en los tipos de monosacáridos que son capaces de utilizar. Además, frecuentemente ejercen fuertes preferencias hacia ciertos monosacáridos en caso de que varios monosacáridos estén disponibles al mismo tiempo que la fuente de carbono.

En vista de lo anterior, es un objeto de la presente invención proporcionar un nuevo proceso para la producción de un único monosacárido deseado en forma libre, por medio del cual el monosacárido puede recuperarse rápida y eficientemente, es decir, a gran escala y rentablemente y sin efectos ambientales negativos.

5 Este y otros objetos se logran por un proceso de producción de un monosacárido, es decir, a gran escala, en forma libre usando un microorganismo como se reivindica en las reivindicaciones adjuntas, comprendiendo el proceso las etapas de:

- 10 a) proporcionar un microorganismo genéticamente manipulado que posee las siguientes actividades enzimáticas para la síntesis del monosacárido: i) una glucosiltransferasa específicamente capaz de transferir, a partir de un monosacárido de nucleótidos activado, el monosacárido a un sustrato aceptor para formar un sustrato aceptor-monosacárido, y ii) una glucosidasa capaz de liberar el monosacárido del sustrato aceptor; en el que el microorganismo es incapaz de metabolizar el monosacárido; en el que el microorganismo ha sido transformado para comprender al menos uno de i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una glucosiltransferasa que no existe de forma natural en el microorganismo, y/o ii) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una glucosidasa que no existe de forma natural en dicho microorganismo,
- 15 b) cultivar el microorganismo en un medio adecuado para hacer crecer el microorganismo, por lo que el monosacárido se produce en una forma libre,
- c) recuperar el monosacárido libre del medio.

20 Además, este objeto se resuelve por un microorganismo, preferentemente un microorganismo hospedador recombinante como se reivindica en las reivindicaciones adjuntas, y su uso en la producción de un monosacárido en forma libre como se reivindica en las reivindicaciones adjuntas, conteniendo el microorganismo i) una glucosiltransferasa específicamente capaz de transferir, a partir de un monosacárido de nucleótidos activado, el monosacárido a un sustrato aceptor para formar un sustrato aceptor-monosacárido, y ii) una glucosidasa capaz de liberar el monosacárido del sustrato aceptor; en el que el microorganismo es incapaz de metabolizar el monosacárido.

25 El objeto subyacente a la invención se resuelve completamente de esta forma.

El proceso de los solicitantes no ha sido previamente descrito, y utiliza un microorganismo que tiene dos actividades enzimáticas específicas, es decir, una glucosiltransferasa y una glucosidasa, en el que la glucosiltransferasa es específicamente capaz de transferir, a partir de un monosacárido de nucleótidos activado (que está o bien endógenamente presente o se suministra externamente), el monosacárido a un sustrato aceptor de manera que se forme un sustrato aceptor-monosacárido. En una etapa posterior, la glucosidasa libera el monosacárido del sustrato aceptor de manera que se proporcione el monosacárido libre.

35 Según la invención, el microorganismo es un microorganismo recombinante, en el que el microorganismo recombinante ha sido transformado para comprender i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una glucosiltransferasa que no existe de forma natural en el microorganismo, y ii) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una glucosidasa que no existe de forma natural en dicho microorganismo. En otras palabras, el microorganismo recombinante se transforma para comprender una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una glucosiltransferasa que no existe de forma natural en el microorganismo, y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una glucosidasa que no existe de forma natural en dicho microorganismo.

40 Con el proceso recientemente proporcionado y el microorganismo recientemente proporcionado, es - por primera vez - posible producir un monosacárido deseado en una forma libre y en grandes cantidades, sin necesitar productos químicos o etapas de proceso elaboradas. El proceso según la invención representa un proceso de fermentación microbiana, adecuado para conseguir emplear para producción a gran escala industrial monosacáridos raros u otros, que pueden ser fácilmente recuperados del medio en el que se cultiva el microorganismo.

45 Usando un microorganismo según la invención, es decir, uno que está expresando la glucosiltransferasa, puede efectuarse la eficiente fucosilación de un sustrato aceptor endógeno o externamente suministrado, y por la expresión simultánea de una glucosidasa puede producirse una acumulación sin precedentes de grandes cantidades del monosacárido libre en el medio. En presencia de un sustrato aceptor, la glucosiltransferasa y glucosidasa están así trabajando sinérgicamente juntas en la síntesis de monosacárido libre que requiere solo una cantidad catalítica de aceptor adecuado. Así, el sustrato aceptor suministrado es fucosilado por la glucosiltransferasa y el producto glucosilado generado se recircula por la acción de la glucosidasa que acepta el producto glucosilado de la reacción de glucosiltransferasa.

55 La expresión "monosacárido", como se usa en el presente documento y como generalmente es entendida en el campo de la invención, se refiere a la unidad de hidratos de carbono más básica. Los monosacáridos son la forma más simple de azúcar y son normalmente sólidos cristalinos incoloros solubles en agua. Ejemplos de monosacáridos incluyen glucosa, fructosa, galactosa, xilosa y ribosa. Los monosacáridos son los elementos estructurales de disacáridos tales como sacarosa y polisacáridos tales como celulosa y almidón. "Oligosacárido", como se usa el

término en el presente documento y como generalmente es entendido en el estado de la técnica, se refiere a un polímero de sacáridos que contiene dos monosacáridos o más.

El término "secuencia de ácidos nucleicos que codifica..." generalmente se refiere a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN sin modificar o ARN o ADN modificado, y generalmente representa un gen que codifica un cierto polipéptido o proteína. El término incluye, sin limitación, ADN mono- y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones mono- y bicatenarias o regiones mono-, bi- y tri-catenarias, ARN mono- y bicatenario, y ARN que es mezcla de regiones mono- y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser regiones monocatenarias o, más normalmente, bicatenarias, o tri-catenarias, o una mezcla de regiones mono- y bicatenarias. El término también engloba polinucleótidos que incluyen una única región continua o regiones discontinuas que codifican el polipéptido (por ejemplo, interrumpidas por fago integrado o una secuencia de inserción o edición) junto con regiones adicionales que también pueden contener secuencias codificantes y/o no codificantes.

En este contexto, el término "polipéptido(s)" se refiere a cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados. "Polipéptido(s)" se refiere a tanto cadenas cortas, comúnmente denominadas péptidos, oligopéptidos y oligómeros, como a cadenas más largas, generalmente denominadas proteínas. Los polipéptidos pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes. "Polipéptido(s)" incluyen aquellos modificados bien por procesos naturales, tales como procesamiento y otras modificaciones post-traduccionales, pero también por técnicas de modificación química. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente al mismo grado o grado variable en varios sitios en un polipéptido dado, sin alterar esencialmente la actividad del polipéptido. Por tanto, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Las modificaciones puede producirse en cualquier parte en un polipéptido, que incluye el esqueleto del péptido, las cadenas laterales de aminoácidos, y los extremos amino o carboxilo.

Actualmente, y en toda la presente invención, el término "glucosiltransferasa" designa y engloba enzimas que son responsables de la biosíntesis de disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos, y catalizan la transferencia de restos de monosacárido a partir de un monosacárido de nucleótidos activado/azúcar (el "donante de glucosilo") a una molécula aceptora de glucosilo.

Según un aspecto de la invención, es particularmente preferido si la glucosiltransferasa es una fucosiltransferasa bacteriana, y preferentemente la alfa-1,2-fucosiltransferasa codificada por el gen *wbgL* de *E. coli*:O126 (N.º de acceso de GenBank ADN43847).

Por consiguiente, los términos "alfa-1,2-fucosiltransferasa" o "fucosiltransferasa", o un ácido nucleico/polinucleótido que codifica una "alfa-1,2-fucosiltransferasa" o "fucosiltransferasa", se refieren a una glucosiltransferasa que cataliza la transferencia de fucosa de un sustrato donante, por ejemplo GDP-fucosa, a una molécula aceptora en un enlace alfa-1,2. La molécula aceptora puede ser un hidrato de carbono, un oligosacárido, una proteína o glucoproteína, o un lípido o glicolípido, y puede ser, por ejemplo, N-acetilglucosamina, N-acetil-lactosamina, galactosa, fucosa, ácido siálico, glucosa, lactosa, o cualquier combinación de las mismas.

"Una glucosidasa" o "una glucosidasa capaz de liberar el monosacárido del sustrato aceptor", como se usa en toda la presente invención y como se entiende en el campo relevante, comprende cualquier glucósido (o glucosil)hidrolasa que cataliza la hidrólisis de enlaces glucosídicos para liberar azúcares más pequeños, tales como monosacáridos.

Según un aspecto de la invención, es particularmente preferido si la glucosidasa es una glucosidasa bacteriana, preferentemente una α -L-fucosidasa bacteriana. Según una realización de la invención, se usa el gen de 1,2- α -L-fucosidasa *afcA* de *Bifidobacterium bifidum* (N.º de acceso de GenBank: AY303700), optimizado en codones para la expresión en *E. coli*.

Dentro del alcance de la presente invención, también están comprendidas variantes polimórficas de ácido nucleico/polinucleótido y polipéptido, alelos, mutantes, fragmentos funcionalmente equivalentes y homólogos entre especies de las glucosiltransferasas y glucosidasas que se mencionan en toda la invención por aquellos términos, en particular aquellos que tienen una secuencia de aminoácidos que tiene más de aproximadamente el 60 % de identidad de secuencia de aminoácidos, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, preferentemente 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o mayor identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente con respecto a una región de al menos aproximadamente 25, 50, 100, 200, 500, 1000 o más aminoácidos, en particular, y por ejemplo, con la secuencia de aminoácidos de la alfa-1,2-fucosiltransferasa codificada por el gen *wbgL* de *E. coli*:O126 (acc. N.º ADN43847) o con la secuencia de aminoácidos del gen de 1,2- α -L-fucosidasa *afcA* de *Bifidobacterium bifidum*. El experto en la materia reconocerá fácilmente tras la lectura de la invención que puede emplearse cualquier otra glucosiltransferasa o glucosidasa, en tanto que estas enzimas cumplan sus actividades enzimáticas en el microorganismo. Eventualmente, las secuencias de la glucosiltransferasa y/o la glucosidasa tendrán que ser optimizadas en los codones con respecto al microorganismo en el que van a introducirse.

Dentro del contexto de la presente invención, "funcionalmente equivalente", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido capaz de presentar una actividad *in vivo* sustancialmente similar como el producto del gen de alfa-1,2-fucosiltransferasa codificado por la secuencia del gen de alfa-1,2-fucosiltransferasa descrita anteriormente o del producto del gen de fucosidasa como se describió anteriormente, como se juzga por cualquiera de varios criterios, que incluyen, pero no se limitan a, antigenicidad, es decir, la capacidad para unirse a un anticuerpo anti-alfa-1,2-fucosiltransferasa o 1,2- α -L-fucosidasa, inmunogenicidad, es decir, la capacidad para generar un anticuerpo que es capaz de unirse a una proteína o polipéptido de alfa-1,2-fucosiltransferasa o fucosidasa, además de actividad enzimática.

El polipéptido de glucosiltransferasa y/o el polipéptido de glucosidasa, como se mencionaron en toda la invención, pueden producirse por tecnología de ADN recombinante usando técnicas muy conocidas en la técnica. Pueden usarse métodos que son muy conocidos para aquellos expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen, por ejemplo, alfa-1,2-fucosiltransferasa y/o 1,2- α -L-fucosidasa, secuencias codificantes y señales de control transcripcional-traduccionales apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).

Actualmente, y en toda la invención, "recombinante" significa ADN genéticamente manipulado preparado por genes de trasplante o de corte y empalme de una especie en las células de un microorganismo hospedador de una especie diferente. Tal ADN llega a ser parte de la constitución genética del hospedador y se replica.

"Microorganismo" designa y engloba actualmente cualquier organismo microscópico que comprende o bien una única célula, agrupaciones de células, o bien organismos relativamente complejos multicelulares, que es adecuado para ser empleado en el proceso según la invención, y particularmente incluye bacterias y levadura. Un microorganismo, como se emplea según la invención, puede cultivarse en un medio líquido, y generalmente necesita una fuente de carbono en el medio para crecer y duplicarse.

Por consiguiente, "un microorganismo hospedador recombinante" se designa para significar cualquier microorganismo que contiene una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una glucosiltransferasa o una glucosidasa, o que codifica una glucosiltransferasa y una glucosidasa, en el que las secuencias de ácidos nucleicos que codifican estas enzimas son secuencias de ácidos nucleicos extrañas a/que no existen de forma natural en la célula (hospedadora) recombinante y en el que la secuencia extraña/que no se produce naturalmente en dicho microorganismo está integrada en el genoma de la célula del microorganismo hospedador. Así, "que no existe de forma natural" significa que la secuencia de ácidos nucleicos es extraña a dicha célula de microorganismo hospedador, es decir, las secuencias de ácidos nucleicos son heterólogas con respecto a la célula hospedadora de microorganismo. La secuencia heteróloga puede ser establemente introducida, por ejemplo por transfección, transformación o transducción, en el genoma de la célula del microorganismo hospedador, en la que pueden aplicarse técnicas que dependerán de la célula hospedadora en la que va a introducirse la secuencia. Un experto en la materia conoce diversas técnicas y se desvelan, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 1989, arriba. Así, la célula hospedadora en la que se ha introducido la secuencia heteróloga producirá las proteínas heterólogas que están codificando las secuencias de ácidos nucleicos según la invención.

Para la producción recombinante, células hospedadoras pueden ser genéticamente manipuladas para incorporar sistemas de expresión o porciones de los mismos y las secuencias de ácidos nucleicos de la invención. La introducción de una secuencia de ácidos nucleicos en la célula hospedadora de microorganismo puede efectuarse por los métodos descritos en muchos manuales de laboratorio estándar, tales como Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, (1986), y Sambrook et al., 1989, arriba.

Así, las secuencias de ácidos nucleicos según la invención pueden, por ejemplo, estar comprendidas en un vector que va a transformarse/transfectarse establemente o introducirse de otro modo en las células de microorganismo hospedador.

Puede usarse gran variedad de sistemas de expresión para producir los polipéptidos de la invención. Tales vectores incluyen, entre otros, vectores cromosómicos, episómicos y derivados de virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófago, de transposones, de episomas de levadura, de elementos de inserción, de elementos cromosómicos de levadura, de virus y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como aquellos derivados de elementos genéticos de plásmido y bacteriófago, tales como cósmidos y fagémidos. Las construcciones del sistema de expresión pueden contener regiones de control que regulan, además de engendrar, la expresión. Generalmente, cualquier sistema o vector adecuado para mantener, propagar o expresar los polinucleótidos y para sintetizar un polipéptido en un hospedador puede usarse para la expresión a este respecto. La secuencia de ADN apropiada puede insertarse en el sistema de expresión por cualquiera de una variedad de técnicas muy conocidas y rutinarias, tales como, por ejemplo, aquellas expuestas en Sambrook et al., arriba.

Como se usa en el presente documento, el término "recuperar" significa aislar, recoger, purificar, recolectar o separar de otro modo del cultivo de microorganismos el monosacárido producido por el microorganismo según la invención.

En toda la invención, es particularmente preferido si el monosacárido libre que va a producirse es L-fucosa o un ácido neuramínico.

5 La L-fucosa es una desoxiazúcar de hexosa y se encuentra – además de otros oligosacáridos fucosilados – que es de gran interés para aparatos químicos, farmacéuticos, cosméticos y nutricionales. Además de su uso para la producción de derivados fucosilados que son conocidos por sus propiedades antialérgicas y emulsionantes, la L-fucosa también es un componente común de los oligosacáridos de leche humana (HMO), tales como 2'-fucosil-lactosa.

10 Según una realización preferida, el sustrato aceptor es o bien endógeno para dicho microorganismo o se añade al medio en el que se cultiva el microorganismo. Un sustrato aceptor endógeno puede ser, por ejemplo, cualquier disacárido o monosacárido, una proteína glucosilada o un lipopolisacárido presente en el microorganismo.

Según un aspecto de la invención, el sustrato aceptor se añade externamente a dicho microorganismo o al microorganismo cultivado en un medio, y preferentemente se añade lactosa o lactulosa.

15 En una realización preferida, el microorganismo se cultiva en un medio que contiene una fuente de carbono que está seleccionada de glicerol, sacarosa, glucosa, fructosa, melaza, lactosa, xilosa, celulosa, gas de síntesis o monóxido de carbono. En este contexto debe entenderse que cualquier otro sustrato de fermentación - preferentemente de bajo coste - puede emplearse como fuente de carbono, y el experto en la materia será fácilmente capaz de emplear una fuente de carbono adecuada dentro de la presente invención con el fin de hacer crecer el microorganismo para producir el monosacárido deseado a gran escala.

Según un aspecto de la invención, el proceso es un proceso de fermentación discontinuo o continuo.

20 Así, según un aspecto de la invención, es decir, en un proceso continuo, una fuente de carbono se añade constantemente al medio durante la etapa de cultivo del microorganismo, por ejemplo un microorganismo recombinante.

Añadiendo constantemente la fuente de carbono durante la etapa de cultivo, se lleva a cabo una producción constante y eficaz del monosacárido.

25 Según otro aspecto, es decir, en un proceso discontinuo, el proceso no incluye las etapas de añadir externamente sustancias durante el proceso de fermentación.

Según otro aspecto de la invención, el monosacárido se recupera del sobrenadante del microorganismo hospedador recombinante cultivado, sobrenadante que se obtiene centrifugando el microorganismo hospedador cultivado para obtener un sobrenadante y un sedimento de microorganismo hospedador.

30 Con el proceso recientemente proporcionado, es posible recuperar el monosacárido producido del medio en el que se cultiva el microorganismo hospedador, ya que el monosacárido que se produce en una célula de microorganismo se transporta en el medio, haciendo así fácilmente posible recuperar el monosacárido del sobrenadante, una vez las células del microorganismo se han separado del medio de cultivo.

35 Según otra realización preferida del proceso según la invención, antes de aislar el monosacárido en la etapa c), se añade una beta-galactosidasa al medio en el que se cultiva el microorganismo hospedador y/o se induce la producción endógena de una beta-galactosidasa en el microorganismo.

40 Por medio de esta característica puede lograrse que otros monosacáridos – además del monosacárido deseado –, cuyos otros monosacáridos se producen en el microorganismo durante la síntesis del monosacárido deseado, y cuyos otros monosacáridos interfieren con la etapa de purificación del monosacárido deseado, puedan ser metabolizados, de manera que la etapa de recuperación del monosacárido deseado sea adicionalmente mejorada y facilitada. Según la invención, esto puede lograrse induciendo una beta-galactosidasa de otro modo desregulada hacia el fin del proceso; esto significa que durante la síntesis del monosacárido deseado la beta-galactosidasa está desregulada y puede inducirse, por ejemplo por temperatura o añadiendo un inductor, por ejemplo tetraciclina, al final del proceso de fermentación. Alternativamente o además, la enzima beta-galactosidasa (o cualquier otra enzima metabolizadora de oligo- o monosacáridos) puede ser externamente añadida al medio al final del proceso según la invención, que es particularmente preferido cuando el gen endógeno que codifica beta-galactosidasa ha sido inactivado o delecionado. Como resultado, oligo- y o monosacáridos no deseados no pueden acumularse y no interfieren con la recuperación del monosacárido deseado. En este contexto, debe entenderse que, además de la beta-galactosidasa, otras enzimas metabólicas también pueden ser reguladas en la forma mencionada en el microorganismo con el fin de metabolizar de otro modo oligo- y monosacáridos no deseados interferentes, y un experto en la materia reconocerá fácilmente – tras la lectura de la invención – otras vías o enzimas adecuadas para regular/activar o suministrar, que dependerá del aceptor que va a degradarse.

"Beta-galactosidasa", como se usa en el presente documento y como generalmente es entendido dentro del campo de la invención, es una enzima hidrolasa que cataliza la hidrólisis de beta-galactósidos en monosacáridos.

"Regulado", dentro del presente contexto con referencia a un gen, se entiende generalmente como un gen cuya expresión puede ser regulada de una forma controlada, por ejemplo regulada por disminución o por incremento, es decir, la cantidad de la proteína sintetizada codificada por el gen regulado es diferente, por ejemplo desregulado/regulado por disminución o regulado por incremento, de la del gen de otro modo no regulado.

5 Añadiendo la enzima beta-galactosidasa al medio y/o el sobrenadante, el sustrato aceptor todavía presente en el medio puede escindirse - en caso donde se usa lactulosa: el enlace glucosídico de la lactulosa se escinde y son liberadas galactosa y fructosa - y los monosacáridos resultantes pueden ser eficazmente metabolizados por la cepa de *E. coli* usada. Así, el disacárido suministrado, preferentemente lactulosa o lactosa, puede ser eficientemente eliminado del medio de cultivo. En este caso, la beta-galactosidasa que está con el tiempo naturalmente presente en
10 el microorganismo, por ejemplo tal como *Escherichia coli*, puede inactivarse mediante una desactivación génica, o inactivación génica similar.

Por tanto, según otro aspecto de la invención, antes de recuperar el monosacárido del sobrenadante, el sobrenadante se trata con beta-galactosidasa y entonces se pone en contacto con los microorganismos hospedadores cultivados.

15 Según un aspecto de la invención, el proceso según la invención comprende las siguientes etapas:

a) proporcionar, en un medio adecuado para hacer crecer un microorganismo, un microorganismo hospedador recombinante que ha sido transformado para comprender a) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una glucosiltransferasa que no existe de forma natural en el microorganismo, y b) una secuencia de ácidos
20 nucleicos que codifica una glucosidasa que no existe de forma natural en dicho microorganismo, en el que el microorganismo es incapaz de metabolizar el monosacárido que va a producirse,

b) añadir un sustrato aceptor al medio en el que se cultiva el microorganismo hospedador, en el que el sustrato aceptor es un disacárido, preferentemente lactosa o lactulosa,

c) cultivar el microorganismo hospedador recombinante en dicho medio por el cual el monosacárido se produce en una forma libre,

25 d) recuperar el monosacárido libre del medio.

Como se ha mencionado anteriormente, y como ya se describió a propósito del proceso según la invención, la invención también se refiere a un microorganismo hospedador recombinante que se transforma que es capaz de crecer en una única fuente de carbono y contener a) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de glucosiltransferasa que no existe de forma natural en dicho microorganismo hospedador, y b) una secuencia de
30 ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de glucosidasa que no existe de forma natural en dicho microorganismo.

Las definiciones usadas y expuestas anteriormente para términos específicos a propósito del proceso también se aplican para el microorganismo recombinante presentado en el presente documento.

Según una realización preferida, el microorganismo - usado en el proceso según la invención y reivindicado en el presente documento - está seleccionado de una bacteria o una levadura, y más preferentemente, el microorganismo
35 hospedador es una cepa de *Escherichia coli* o una cepa de *Saccharomyces sp.*

La bacteria *Escherichia coli* y la levadura *Saccharomyces sp.* tienen la ventaja de que estos microorganismos pueden cultivarse fácilmente y económicamente en instalaciones de laboratorio, y las bacterias y levadura han sido ampliamente investigadas durante más de 60 años.

Por consiguiente, en una realización preferida, el microorganismo hospedador usado en el proceso según la invención y reivindicado de otro modo en el presente documento está seleccionado del grupo que consiste en
40 bacterias y levadura, y es preferentemente una cepa de *Escherichia coli*.

Se prefiere además en una realización de la presente invención si el microorganismo hospedador recombinante se transforma además para o bien carecer de un gen que codifica beta-galactosidasa - o bien comprender un gen que codifica beta-galactosidasa desregulada -, y L-fucosa isomerasa, L-fuculosa cinasa y UDP-glucosa:undecaprenil
45 fosfato glucosa-1-fosfato transferasa.

Esta realización tiene la ventaja que se previene la degradación intracelular del monosacárido producido L-fucosa y la producción de ácido colánico y en el caso de la beta-galactosidasa no se degrada la molécula aceptor.

En otra realización preferida, el microorganismo hospedador recombinante se transforma además para contener genes que permiten que el microorganismo hospedador recombinante crezca sobre sacarosa o glicerol como única
50 fuente de carbono, y es particularmente preferido si la agrupación de genes *csc* de *Escherichia coli* W (acc. N.º CP0021851) se integra en el genoma del microorganismo hospedador, cuya agrupación de genes comprende los genes de sacarosa permeasa, fructocinasa, sacarosa hidrolasa, y un represor transcripcional (genes *cscB*, *cscK*, *cscA* y *cscR*, respectivamente), que permiten que el microorganismo transformado crezca sobre sacarosa como única fuente de carbono.

Según una realización preferida del proceso o el microorganismo de la invención, y como se ha mencionado anteriormente, el ácido nucleico que codifica un polipéptido de glucosiltransferasa es una 2-fucosiltransferasa, y una 1,2-alfa-L-fucosidasa. Para la definición de esta enzima, véase anteriormente.

5 A este respecto, se observa que las realizaciones enumeradas como preferidas para el proceso según la invención se aplican todas para el microorganismo reivindicado, si procede.

10 Por consiguiente, la presente invención también se refiere al uso de un microorganismo que posee las siguientes actividades enzimáticas para la síntesis del monosacárido: i) una glucosiltransferasa específicamente capaz de transferir, a partir de un sustrato de monosacárido de nucleótidos activado, el monosacárido a un aceptor para formar un sustrato aceptor-monosacárido, y ii) una glucosidasa capaz de liberar el monosacárido del aceptor; en el que el microorganismo es incapaz de metabolizar el monosacárido, y la invención se refiere además al uso del microorganismo recombinante según la invención para la producción de un monosacárido, en particular de L-fucosa.

Se observa que las definiciones expuestas anteriormente para describir ciertos términos del proceso según la invención deben aplicarse al microorganismo, recombinante o no modificado, como se reivindica y describe en el presente documento.

15 Alternativamente, el método de producción de monosacáridos puede aplicarse en sistemas libres de células, por el cual las enzimas según la invención, el (los) sustrato(s) de aceptor, y, según sea el caso, otros componentes de la mezcla de reacción, que incluyen otras glucosiltransferasas y enzimas accesorias, se combinan por mezcla en un medio de reacción acuoso. Las enzimas pueden utilizarse libres en disolución, o pueden unirse o inmovilizarse a un soporte tal como un polímero y los sustratos pueden añadirse al soporte. El soporte puede estar relleno, por ejemplo, en una columna.

20 En particular, la presente invención se refiere a un proceso en el que una cepa de *Escherichia coli* recombinante se usa como microorganismo hospedador recombinante, en el que en la cepa de *Escherichia coli* recombinante el gen de L-fucosa isomerasa y el gen de L-fucosa cinasa han sido deletados, y en el que la cepa de *Escherichia coli* recombinante ha sido transformada para comprender a) genes que permiten que la cepa de *E. coli* crezca en sacarosa o glicerol como única fuente de carbono, codificando los genes, respectivamente, sacarosa permasa, fructocinasa, sacarosa hidrolasa y un represor transcripcional, b) un gen que codifica una 2-fucosiltransferasa, y c) un gen que codifica una 1,2-alfa-fucosidasa.

Ventajas adicionales siguen a partir de la descripción de las realizaciones y los dibujos adjuntos.

30 Huelga decir que las características anteriormente mencionadas y las características que deben todavía ser explicadas más adelante pueden usarse no solo en las combinaciones respectivamente especificadas, sino también en otras combinaciones o por sí mismas, sin apartarse del alcance de la presente invención.

Varias realizaciones de la invención se ilustran en las figuras y se explican en más detalle en la siguiente descripción. En las figuras:

35 La Fig. 1 muestra un dibujo esquemático de la vía/proceso empleado en la presente invención (A) y la parte esquemática esencial de la vía para la producción a modo de ejemplo de L-fucosa según la invención (B);

la Fig. 2 una tabla que enumera los cebadores de oligonucleótidos usados para generar fragmentos de ADN para generar el microorganismo según la invención;

40 la Fig. 3 un cromatograma (cromatografía en capa fina) que muestra la presencia de L-fucosa de la realización a modo de ejemplo en el sobrenadante de microorganismos según la invención, cultivados sobre sacarosa (A) o glicerol (B);

45 la Fig. 4 cromatogramas de HPLC que muestran la producción de L-fucosa por el microorganismo recombinante según la invención cultivado sobre glicerol (A) o sacarosa (B). Picos con los tiempos de retención 2,2 minutos, 4,6 minutos y 9,8 minutos se corresponden con L-fucosa, lactulosa y maltotriosa (patrón interno), respectivamente.

la Fig. 5 cromatogramas de HPLC que muestran el efecto de la adición de beta-galactosidasa al medio de fermentación, mostrando la Fig. 5A el cromatograma de HPLC de medio de fermentación antes de la adición de beta-galactosidasa, y mostrando la Fig. 5B el cromatograma de HPLC después de la adición de beta-galactosidasa; y

50 la Fig. 6 espectro de RMN ¹H de la L-fucosa purificada obtenida a partir de la fermentación bacteriana.

Ejemplos

Como se muestra esquemáticamente en la Fig. 1A, el proceso según la invención - y el microorganismo usado en el proceso - utiliza un monosacárido activado por nucleótido presente en el microorganismo, y transfiere - mediante la

actividad enzimática de la glucosiltransferasa - el resto de monosacárido a un aceptor - que puede estar endógenamente presente en el microorganismo y/o ser externamente suministrado - para formar un sustrato aceptor-monosacárido o complejo. Por actividad enzimática de la glucosidasa (hidrolasa), el monosacárido se libera del sustrato aceptor-monosacárido y puede ser recuperado en forma libre (véase la Fig. 1A).

5 Como un monosacárido a modo de ejemplo, se produjo L-fucosa a partir de sacarosa o de glicerol en una cepa de *Escherichia coli* recombinante. La Fig. 1B muestra una porción de la vía esquemática para la producción de L-fucosa. En el microorganismo, se sintetizó GDP-fucosa mediante la vía *de novo* y la lactulosa sirvió de aceptor de sustrato a modo de ejemplo, en una reacción catalizada por 2-fucosiltransferasa. La hidrólisis del enlace glucosídico por una 1,2- α -L-fucosidasa libera la L-fucosa (véase la Fig. 1B).

10 Desarrollo de la cepa de producción de L-fucosa de *E. coli*

Primero, se inactivó *lacZ* en BL21(DE3) de *E. coli* (Novagen) (véase la Fig. 2A Tabla 1) por mutagénesis usando oligonucleótidos de discordancia como se describe por Ellis *et al.*, 2001. Se amplificó el operón *gal* (*galETKM*) a partir de K12 TG1 de *E. coli* usando los cebadores 605 y 606 (todos los cebadores usados se enumeran en la Tabla 2 de la Fig. 2B) y se insertaron en el locus *galM ybhJ* de BL21(DE3) *lacZ* de *E. coli* por recombinación homóloga facilitada usando el plásmido auxiliar de recombinasa roja pKD46 (Datsenko y Warner, "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:6640-6645 (2000)). A continuación, se inactivó *araA* por mutagénesis de oligonucleótidos. En la cepa BL21(DE3) *lacZ Gal⁺araA* de *E. coli* se seleccionó el gen *wcaJ*. Se realizaron deleciones genómicas según el método de Datsenko y Warner ((2000), véase anteriormente). *WcaJ* probablemente codifica una UDP-glucosa:undecaprenil fosfato glucosa-1-fosfato transferasa que cataliza la primera etapa en la síntesis de ácido colánico (Stevenson *et al.*, "Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colonic acids, J. Bacteriol. 178:4885-4893; (1996)); la producción de ácido colánico competiría por la GDP-fucosa con la reacción de fucosiltransferasa. Para prevenir la degradación intracelular de L-fucosa, genes que codifican la L-fucosa isomerasa (*fucI*) y L-fuculosa cinasa (*fucK*) han sido deleccionados del genoma de la cepa BL21 (DE3) *lacZ Gal⁺araA Δ wcaJ* de *E. coli*.

Usando el plásmido pINT2-*lacY-aadA* (secuencia 1 del apéndice) como molde, se amplificó el gen transportador de lactosa *lacY*, originalmente de K12 TG1 de *E. coli* (acc. N.º ABN72583), junto con el promotor precedente P_{tet} y el gen de resistencia a estreptomicina flanqueado por el sitio FRT, con los cebadores 1119 y 1120. El producto de PCR resultante llevó en ambos sitios los sitios de reconocimiento del extremo del mosaico de 19 pb para la transposasa EZ-Tn5. Se usó el transposón EZ-Tn5 <P_{tet}-*lacY*-FRT-*aadA*-FRT> para producir un transposoma EZ-Tn5 con transposasa EZ-Tn5TM (Epicentre, EE.UU.), con el que se transformaron células electrocompetentes de BL21 (DE3) *lacZ Gal⁺araA Δ wcaJ Δ fucI Δ fucK* de *E. coli*. El gen de resistencia se eliminó de los clones de resistencia a estreptomicina por la FLP recombinasa codificada en el plásmido pCP20 (Datsenko y Warner, véase anteriormente). La agrupación de genes *csc* de *E. coli* W (acc. N.º CP002185.1) comprende cuatro genes para sacarosa permasa, fructocinasa, sacarosa hidrolasa, y un represor transcripcional (genes *cscB*, *cscK*, *cscA* y *cscR*, respectivamente), que permite que la cepa crezca sobre sacarosa como la única fuente de carbono. Esta agrupación de *csc* se integró en el genoma de la cepa que aloja BL21 (DE3) *lacY* de *E. coli* por transposición usando el plásmido pEcomar-*cscABKR* (secuencia 2 del apéndice). Los genes *csc* se flanquearon por las repeticiones terminales invertidas específicamente reconocidas por el elemento similar a marinero la transposasa *Himar1* (Bigot *et al.*, "Conservation of Palindromic and Mirror Motifs within Inverted Terminal Repeats of mariner-like Elements", J. Mol. Biol. 351:108-116 (2005)) que está codificado en pEcomar y se transcribe bajo el control de P_{araB}. Para la transposición mediada por las células de transposasa de marinero que alojan el plásmido respectivo, se cultivaron en medio 2^o YT (Sambrook y Russel, 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual) que contiene 100 μ g/ml de ampicilina y se indujeron con L-arabinosa 100 mM durante al menos 16 h a 30 °C. Los clones que contienen los casetes de transposón se seleccionaron en placas de M9-agar (Sambrook y Russel, véase anteriormente) que contenían 1 % de sacarosa, en el caso de inserción de la agrupación de *csc*, o en agar 2^o YT que contiene el antibiótico respectivo. BL21 (DE3):: (P_{tet}-*lacY*)(*cscBKAR*) *lacZ Gal⁺araA Δ wcaJ Δ fucI Δ fucK* de *E. coli* fue capaz de crecer sobre sacarosa como la única fuente de carbono. El gen de 2-fucosiltransferasa *wbgL* de *E. coli*:O126 (acc. N.º ADN43847) se optimizó en codones para la expresión en *E. coli* y se preparó sintéticamente por GenScript Cooperation (EE.UU.). Usando el plásmido pINT2-*wbgLco-neo* (secuencia 3 del apéndice) como molde, se amplificó el gen *wbgLco* junto con el promotor precedente P_{tet} y el gen de resistencia a kanamicina flanqueado por el sitio FRT con los cebadores 1119 y 1120; el transposón EZ-Tn5 <P_{tet}-*wbgLco*-FRT-*neo*-FRT> resultante se integró mediado por la transposasa EZ-Tn5TM.

Para potenciar la síntesis *de novo* de GDP-fucosa, se expresaron en exceso genes que codifican fosfomanomutasa (*manB*), manosa-1-fosfato guaniltransferasa (*manC*), GDP-manosa-4,6-deshidratasa (*gmd*) y GDP-L-fucosa sintasa (*wcaG*) de K12 DH5 α de *E. coli* en la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*; el operón *manCB* está bajo el control de P_{tet}, el operón *gmd*, *wcaG* se transcribió desde el promotor P_{T5}. El casete de transposón <P_{tet}-*manCB*-P_{T5}-*gmd*, *wcaG*-FRT-*dhfr*-FRT> se insertó de pEcomar C9-*manCB-gmd*, *wcaG-dhfr* (secuencia 4 del apéndice) mediado por el mutante C9 hiperactivo de la transposasa de marinero *Himar1* (Lampe *et al.*, "Hyperactive transposase mutants of the Himar1 mariner transposon", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:11428-11433 (1999)). Finalmente, el gen de 1,2- α -L-fucosidasa *afcA* (el codón se optimiza para la expresión en *E. coli* y se sintetiza por GeneScript Cooperación) de

Bifidobacterium bifidum se insertó como el transposón <P_{tet}-*afcAco*-FRT-*tet*-FRT> en la cepa por transposición usando pEcomar-*afcAco-tet* (secuencia 5 del apéndice) y la transposasa de marinero.

Condiciones de cultivo para la producción de L-fucosa

A: Uso de sacarosa como fuente de carbono

- 5 Se cultivó BL21 (DE3) *lacZ Gal⁺araA ΔwcaJ Δfucl ΔfucK::(P_{tet}-lacY)(cscBKAR)(P_{tet}-wgbLco-neo)(P_{tet}-manCB-P_{T5}-gmd, wcaG-dhfr)(P_{tet}-afcAco-tet)* de *E. coli* en un fermentador de 3 l (New Brunswick, Edison, EE.UU.) a partir de 800 ml de medio de sales minerales (Samain et al., "Production of O-acetylated and sulphated chitoooligosaccharides by recombinant Escherichia coli strains harbouring different combinations of nod genes", J. Biotech. 72:33-47 (1999)) que contenía 3 % de sacarosa como fuente de carbono y los antibióticos tetraciclina 7,5 µg/ml, kanamicina 15 µg/ml y trimetoprim 10 µg/ml. El cultivo se inició con un 2,5 % (v/v) de inóculo. Se añadió la lactulosa como aceptor en la reacción de fucosiltransferasa en varias etapas a una concentración final de 33,75 mM. El cultivo se alimentó continuamente con sacarosa. Las células se cultivaron en aproximadamente 66 h a una DO 660 nm de 141 y produjeron fucosa 366 mM (datos no mostrados).

B: Uso de glicerol como fuente de carbono

- 15 Se cultivó BL21 (DE3) *lacZ Gal⁺araA ΔwcaJ Δfucl ΔfucK::(P_{tet}-lacY)(cscBKAR)(P_{tet}-wgbLco-neo)(P_{tet}-manCB-P_{T5}-gmd, wcaG-dhfr)(P_{tet}-afcAco-tet)* de *E. coli* en un fermentador de 3 l (New Brunswick, Edison, EE.UU.) a partir de 800 ml de medio de sales minerales (Samain et al., véase anteriormente) que contenía 3 % de glicerol como fuente de carbono y los antibióticos tetraciclina 7,5 µg/ml, kanamicina 15 µg/ml y trimetoprim 10 µg/ml. El cultivo se inició con un 2,5 % (v/v) de inóculo. Se añadió la lactulosa como aceptor en la reacción de fucosiltransferasa en varias etapas a una concentración final de 31,5 mM. El cultivo se alimentó continuamente con glicerol. Las células se cultivaron en aproximadamente 64 h a una DO 660 nm de 212 y produjeron fucosa 78 mM (datos no mostrados).

Detección de L-fucosa

- 25 Se analizó el sobrenadante de las células en crecimiento por cromatografía en capa fina CCF usando placas de CCF de gel de sílice (gel de sílice 60). Se usó una mezcla de butanol:acetona:ácido acético:H₂O (35/35/7/23 (v/v/v/v)) como fase móvil. Para la detección de las sustancias separadas, la CCF se empapó con el reactivo timol (se disolvieron 0,5 g de timol en 95 ml de etanol, se añadieron 5 ml de ácido sulfúrico) y se calentó.

- 30 Se realizó análisis por cromatografía líquida de alta resolución usando un detector del índice de refracción (RID-10A) (Shimadzu, Alemania) y una columna Luna NH₂ (10 µm, 250 x 4,6 mm) (Phenomenex, EE.UU.) conectada a un sistema de HPLC (Shimadzu, Alemania). La elución se realizó isocráticamente con acetonitrilo:H₂O (80/20 (v/v)) como eluyente a 35 °C y un caudal de 3 ml/min. Se aplicaron 20 µl de la muestra a la columna. Se calculó la concentración de L-fucosa a partir de una curva patrón. Para esto se añadieron 10 % (v/v) de maltotriosa 100 mM a las muestras de HPLC como patrón interno antes de filtrarse (tamaño de poro 0,22 µm) y se aclararon por extracción en fase sólida en una matriz de intercambio iónico (Strata ABW, Phenomenex).

- 35 Se detectó L-fucosa en el sobrenadante de BL21 (DE3) *lacZ Gal⁺araA ΔwcaJ Δfucl ΔfucK::(P_{tet}-lacY)(cscBKAR)(P_{tet}-wgbLco-neo)(P_{tet}-manCB-P_{T5}-gmd, wcaG-dhfr)(P_{tet}-afcAco-tet)* de *E. coli* cultivado en sacarosa, y glicerol, respectivamente, usando lactulosa como aceptor, como se muestra por CCF (Fig. 3) y HPLC (Fig. 4 y 5).

- 40 La Fig. 3 muestra los resultados de la cromatografía en capa fina (CCF) para el microorganismo cultivado en glicerol (A) o cultivado en sacarosa (B) en presencia de lactulosa de sustrato aceptor: Carril 1 (ambas, Fig 3A y 3B): En el sobrenadante de BL21 (DE3) *lacZ Gal⁺araA ΔwcaJ Δfucl ΔfucK::(P_{tet}-lacY)(cscBKAR)(P_{tet}-wgbLco-neo)(P_{tet}-manCB-P_{T5}-gmd, wcaG-dhfr)(P_{tet}-afcAco-tet)* de *E. coli* se detectó L-fucosa por CCF como se verificó con sustancias de referencia auténticas (S: L-fucosa (Glucom, Dinamarca), lactulosa (Sigma, Alemania).

Carril 2 (ambas, Fig. 3A y Fig. 3B): Se hidrolizó enzimáticamente lactulosa y los monosacáridos resultantes se degradaron por la cepa BL21 (DE3) *lacZ Gal⁺araA ΔwcaJ Δfucl ΔfucK::(P_{tet}-lacY)(cscBKAR)(P_{tet}-wgbLco-neo)(P_{tet}-manCB-P_{T5}-gmd, wcaG-dhfr)(P_{tet}-afcAco-tet)* de *E. coli* a 37 °C.

- 45 La Fig. 4 muestra la producción de fucosa por BL21 (DE3) *lacZ Gal⁺araA ΔwcaJ Δfucl ΔfucK::(P_{tet}-lacY)(cscBKAR)(P_{tet}-wgbLco-neo)(P_{tet}-manCB-P_{T5}-gmd, wcaG-dhfr)(P_{tet}-afcAco-tet)* de *E. coli* como se ha determinado por HPLC, en la que en la Fig. 4A se muestra el sobrenadante de BL21 (DE3) *lacZ Gal⁺araA ΔwcaJ Δfucl ΔfucK::(P_{tet}-lacY)(cscBKAR)(P_{tet}-wgbLco-neo)(P_{tet}-manCB-P_{T5}-gmd, wcaG-dhfr)(P_{tet}-afcAco-tet)* de *E. coli* cultivado en glicerol; la muestra se tomó 64 h después del inicio de la fermentación. Picos con los tiempos de retención de 1,9, 2,1, 4,6 y 9,8 minutos se corresponden con glicerol, L-fucosa, lactulosa y maltotriosa (patrón interno), respectivamente. El método de medición de HPLC se describe anteriormente.

En la Fig. 4B se muestran los resultados del análisis de HPLC para el sobrenadante de BL21 (DE3) *lacZ Gal⁺araA ΔwcaJ Δfucl ΔfucK::(P_{tet}-lacY)(cscBKAR)(P_{tet}-wgbLco-neo)(P_{tet}-manCB-P_{T5}-gmd, wcaG-dhfr)(P_{tet}-afcAco-tet)* de *E. coli* cultivado en sacarosa; la muestra se tomó 66,3 h después del inicio de la fermentación. Picos con tiempos de

retención de 2,2, 4,6 y 9,8 minutos se corresponden con L-fucosa, lactulosa y maltotriosa (patrón interno), respectivamente. El método de medición de HPLC se describe anteriormente.

Hidrólisis de lactulosa por beta-galactosidasa y degradación de monosacáridos por la cepa BL21 (DE3) *lacZ Gal⁺araA ΔwcaJ Δfucl ΔfucK::(P_{tet}-lacY)(cscBKAR)(P_{tet}-wgbLco-neo)(P_{tet}-manCB-P_{T5}-gmd, wcaG-dhfr)(P_{tet}-afcAco-tet) de *E. coli**

5 Se obtuvo sobrenadante estéril de los cultivos productores de L-fucosa de la cepa BL21 (DE3) *lacZ Gal⁺araA ΔwcaJ Δfucl ΔfucK ΔnagB ΔnagA::(P_{tet}-lacY)(cscBKAR)(P_{tet}-wgbLco-neo)(P_{tet}-manCB-P_{T5}-gmd, wcaG-dhfr)(P_{tet}-afcAco-tet) de *E. coli* cultivada con sacarosa, y glicerol, respectivamente, por centrifugación y filtración (0,22 μm de tamaño de poro). Los sobrenadantes se diluyeron 1:10 en medio de sales minerales fresco. Se añadió beta-galactosidasa (comprada de Sigma Aldrich) a una concentración de 10 unidades ml⁻¹ y se realizó la hidrólisis a 37 °C durante 3 h. La cepa BL21 (DE3) *lacZ Gal⁺araA ΔwcaJ Δfucl ΔfucK::(P_{tet}-lacY)(cscBKAR)(P_{tet}-wgbLco-neo)(P_{tet}-manCB-P_{T5}-gmd, wcaG-dhfr)(P_{tet}-afcAco-tet) de *E. coli* se cultivó en medio rico en 2YT que contenía los antibióticos respectivos a 37 °C a una DO 660 nm de aproximadamente 5. Se recogieron células de 10 ml de cultivo en condiciones estériles por centrifugación y se resuspendieron en 2 ml del sobrenadante que contenía β-galactosidasa. Las células vivas degradaron los monosacáridos resultantes de la hidrólisis enzimática en 16 h a 37 °C.**

10 La Fig. 5 muestra el análisis de HPLC de la hidrólisis enzimática *in vitro* de lactulosa y la degradación de los monosacáridos por BL21 (DE3) *lacZ Gal⁺araA ΔwcaJ Δfucl ΔfucK::(P_{tet}-lacY)(cscBKAR)(P_{tet}-wgbLco-neo)(P_{tet}-manCB-P_{T5}-gmd, wcaG-dhfr)(P_{tet}-afcAco-tet) de *E. coli*, en la que la Fig. 5A muestra los resultados con el sobrenadante del cultivo cultivado en sacarosa (recogido a las 66,3 h); antes de que se añadiera la β-galactosidasa y después del tratamiento con beta-galactosidasa y degradación. Fig. 5B. Picos con tiempos de retención de 2,1, y 4,4 minutos se corresponden con L-fucosa y lactulosa, respectivamente.*

20 La Figura 6 muestra el espectro de RMN ¹H de la L-fucosa purificada obtenida por fermentación microbiana. Para la medición se disolvieron 20 mg de sustancia en 0,7 ml de DMSO deuterado.

25 Los resultados presentados muestran que con la cepa de microorganismos a modo de ejemplo el monosacárido L-fucosa a modo de ejemplo puede ser eficientemente producido en forma libre a gran escala.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Jennewein Biotechnologie GmbH

<120> Proceso de producción de monosacáridos

30

<130> 2827P105EP

<160> 4

35

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 35

<212> ADN

40

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

45

<400> 1

ES 2 640 978 T3

ttactcagca ataaactgat attccgtcag gctgg 35

<210> 2

<211> 86

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

10

<400> 2

ttgataatct cgcgctcttc agcagtcaga ctttccatat agagcgtaat ttccgttaac 60

gtcggtagtg ctgaccttgc cggagg 86

15 <210> 3

<211> 58

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> Cebador

<400> 3

ctgtctctta tacacatctc ctgaaattgg ccagatgatt aattcctaat tttgttg 58

25

<210> 4

<211> 50

<212> ADN

<213> Artificial

30

<220>

<223> Cebador

<400> 4

35 ctgtctctta tacacatctc agcattacac gcttgagcg attgtgtagg 50

REIVINDICACIONES

1. Proceso de producción de un monosacárido en forma libre usando un microorganismo, en el que el proceso comprende las etapas de:
- 5 a) proporcionar un microorganismo genéticamente manipulado que posee las siguientes actividades enzimáticas para la síntesis del monosacárido: i) una glucosiltransferasa específicamente capaz de transferir, a partir de un monosacárido de nucleótidos activado, el monosacárido a un sustrato aceptor para formar un sustrato aceptor-monosacárido, y ii) una glucosidasa capaz de liberar el monosacárido del sustrato aceptor; en el que el microorganismo es incapaz de metabolizar el monosacárido; en el que el microorganismo recombinante ha sido transformado para comprender al menos uno de i) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una glucosiltransferasa que no existe de forma natural en el microorganismo, y/o ii) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una glucosidasa que no existe de forma natural en dicho microorganismo,
- 10 b) cultivar el microorganismo en un medio adecuado para hacer crecer el microorganismo, por el cual el monosacárido se produce en una forma libre,
- c) recuperar el monosacárido libre del medio.
- 15 2. El proceso de la reivindicación 1, caracterizado por que el sustrato aceptor es endógeno a dicho microorganismo o se añade al medio en el que se cultiva el microorganismo.
3. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que el sustrato aceptor está seleccionado de un disacárido, preferentemente lactulosa o lactosa, un monosacárido, un polisacárido, una proteína glucosilada o un lipopolisacárido.
- 20 4. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el microorganismo se cultiva en un medio que contiene una fuente de carbono que está seleccionada de glicerol, sacarosa, melaza, xilosa, celulosa, gas de síntesis.
5. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque, el proceso es un proceso discontinuo o continuo.
- 25 6. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que el monosacárido se recupera de sobrenadante del microorganismo cultivado, sobrenadante que se obtiene centrifugando el microorganismo hospedador cultivado para obtener un sobrenadante y un sedimento de microorganismo.
7. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que antes de recuperar el monosacárido en la etapa c), se añade una beta-galactosidasa al medio en el que se cultiva el microorganismo hospedador, y/o se induce la producción endógena de una beta-galactosidasa en el microorganismo.
- 30 8. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque, antes de recuperar el monosacárido del sobrenadante, el sobrenadante se trata con beta-galactosidasa y entonces se pone en contacto con los microorganismos hospedadores cultivados.
9. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el monosacárido producido está seleccionado de L-fucosa, glucosa, fructosa, galactosa, xilosa y ribosa.
- 35 10. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
- a) proporcionar, en un medio adecuado para hacer crecer un microorganismo, un microorganismo hospedador recombinante que ha sido transformado para comprender a) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una glucosiltransferasa que no existe de forma natural en el microorganismo, y b) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una glucosidasa que no existe de forma natural en dicho microorganismo, en el que el microorganismo es incapaz de metabolizar el monosacárido que va a producirse,
- 40 b) añadir un sustrato aceptor al medio en el que se cultiva el microorganismo hospedador, en el que el sustrato aceptor es un disacárido, preferentemente lactosa o lactulosa,
- 45 c) cultivar el microorganismo hospedador recombinante en dicho medio por el cual el monosacárido se produce en una forma libre,
- d) recuperar el monosacárido libre del medio.
11. Microorganismo hospedador recombinante que se transforma para ser capaz de crecer sobre un única fuente de carbono y para contener a) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de fucosiltransferasa que no existe de forma natural en dicho microorganismo hospedador, y b) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de fucosidasa que no existe de forma natural en dicho microorganismo.
- 50

12. El microorganismo hospedador recombinante según la reivindicación 11, caracterizado por que el microorganismo hospedador recombinante se transforma además para carecer de un gen que codifica L-fucosa isomerasa, L-fuculosa cinasa y UDP-glucosa:undecaprenil fosfato glucosa-1-fosfato transferasa.
- 5 13. El microorganismo hospedador recombinante según la reivindicación 11 o 12, caracterizado por que se transforma además para contener genes que permiten que el microorganismo hospedador recombinante crezca sobre sacarosa o glicerol.
14. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o microorganismo hospedador recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, caracterizado por que el microorganismo está seleccionado de una bacteria y una levadura.
- 10 15. El proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o microorganismo hospedador recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, caracterizado por que el microorganismo hospedador es una cepa de *Escherichia coli* o una cepa de *Saccharomyces sp.*
- 15 16. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o 14 y 15, o el microorganismo hospedador recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, caracterizado por que el ácido nucleico que codifica una glucosiltransferasa es una fucosiltransferasa bacteriana.
17. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y 14 a 16, o el microorganismo hospedador recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, caracterizado por que el ácido nucleico que codifica un polipéptido de glucosidasa es una 1,2-alfa-L-fucosidasa bacteriana.
- 20 18. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y 14 a 17, caracterizado por que se usa una cepa de *Escherichia coli* recombinante como microorganismo hospedador recombinante, para la producción de L-fucosa, en el que en la cepa de *Escherichia coli* recombinante los genes que codifican beta-galactosidasa, L-fucosa isomerasa, L-fuculosa cinasa y UDP-glucosa:undecaprenil fosfato glucosa-1-fosfato transferasa, han sido deletados o desregulados, y en el que la cepa de *Escherichia coli* recombinante ha sido transformada para comprender a) genes que permiten que la cepa de *Escherichia coli* crezca sobre sacarosa como la única fuente de carbono, codificando los genes, respectivamente, sacarosa permasa, fructocinasa, sacarosa hidrolasa y un represor transcripcional, b) un gen que codifica una 2-fucosiltransferasa, y c) un gen que codifica una 1,2-alfa-fucosidasa.
- 25 19. Uso de un microorganismo transformado para poseer las siguientes actividades enzimáticas para la síntesis de un monosacárido: i) una glucosiltransferasa específicamente capaz de transferir, a partir de un sustrato de monosacárido de nucleótidos activado, el monosacárido a un aceptor para formar un sustrato aceptor-monosacárido, y ii) una glucosidasa capaz de liberar el monosacárido del aceptor; en el que el microorganismo es incapaz de metabolizar el monosacárido, en la producción de un monosacárido seleccionado de glucosa, fructosa, galactosa, xilosa y ribosa.
- 30 20. Uso de un microorganismo transformado para poseer las siguientes actividades enzimáticas para la síntesis de un monosacárido: i) una glucosiltransferasa específicamente capaz de transferir, a partir de un sustrato de monosacárido de nucleótidos activado, el monosacárido a un aceptor para formar un sustrato aceptor-monosacárido, y ii) una glucosidasa capaz de liberar el monosacárido del aceptor; en el que el microorganismo es incapaz de metabolizar el monosacárido, en el que el microorganismo hospedador recombinante es cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en la producción de L-fucosa.
- 35

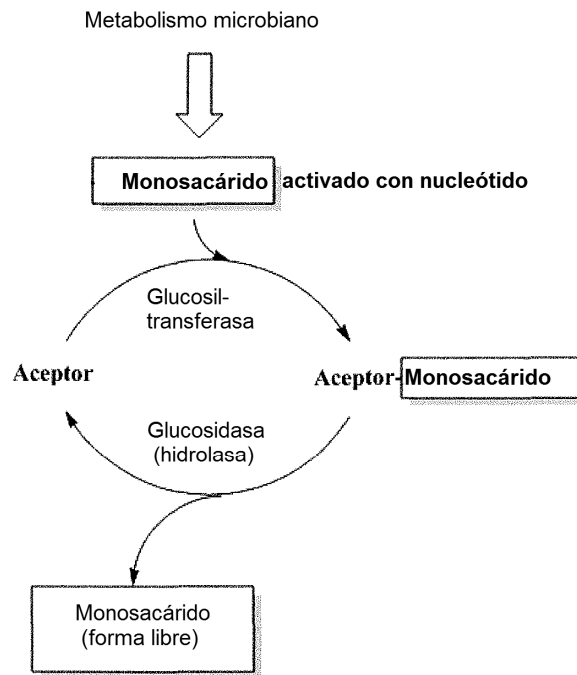


Fig. 1A

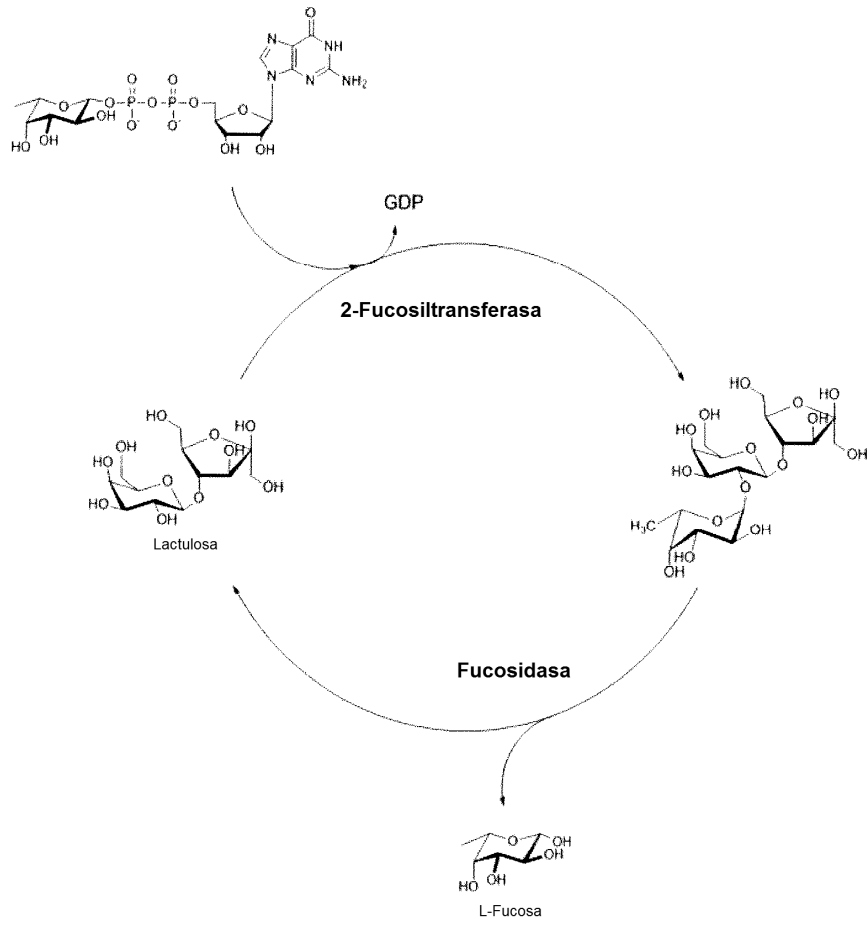


Fig. 1B

| cebador | Secuencia (5' - 3') |
|----------------|---|
| 605 | TTACTCAGCAATAAACTGATATTCCGTCAGGCTGG (SEQ ID NO. 1) |
| 606 | TTGATAATCTCGCGCTCTTCAGCAGTCAGACTTTCCATATAGAGCGTAATTTCCG TTAACGTCGGTAGTGCTGACCTTGCCGGAGG (SEQ ID NO. 2) |
| 1119 | CTGTCTCTTATACACATCTCCTGAAATTGGCCAGATGATTAATTCCTAATTTTTGTT G (SEQ ID NO. 3) |
| 1120 | CTGTCTCTTATACACATCTCAGCATTACACGTCTTGAGCGATTGTGTAGG (SEQ ID NO. 4) |

Fig. 2

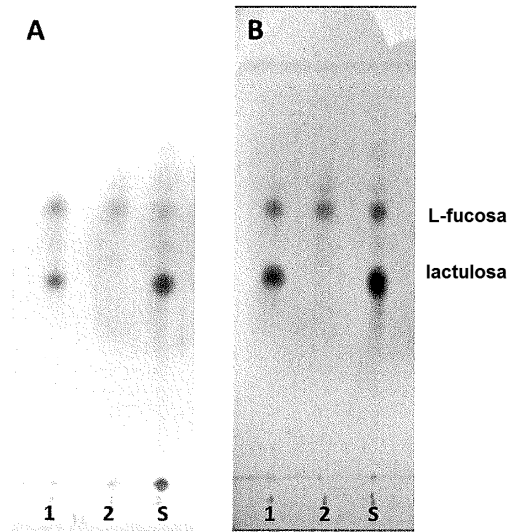


Fig. 3

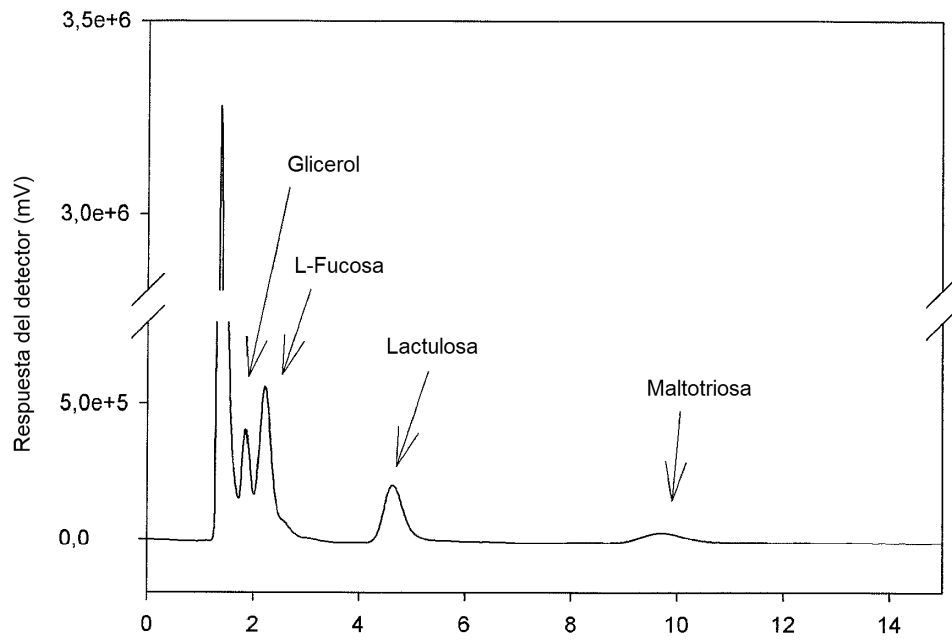


Fig. 4A

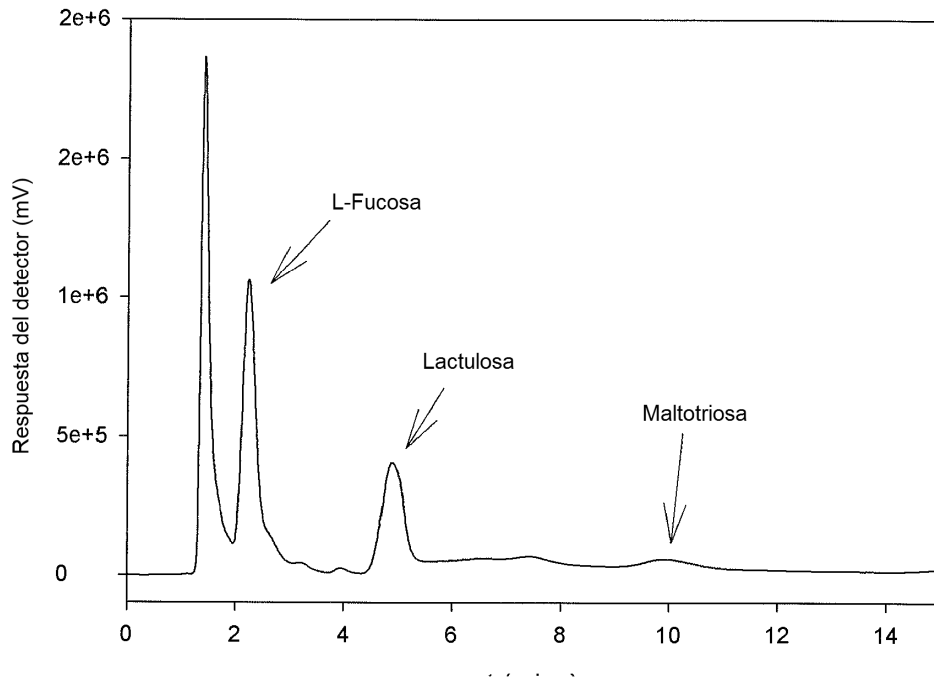


Fig. 4B

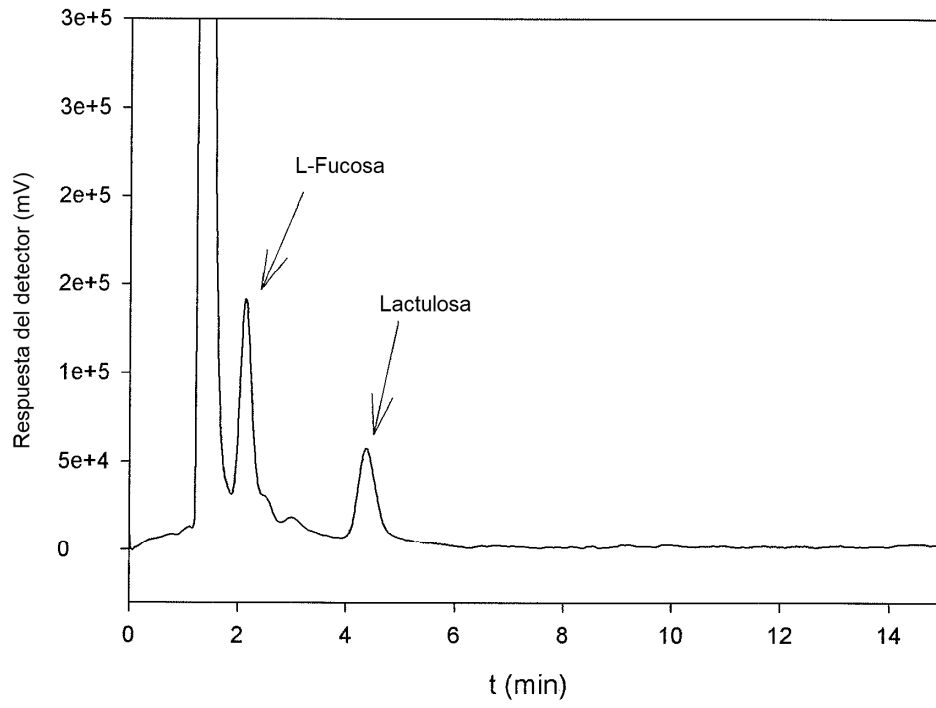


Fig. 5A

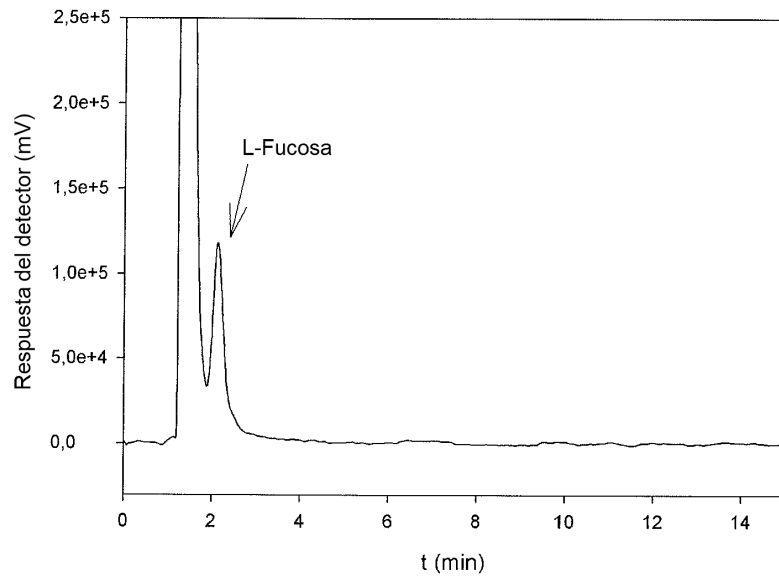


Fig. 5B

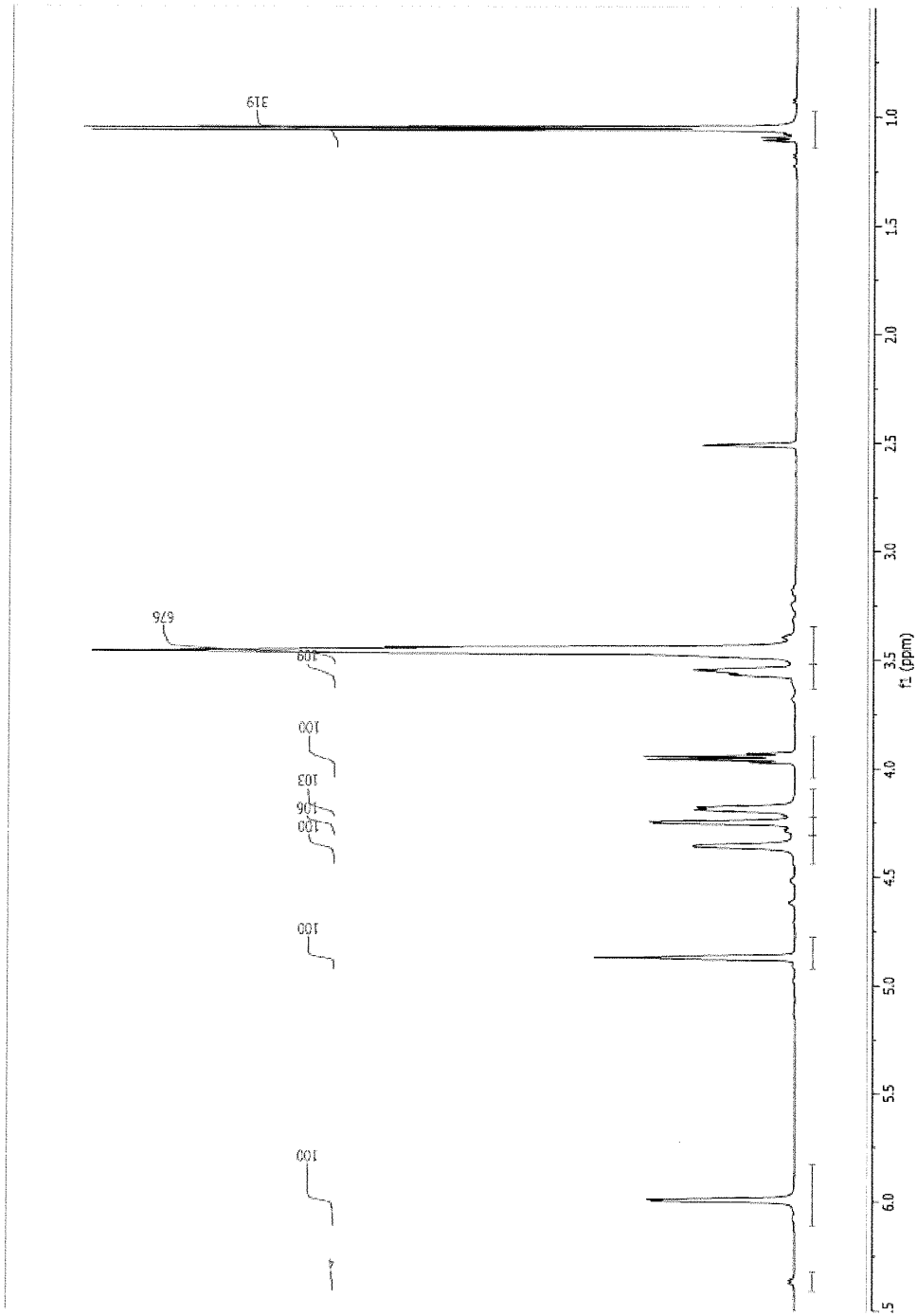


Fig. 6