(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 585 203**

(51) Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01)
C12P 19/18 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.02.2007** **E 07734270 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.05.2016** **EP 1981914**

(54) Título: **Construcción de variantes nuevas de dextransacarasa DSR-S mediante ingeniería genética**

(30) Prioridad:

08.02.2006 FR 0601117

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.10.2016

(73) Titular/es:

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (33.3%)
3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cedex 16, FR;
INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE TOULOUSE (33.3%) y
INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE AGRONOMIQUE (33.3%)

(72) Inventor/es:

MONSAN, PIERRE;
REMAUD-SIMEON, MAGALI;
POTOCKI-VERONESE, GABRIELLE y
MOULIS, CLAIRE

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 585 203 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

Construcción de variantes nuevas de dextransacarasa DSR-S mediante ingeniería genética

La presente invención se refiere a un proceso recombinante para la producción de dextransacarasas truncadas y/o mutadas a la vez que conservan su actividad enzimática y/o conservan su especificidad para sintetizar enlaces α-1, 6. Más exactamente, la presente invención se refiere a secuencias de ácidos nucleicos de dextransacarasas truncadas o mutadas, vectores que contienen dichas secuencias de ácidos nucleicos y células hospedadoras transformadas mediante secuencias que codifican dextransacarasas truncadas o mutadas. En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para producir, de una manera recombinante, dextransacarasas truncadas y/o mutadas que conservan su actividad enzimática y/o conservan su especificidad para sintetizar enlaces α-1, 6 en el producto final, y a métodos para producir dextranos o isomalto-oligosacáridos, en una única etapa, con una masa molar controlada y dextranos con propiedades reológicas modificadas, especialmente en comparación con las propiedades de los dextranos obtenidos con la enzima nativa.

Campo de la invención

Los dextranos son α-D-glucanos con diversas estructuras, que comprenden unidades glicosilo contiguas, de las cuales más de un 50% tienen enlaces α-1,6 en la cadena principal y ramificaciones α-1,2, α-1,3 y/o α-1,4 [1]. Las enzimas que producen tales dextranos a partir de sacarosa se denominan dextransacarasas, y pertenecen a la familia de glicósido hidrolasas 70 [2]. Durante la reacción, la fructosa obtenida a partir de la sacarosa se libera y se puede modificar en otra parte. Las dextransacarasas son producidas por bacterias lácticas de los géneros *Leuconostoc, Streptococcus* y *Lactobacillus* [1].

La dextransacarasa (DSR-S) de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F contiene 1.527 aminoácidos [3]: Esta enzima cataliza la síntesis de homopolímeros de glucosa con más de un 95% de enlaces α-1,6. La producción de dextrano se puede redirigir hacia la de oligosacáridos o conjugados glucosilados añadiendo un aceptor adecuado a la mezcla de reacción [4].

El número de aplicaciones industriales para los dextranos y los derivados de dextranos está creciendo, en particular para los dextranos con un tamaño específico. Los dextranos con un tamaño en el intervalo de 70.000 a 100.000 Da se usan, por ejemplo, como un sustituto del plasma [5, 31]. Además, el dextrano de 40.000 Da se usa para mejorar el flujo sanguíneo, muy probablemente reduciendo la viscosidad de la sangre e inhibiendo la agregación eritrocitaria [6,8]. Tras la sulfatación, los dextranos más pequeños de alrededor de 10.000 daltons, por ejemplo, se usan como transportadores de hierro [7] o anticoagulantes [8]. Esos compuestos pueden tener propiedades antivirales [9, 10].

Además, los derivados de dextranos reticulados se han usado durante mucho tiempo en el campo de la separación molecular; se han comercializado soportes de cromatografía con el nombre comercial Sephadex® desde 1961 [6].

Además, la Unión Europea ha aprobado recientemente el uso de dextrano como ingrediente alimentario en productos de panadería cuando contienen más de un 95% de enlaces α-1,6 y tienen una masa molar de más de 2 x 10^6 Da [15].

La dextransacarasa puede producir también isomalto-oligosacáridos (IMO) por medio de una reacción de aceptor. Las reacciones de aceptor llevadas a cabo por las glucansacarasas consisten en la transferencia de residuos de glucosilo de sacarosa a otras moléculas añadidas al medio de reacción. Esto tiene un interés comercial creciente, en particular en Japón, en donde la demanda de isomalto-oligosacáridos representa alrededor de quince mil toneladas por año [11]. Tales IMOs pequeños (GP 2 a 6) se usan en artículos de panadería, para bebidas, en el sake, en condimentos, en pastelería y como edulcorantes anticariogénicos. También se ha demostrado que dichos IMOs tienen propiedades prebióticas que son útiles con respecto a la flora intestinal y/o vaginal [12, 13]. Estas propiedades parecen variar con el tamaño de los IMOs, y se favorecen mediante grados elevados de polimerización [14].

La única fuente comercial y habitual de dextranos consiste en el cultivo de *L. mesenteroides* NRRL B-512F con sacarosa, que conduce a la formación de polímeros de masa molar elevada de alrededor de 10^8 Da. La síntesis directa de dextranos más pequeños de 10000 a 100000 Da es imposible actualmente. Los dextranos se producen actualmente de manera convencional mediante la hidrólisis ácida de polímeros nativos de masa molar elevada, seguida por el fraccionamiento mediante el uso de disolventes orgánicos. Esta segunda etapa, sin embargo, es famosa por sus bajos rendimientos [19].

Desde un punto de vista comercial, los IMOs de GP 2 a 6 no se producen mediante una reacción de aceptor con dextransacarasa DSR-S y glucosa debido a los bajos rendimientos de la reacción, sino a partir de hidrolizados de almidón y una mezcla de α-amilasas y glucosidasas [11].

Monchois et al [16] describen deleciones carboxi-terminales de la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F y concluyen que el papel del dominio C-terminal es facilitar la transferencia de dextrano y oligosacáridos fuera del sitio activo.

La patente de Estados Unidos US-A-5.229.277 describe un proceso para producir polímeros de dextrano que tienen

una masa molar baja homogénea mediante el uso de *Leuconostoc mesenteroides* y un microorganismo mutante de *Lipomyces starkeyi* ATCC 74054, que es una levadura que tiene actividad dextranasa, una enzima específica de la hidrólisis de enlaces α-1,6 de dextrano. Ese método requiere condiciones de cultivo particulares y una duración y temperatura reguladas con exactitud, de forma que la actividad dextranasa reduzca la masa molar de los dextranos. Los polímeros de dextrano producidos mediante ese método tienen una masa molar en el intervalo de 40.000 y 150.000 Da.

Argüllo-Morales et al., ANTONIE VAN LEEUWENHOEK, vol. 87 nº 2 (febrero de 2005) págs. 131-141 describen dos formas activas de dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* B-512 que tienen pesos moleculares de 155 y 129 kDA. Estas dextransacarasas surgen de la escisión proteolítica de un precursor de 170 kDA, y se comportan en las disoluciones como fluidos newtonianos.

Lo anterior demuestra que existe una necesidad de producción de dextranos con una masa molar de alrededor de 10.000 a 100.000 Da mediante el uso de un método más rápido con un mejor rendimiento, que no requiera en particular ni hidrólisis ácida ni fraccionamiento.

La presente invención se refiere a dextransacarasas producidas de manera recombinante, que están truncadas y/o mutadas, a la vez que conservan su actividad enzimática y/o conservan su especificidad para sintetizar enlaces α-1, 6, o variantes truncadas de dextransacarasa que producen dextranos con una masa molar controlada. Más exactamente, conservan la especificidad de unión de la DSR-S nativa y/o conservan su especificidad para sintetizar enlaces α-1, 6 y, partiendo de sacarosa, producen dextranos de masa molar elevada con propiedades texturizantes interesantes y/o dextranos e IMOs con una masa molar controlada.

La presente invención también se refiere a proporcionar secuencias de ácidos nucleicos de dextransacarasa truncada y/o mutada, vectores y células hospedadoras transformadas mediante dichos vectores, y secuencias de aminoácidos de dextransacarasas truncadas y/o mutadas.

En particular, como será evidente a partir de los Ejemplos, ciertas dextransacarasas producen polímeros con propiedades texturizantes interesantes, es decir, sustancialmente superiores a las del polímero producido mediante la enzima nativa; otras producen dextranos e isomalto-oligosacáridos con una masa molar controlada. La isomaltosa se produce mediante al menos una dextransacarasa truncada y mutada.

Los aspectos adicionales de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción y Ejemplos, o de las implementaciones preferidas.

Compendio de la invención

En un primer aspecto, como se describe en la presente memoria, se describe una secuencia de nucleótidos de o que consiste en una secuencia de nucleótidos según la Figura 1 (SEQ ID Nº: 1), una secuencia de nucleótidos según la Figura 2 (SEQ ID Nº: 2), una secuencia de nucleótidos según la Figura 3 (SEQ ID Nº: 3), una secuencia de nucleótidos según la Figura 4 (SEQ ID Nº: 4), una secuencia de nucleótidos según la Figura 5 (SEQ ID Nº: 5), una secuencia complementaria de una de las secuencias con SEQ ID Nº: 1, 2, 3, 4 o 5 o una secuencia que hibrida con una secuencia con SEQ ID Nº: 1, 2, 3, 4 o 5 en condiciones de hibridación rigurosas, con tal de que conserve la actividad enzimática de dextransacarasa.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a secuencias de nucleótidos de dextransacarasa que consisten en una secuencia de nucleótidos seleccionada del fragmento de SEQ ID Nº: 1 de la posición 373 a la posición 4269 (SEQ ID Nº: 17), el fragmento de la secuencia SEQ ID Nº: 2 de la posición 373 a la posición 4005 (SEQ ID Nº:18), el fragmento de la secuencia SEQ ID Nº: 3 de la posición 373 a la posición 3408 (SEQ ID Nº:19), el fragmento de la secuencia SEQ ID Nº: 4 de la posición 373 a la posición 3018 (SEQ ID Nº:20), y el fragmento de la secuencia SEQ ID Nº: 5 de la posición 373 a la posición 4269 (SEQ ID Nº:21).

También se refiere a secuencias de nucleótidos que consisten en una secuencia de nucleótidos seleccionada de una secuencia de nucleótidos complementaria de longitud completa del fragmento de SEQ ID Nº: 1 del nucleótido de la posición 373 al de la posición 4269, una secuencia de nucleótidos complementaria de longitud completa del fragmento de SEQ ID Nº: 2 del nucleótido de la posición 373 al de la posición 4005, una secuencia de nucleótidos complementaria del fragmento de SEQ ID Nº: 3 del nucleótido de la posición 373 al de la posición 3408, una secuencia de nucleótidos complementaria de longitud completa del fragmento de SEQ ID Nº: 4 del nucleótido de la posición 373 al de la posición 3018 y una secuencia de nucleótidos complementaria de longitud completa al fragmento de SEQ ID Nº: 5 del nucleótido de la posición 373 al de la posición 4269.

También se refiere a secuencias de nucleótidos que hibridan en condiciones rigurosas con una secuencia de nucleótidos seleccionada del fragmento de la secuencia SEQ ID Nº: 1 de la posición 373 a la posición 4269, el fragmento de la secuencia SEQ ID Nº: 2 de la posición 373 a la posición 4005, el fragmento de la secuencia SEQ ID Nº: 3 de la posición 373 a la posición 3408, el fragmento de la secuencia SEQ ID Nº: 4 de la posición 373 a la posición 3018, y el fragmento de la secuencia SEQ ID Nº: 5 de la posición 373 a la posición 4269, con tal de que conserven la actividad enzimática de dextransacarasa, y dichas secuencias de nucleótidos que hibridan con él tienen el mismo número de nucleótidos e hibridan a lo largo de la longitud completa del fragmento.

En la presente memoria se describen secuencias de nucleótidos que codifican una proteína que consiste básicamente o que consiste en secuencias de aminoácidos consecutivos de cualquiera de SEQ ID Nºs:6 a 10 o 22 a 26.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a vectores, por ejemplo plásmidos, y células hospedadoras transformadas mediante dichos vectores y que contienen dicha secuencia de ácidos nucleicos de dextransacarasa truncada y/o mutada, en particular las variantes de los Ejemplos.

En un aspecto adicional de la presente invención, la presente invención se refiere a una proteína codificada mediante dicha secuencia de nucleótidos de dextransacarasa truncada y/o mutada seleccionada del fragmento de SEQ ID Nº: 6 del aminoácido de la posición 125 al aminoácido de la posición 1423 (SEQ ID Nº: 22), el fragmento de SEQ ID Nº: 7 del aminoácido de la posición 125 al aminoácido de la posición 1335 (SEQ ID Nº: 23), el fragmento de SEQ ID Nº: 8 del aminoácido de la posición 125 al aminoácido de la posición 1136 (SEQ ID Nº: 24), el fragmento de SEQ ID Nº: 9 del aminoácido de la posición 125 al aminoácido de la posición 1006 (SEQ ID Nº: 25), y el fragmento de SEQ ID Nº: 10 del aminoácido de la posición 125 al aminoácido de la posición 1423 (SEQ ID Nº: 26).

Además, la invención se refiere a una dextransacarasa truncada y/o mutada que consiste básicamente o que consiste en una de las secuencias descritas en la presente memoria, en particular seleccionadas del fragmento de SEQ ID Nº: 6 del aminoácido de la posición 125 al aminoácido de la posición 1423 (SEQ ID Nº:22), el fragmento de SEQ ID Nº: 7 del aminoácido de la posición 125 al aminoácido de la posición 1335 (SEQ ID Nº:23), el fragmento de SEQ ID Nº: 8 del aminoácido de la posición 125 al aminoácido de la posición 1136 (SEQ ID Nº:24), el fragmento de SEQ ID Nº: 9 del aminoácido de la posición 125 al aminoácido de la posición 1006 (SEQ ID Nº:25), y el fragmento de SEQ ID Nº: 10 del aminoácido de la posición 125 al aminoácido de la posición 1423 (SEQ ID Nº:26).

En un aspecto adicional, la invención se refiere a la preparación de una dextransacarasa mutada y/o truncada mediante el cultivo de células hospedadoras que contienen una dextransacarasa truncada y/o mutada en condiciones que permiten la expresión de una dextransacarasa, y aislando dicha dextransacarasa del medio de cultivo.

En la presente memoria se describe un método para producir dextranos y/o isomalto-oligosacáridos (IMO) con una masa molar controlada haciendo reaccionar una dextransacarasa mutada y/o truncada con sacarosa y opcionalmente un aceptor, para obtener dichos dextranos o IMO con una masa molar controlada, que incluye isomaltosa.

También se describe un método para la producción directa de IMOs básicamente a partir de sacarosa. El término "básicamente", tal como se usa en la presente memoria, significa que no es necesario emplear el aceptor en la reacción.

Los dextranos de masa molar elevada tienen propiedades reológicas modificadas en comparación con las del dextrano sintetizado mediante una enzima nativa, en particular una naturaleza no newtoniana, fibrosa y/o gelificante.

Finalmente, se describen composiciones que comprenden los dextranos obtenidos mediante el uso de dichas dextransacarasas y el uso de dichas dextransacarasas para la producción de dextranos e isomalto-oligosacáridos con una masa molar controlada en el intervalo de 342 y 10^9 Da. Más exactamente, también se describen (i) isomaltosa (342 Da), (ii) isomalto-oligosacáridos de 342 a 5.000 Da, (iii) dextranos con un tamaño controlado de 1.300 a 52.000 Da, más exactamente 5.000 a 22.000 Da, y centrados en alrededor de 10.000 Da, (iv) dextranos con un tamaño controlado de 7.000 a 1,7 x 10^5 Da, más exactamente entre 22.000 y 70.000 Da, centrados en alrededor de 40.000 Da.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos y nucleótidos de una dextransacarasa DSR-S vardel Δ4N truncada con un marcador de tiorredoxina en la posición 5' terminal de la secuencia y marcadores de 6 histidinas en la posición 3' terminal de la secuencia, así como brazos espaciadores entre los marcadores proteicos y la secuencia que codifica la dextransacarasa.

La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos y nucleótidos para una DSR-S vardel Δ3 truncada con un marcador de tiorredoxina en la posición 5' terminal de la secuencia y marcadores de 6 histidinas en la posición 3' terminal de la secuencia, y brazos espaciadores entre los marcadores proteicos y la secuencia que codifica la dextransacarasa.

La Figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos y nucleótidos para una DSR-S vardel Core truncada con un marcador de tiorredoxina en la posición 5' terminal de la secuencia y marcadores de 6 histidinas en la posición 3' terminal de la secuencia, y brazos espaciadores entre los marcadores proteicos y la secuencia que codifica la dextransacarasa.

La Figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos y nucleótidos para una DSR-S Core ΔA truncada con un marcador de tiorredoxina en la posición 5' terminal de la secuencia y marcadores de 6 histidinas en la posición 3' terminal de la

secuencia, y brazos espaciadores entre los marcadores proteicos y la secuencia que codifica la dextransacarasa.

La Figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos y nucleótidos para una DSR-S vardel Δ4N mutante SEV663YDA con un marcador de tiorredoxina en la posición 5' terminal de la secuencia y un marcador de 6 histidinas en la posición 3' terminal de la secuencia, y brazos espaciadores entre los marcadores proteicos y la secuencia que codifica la dextransacarasa.

La Figura 6 es una representación esquemática de las variantes truncadas de DSR-S y su actividad relativa. Los cuatro dominios diferentes (i) a (iv) de DSR-S corresponden a: (i) péptido señal, (ii) región variable; (iii) dominio catalítico y (iv) dominio C-terminal, así como las unidades repetitivas A, C y N (en las cajas sombreadas) localizadas de acuerdo con Monchois et al, 1998 [16].

La Figura 7 (A, B) muestra transferencias de Western anti-tiorredoxina (A) y anti-6xHis (B) llevadas a cabo con una DSR-S vardel Δ4N producida mediante *E. coli* TOP10 a 23 °C.

La Figura 8 muestra un gel de electroforesis después de teñir las proteínas con azul coloidal en extractos de DSR-S vardel Δ4N durante la purificación de afinidad con una resina de níquel (Probond, Invitrogen). El carril 1 corresponde al sobrenadante de sonicación de *E. coli* TOP10 al final del cultivo; el carril 2 corresponde al efluente obtenido tras la unión de las proteínas marcadas con 6xHis a la resina, el carril 3 corresponde a la fracción de elución y el carril 4 corresponde a la fracción de elución después de eliminar los agregados.

La Figura 9 muestra los perfiles de elución obtenidos mediante HPSEC de dextranos producidos mediante la preparación de a) DSR-S nativa de *L. mesenteroides* NRRL B-512F, b) DSR-S recombinante completa, c) DSR-S vardel Δ4N antes de la purificación y d) DSR-S vardel Δ4N purificada. El pico 1 corresponde al polímero de masa molar elevada (MME), el pico 2 a fructosa, glucosa y oligosacáridos con un GP menor que 7, no separados por el sistema. Entre esos dos picos, las perturbaciones de la línea base reflejan la presencia de dextranos con un tamaño intermedio (entre 10^3 y 10^7 Da) a una concentración muy baja.

La Figura 10A-E muestra los espectros obtenidos mediante RMN de protón con dextranos sintetizados mediante A) DSR-S nativa de *L. mesenteroides* NRRL B-512F, B) la DSR-S recombinante completa, C) DSR-S vardel Δ4N antes de la purificación y D) DSR-S vardel Δ4N después de la purificación. El espectro E) es un espectro de carbono-13 del dextrano sintetizado mediante DSR-S vardel Δ4N purificada.

La Figura 11 corresponde al cromatograma de HPAEC-PAD de los productos de digestión mediante el uso de endodextranasa (dasa) de los cuatro dextranos sintetizados mediante DSR-S nativa, DSR-S recombinante completa y DSR-S vardel Δ4N, antes y después de la purificación.

La Figura 12 muestra el comportamiento reológico de cuatro dextranos sintetizados mediante DSR-S nativa (1) antes y (2) después de una tensión de corte, DSR-S recombinante completa (3) antes y (4) después de la aplicación de una segunda serie de tensiones de corte, DSR-S vardel Δ4N (6) antes y (7) después de la aplicación de una segunda serie de tensiones de corte, DSR-S vardel Δ4N purificada (5) en la que A) representa la medida de la viscosidad en flujo, B) medidas de la viscosidad en modo dinámico (oscilaciones entre 0 y 10 Pa), antes de determinar los módulos de conservación G' y disipación G" de energía para los dextranos sintetizados mediante las preparaciones de DSR-S vardel Δ4N sin purificar (° y ●; comportamiento de tipo disolución, G'< G"; a un 5% de deformación) y preparación purificada (□ y ■; comportamiento de tipo gel G' > G"; 0,4% de deformación).

La Figura 13 muestra un cromatograma de HPAEC-PAD de los productos sintetizados mediante DSR-S vardel Δ4N mutante SEV663YDA con 100 g/l de sacarosa sola (A) o mediante una reacción de aceptor con 100 g/l de sacarosa y 50 g/l de glucosa (B). El símbolo G significa glucosa, F: fructosa, I_2: isomaltosa, I3: isomaltotriosa, N/M: nigerosa o maltosa (no separadas por el sistema de HPAEC-PAD), y el símbolo "?" corresponde a los productos con una estructura desconocida.

La Figura 14 muestra el cromatograma de HPSEC de dextranos sintetizados mediante DSR-S vardel Δ3 a 20 °C y 10 °C. Las flechas corresponden a los tiempos de retención de dextranos comerciales de 2 x 10^6 Da, 70.000 y 10.000 Da que sirvieron como referencias.

La Figura 15 muestra el cromatograma de HPSEC de dextranos sintetizados a 20 °C con 100 g/l de sacarosa y con 1 U/ml de (1) DSR-S vardel Δ4N, (2) DSR-S vardel Δ3, (3) DSR-S vardel Core y (4) DSR-S Core ΔA y el perfil de elución (5) de un dextrano comercial de 10.000 Da (Sigma).

La Figura 16 muestra el perfil de HPAEC-PAD de dextranos sintetizados a 20 °C con 100 g/l de sacarosa y con 1 U/ml de DSR-S vardel Δ4N (1), DSR-S vardel Δ3 (2), DSR-S vardel Core (3) y DSR-S vardel Core ΔA (4).

La Figura 17 muestra el perfil de HPAEC-PAD (A) y la distribución (B) de IMOs producidos mediante una reacción de aceptor a 20 °C con las variantes DSR-S vardel Δ4N (1), DSR-S vardel Δ3 (2), DSR-S vardel Core (3) y DSR-S vardel Core ΔA (4). G: glucosa; F: fructosa; L: leucrosa; T: trehalulosa; I2 a I20: isomalto-oligosacáridos con GP 2 a GP 20. El recuadro de la Figura B corresponde a una ampliación de los IMOs de GP de 15 a 27.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La expresión "enzima que tiene actividad enzimática de dextransacarasa", tal como se usa en la presente invención, significa una enzima que cataliza la conversión de sacarosa en oligósidos y poliósidos que comprenden más de un 50% de unidades glucosilo unidas mediante enlaces α-1,6 con un tamaño en el intervalo de 342 y 10^9 Da, y más en particular dextranos e isomalto-oligosacáridos que comprenden más de un 95% de enlaces α-1,6. Esta conversión puede tener lugar en presencia o ausencia de aceptores externos tales como maltosa, glucosa, isomaltosa o fructosa o isomalto-oligosacáridos. Maltosa, isomaltosa y glucosa son los aceptores preferidos en la presente invención. La actividad enzimática de las dextransacarasas de la presente invención se puede medir como se describe en los Ejemplos.

Las expresiones "nucleótidos", "polinucleótidos", "ácidos nucleicos" y "oligonucleótidos", tal como se usan en la presente memoria, son intercambiables e incluyen, sin limitación, secuencias de ARN, ADN, ADN/ARN que comprenden más de un nucleótido en una cadena simple o en forma de una cadena doble. Las secuencias de polinucleótidos de la presente invención se pueden preparar mediante cualquier método conocido que incluye, sin limitación, cualquier método de síntesis recombinante y cualquier método de generación *ex vivo*, así como las combinaciones de esos métodos.

El término "truncado", tal como se usa en la presente memoria, significa que se ha acortado al menos uno de los extremos N- o C-terminales de la secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos. Ese acortamiento se puede llevar a cabo mediante el uso de enzimas de restricción, enzimas proteolíticas o de manera sintética, lo que incluye mediante amplificación específica de secuencias de nucleótidos, en particular mediante PCR.

La expresión "dextransacarasa purificada", tal como se usa en la presente memoria, significa una dextransacarasa que tiene solamente una forma activa de dextransacarasa en las preparaciones, que tiene un grado de pureza proteica de al menos un 70% o 85% o 95%.

La expresión "propiedad texturizante original interesante", tal como se usa en la presente memoria, significa las propiedades reológicas de los dextranos de la invención que, en comparación con los dextranos sintetizados mediante una enzima nativa en las mismas condiciones, por ejemplo, exhiben un comportamiento no newtoniano, especialmente un comportamiento de tipo gel o fibroso. Un "polímero de tipo gel" se caracteriza en la presente memoria por las medidas reológicas en modo dinámico, con la detección de los módulos de conservación de energía (G') y de disipación de energía (G"). Para un gel, G' es mayor que G" a lo largo de todo el intervalo de frecuencias estudiado, como será evidente en el Ejemplo 5. El carácter fibroso se puede identificar a simple vista. Los dextranos fibrosos de la invención cambian de comportamiento de tipo disolución a comportamiento de tipo gel tras la aplicación de una segunda serie de tensiones de corte, como se observará también en el Ejemplo 5.

Las siguientes abreviaturas usadas en la presente memoria tienen los significados siguientes: DSR-S para dextransacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B-512F; GP para grado de polimerización; MME para "masa molar elevada", MMI para "masa molar intermedia", y los polímeros MMI son polímeros muy polidispersos, con tamaños en el intervalo de 1.000 a 10^7 Da, en los que la separación mediante HPSEC es difícil debido a su baja concentración. Los polímeros MMB (masa molar baja) son, según la invención, una población que es mucho mayor y fácilmente detectada de entre 750 y 70.000 Da, centrada alrededor de 10.000 Da o en el intervalo de 2.000 a 1,7 x 10^5 Da y centrada alrededor de 40.000 Da.

La expresión "dextrano de 10.000 Da", tal como se usa en la presente memoria, significa una población de dextrano con un tamaño en el intervalo de 1.300 a 52.000 Da, más exactamente entre 5.000 y 22.000 Da, y centrada a la altura del pico a alrededor de 10.000 Da. Durante la caracterización, la base del pico de elución obtenido mediante permeabilidad en gel estuvo en el intervalo de 1.300 a 52.000 Da, y el intervalo de masa molar estimada a la semialtura del pico de elución estuvo en el intervalo de 5.000 a 22.000 Da, y el pico estuvo centrado a la altura del pico a alrededor de una masa de 10.000 Da. Cuando la masa molar se expresó a la semialtura del pico, al menos un 50% de la población de dextrano se halló dentro del intervalo indicado.

La expresión "dextrano de 40.000 Da", tal como se usa en la presente memoria, significa una población de dextrano con un tamaño en el intervalo de 7000 a 1,7 x 10^5 Da, más exactamente entre 22.000 y 70.000 Da, y centrada a la altura del pico a alrededor de 40.000 Da. Durante la caracterización, la base del pico de elución obtenido mediante permeabilidad en gel estuvo en el intervalo de 7.000 a 1,7 x 10^5 Da, y el intervalo de masa molar estimado a la semialtura del pico de elución estuvo en el intervalo de 22.000 a 70.000 Da y el pico estuvo centrado a una masa de alrededor de 40.000 Da. Cuando la masa molar se expresó a la semialtura del pico, al menos un 50% de la población de dextrano se halló dentro del intervalo indicado.

IMO significa isomalto-oligosacáridos.

La expresión "que consiste básicamente en", cuando se usa con respecto a los ácidos nucleicos o aminoácidos tal como se usan en la presente memoria, significa que puede haber presentes otros ingredientes o moléculas de poca importancia con las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos. La secuencia de ácido nucleico tiene la misma longitud exactamente tal como se indica en el número de identificación de la secuencia, pero puede tener de 3 a 12 nucleótidos extra en los extremos N- y C- terminales. De forma similar, la secuencia de aminoácidos tiene la misma

longitud exactamente tal como se indica en el número de identificación de la secuencia, pero se pueden añadir de 1 a 4 aminoácidos extra en los extremos N- o C-terminales. Estos aminoácidos extra no tienen efecto sobre la actividad de la enzima.

De manera más específica, la presente invención se refiere a ácidos nucleicos que codifican una dextransacarasa truncada o una dextransacarasa mutada, una secuencia complementaria a las secuencias de longitud completa o una secuencia que hibrida en condiciones rigurosas con una de las secuencias anteriores, con tal de que se mantenga la actividad enzimática de la dextransacarasa. Se debería apreciar que las secuencias de nucleótidos que hibridan con ella tienen el mismo número de nucleótidos, e hibridan a lo largo de la longitud completa del fragmento.

La expresión "condiciones de hibridación rigurosas", tal como se usa en la presente memoria, significa condiciones como describió Sambrook et al, Molecular Cloning Manual, 3ª edición (2001), es decir, por ejemplo, las condiciones siguientes: tampones de hibridación: SSC 2 X, disolución de Denhardt 10 X (Ficoll 400 y PEG y BSA, proporción 1:1:1), 0,1% de SDS, EDTA 5 mM, Na_2HPO_4 50 mM, 250 µg/ml de ADN de esperma de arenque, 50 µg/ml de t-ARN o 0,25 M de tampón de fosfato sódico con un pH de 7,2, EDTA 1 mM, 7% de SDS;

Temperatura de hibridación: 60 °C;

Tampón de lavado: SSC 2 X, 0,1 % de SDS;

Temperatura de lavado: 60 °C.

Las moléculas de ácido nucleico que hibridan en condiciones rigurosas con los ácidos nucleicos de la presente invención pueden codificar en principio una dextransacarasa de cualquier microorganismo tal como bacterias, bacterias gram-positivas y, en un aspecto de la invención, bacterias de los géneros *Leuconostoc, Streptococcus* o *Lactobacillus.*

La presente invención se refiere a ácidos nucleicos que codifican proteínas de dextransacarasa que tienen al menos un 70% o 80% o 90% de identidad de secuencia con las de las secuencias SEQ ID Nºs: 1 a SEQ ID Nº: 5 y SEQ ID Nºs 17 a 21, con tal de que la proteína codificada por dichas secuencias tenga una actividad enzimática de dextransacarasa.

En otro aspecto, se describen secuencias de nucleótidos que codifican una proteína que consiste básicamente o que consiste en secuencias de aminoácidos consecutivos de cualquiera de SEQ ID Nºs:6 a 10 o 22 a 26.

En un aspecto adicional de la invención, también se incluyen en la presente invención las secuencias complementarias a las secuencias de la invención o las secuencias que hibridan con dichas secuencias en condiciones rigurosas, con tal de que se mantenga la actividad enzimática de dextransacarasa.

Las derivaciones de las secuencias de nucleótidos básicas SEQ ID Nº: 1, SEQ ID Nº: 2, SEQ ID Nº: 3, SEQ ID Nº: 4 o SEQ ID Nº: 5), en las que las secuencias se seleccionan del fragmento de la secuencia SEQ ID Nº: 1 de la posición 373 a la posición 4269, el fragmento de la secuencia SEQ ID Nº: 2 de la posición 373 a la posición 4005, el fragmento de la secuencia SEQ ID Nº: 3 de la posición 373 a la posición 3408, el fragmento de la secuencia SEQ ID Nº: 4 de la posición 373 a la posición 3018, y el fragmento de la secuencia SEQ ID Nº: 5 de un nucleótido de la posición 373 a la posición 4269, las secuencias complementarias a dichas secuencias o las secuencias que hibridan con dichas secuencias en condiciones rigurosas, con tal de que se mantenga la actividad enzimática de dextransacarasa, se pueden producir mediante deleción, sustitución, inserción o recombinación, por ejemplo; los métodos para llevar a cabo dichas etapas y transformaciones se conocen bien en la técnica y los describió, por ejemplo, Sambrook et al., anteriormente mencionado.

Se debería entender en la presente memoria que si tiene lugar cualquier deleción, sustitución, inserción o recombinación de cualquiera de las secuencias citadas anteriormente, las proteínas codificadas por las secuencias deben mantener su actividad enzimática de dextransacarasa. Así, se pueden modificar de 1 a 132, preferiblemente 2 a 60 nucleótidos, más preferiblemente 15 a 36 nucleótidos y aún más preferiblemente 12 a 27 nucleótidos, por ejemplo, mediante deleción, sustitución, inserción o recombinación. Según la invención, un 90%, preferiblemente un 95%, de los nucleótidos permanecen inalterados.

La actividad enzimática de dextransacarasa se puede medir como se describe en la sección de métodos y en los Ejemplos de la presente solicitud.

Los oligonucleótidos que se pueden usar como sonda o cebador son, por ejemplo, SEQ ID Nº: 1 a SEQ ID Nº: 5 o las secuencias de nucleótidos seleccionadas del fragmento de la secuencia SEQ ID Nº: 1 de la posición 373 a la posición 4269, el fragmento de la secuencia SEQ ID Nº: 2 de la posición 373 a la posición 4005, el fragmento de la secuencia SEQ ID Nº: 3 de la posición 373 a la posición 3408, el fragmento de la secuencia SEQ ID Nº: 4 de la posición 373 a la posición 3018, y el fragmento de la secuencia SEQ ID Nº: 5 de un nucleótido de la posición 373 a la posición 4269.

La longitud de las sondas y cebadores puede variar dependiendo de sus aplicaciones. En general, deben tener al

menos 25 nucleótidos, y pueden comprender todas las secuencias de dextransacarasa descritas, tal como 3.896 nucleótidos. La longitud también puede variar para estar en el intervalo de 25 a 150 nucleótidos, 25 y 800 nucleótidos o 25 y 3000 nucleótidos, por ejemplo.

Los cebadores comprenden en general de 18 a 25 nucleótidos de longitud, pero también pueden ser más largos, dependiendo de la aplicación prevista. Los ejemplos de cebadores que se pueden usar son:

GGC TTC TCT GGT GTG ATT (SEQ ID Nº:11)

GAT CTG TCA GAA ACT GGC (SEQ ID Nº:12)

ACA CAA CAA GTT AGC GGC (SEQ ID Nº: 13)

CCA GAT ACT AAC TTG AGT (SEQ ID Nº: 14)

TTC ATT GAT GCA GAC GGG (SEQ ID Nº:15)

CAC GAC TAC GAC GCG CAA (SEQ ID Nº :16)

Se debería indicar que los cebadores de las posiciones 5' y 3' terminales de los nucleótidos codifican la dextransacarasa (SEQ ID Nºs: 11 a 15) y el lado de 5' y 3' de la secuencia mutante (SEQ ID Nº: 16). Sin embargo, una persona experta puede usar cada una de estas secuencias para producir cebadores o sondas mediante el uso de nucleótidos consecutivos. Además, estas secuencias de nucleótidos que se usan como sonda se pueden marcar con radiactividad, marcaje enzimático, marcaje fluorescente, en particular.

Para modificar genéticamente la célula procariótica o eucariótica, se pueden introducir los ácidos nucleicos de la presente solicitud o una porción de los ácidos nucleicos de la presente solicitud en plásmidos que permiten la mutagénesis o modificación de las secuencias mediante la recombinación de secuencias de nucleótidos. El experto conoce los métodos habituales que usan estas técnicas, y han sido descritos, en particular, por Sambrook et al, anteriormente mencionado. Los fragmentos de ADN también se pueden conectar entre sí mediante adaptadores o ligadores, y se pueden usar enzimas de restricción adecuadas para eliminar ciertas secuencias de ADN. Se pueden usar métodos tales como mutagénesis, restricción tras el restablecimiento de cebadores o ligaduras para obtener la secuencia deseada con las inserciones adecuadas, deleciones o sustituciones necesarias o deseables.

Además, se pueden unir marcadores bien definidos que codifican ácidos nucleicos a los extremos N- o C-terminales de las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención. Pueden ser péptidos tales como poli-His, epítopo c-myc o marcador de HA o proteínas pequeñas tales como GST bacteriana, MBP (proteína de unión a maltosa), tiorredoxina, β-galactosidasa, VSV-glicoproteína y similares.

Los ácidos nucleicos particulares que codifican otros marcadores proteicos son el marcador de His, marcador T7, marcador S, un péptido "flag", trpE, avidina/estreptavidina, proteína estafilocócica A o G, dihidrofolato reductasa, dominios de unión a celulosa, policisteína, polifenilalanina y similares, que se pueden usar también en la presente invención.

Según un aspecto de la presente invención, se fusiona un ácido nucleico que codifica una tiorredoxina a la secuencia de ácido nucleico N-terminal. Se fusiona un ácido nucleico que codifica un marcador de 6xHis al extremo 3' de las secuencias de ácidos nucleicos.

Los ácidos nucleicos de la presente invención se pueden unir a una unidad de transcripción que comprende (1) elementos de regulación de la expresión génica tales como promotores y potenciadores y (2) una secuencia codificante o estructural que se transcribe hasta un mARN y se traduce hasta la proteína correspondiente, y (3) señales adecuadas de inicio y terminación.

Se conocen en la técnica varias secuencias adecuadas de control de la expresión. También se conocen métodos generales para expresar la proteína recombinante, y se ejemplifican en el documento de R Kaufman, Methods in Enzymology 185, 537-566 (1990) [17].

Las regiones promotoras que se pueden usar en los vectores de la presente invención incluyen lacL, lacZ, T3, T7, gpt, lambda PR, tre y ara.

La presente invención también se refiere a vectores, en particular plásmidos, cósmidos, virus, bacteriófagos y otros vectores que se conocen en el campo de la ingeniería genética y que comprenden las secuencias de ácidos nucleicos de la presente solicitud en un aspecto de la presente invención, y dichos vectores son plásmidos y se seleccionan de DSR-S vardel Δ4N, DSR-S vardel Δ3, DSR-S vardel Core, DSR-S Core ΔA y DSR-S vardel Δ4N SEV663YDA.

Los ácidos nucleicos de la presente invención se pueden expresar en células procarióticas o eucarióticas. Los ejemplos no limitantes de tales células que se pueden citar son las células VERO, células HELA tales como ATCC Nº CCL3, líneas de células CHO tales como ATCC CCL61, células COS tales como COS-7 y células CR ATCC Nº:

1650, W138, BHK, HepG2, 3T3 tales como ATCC Nº CRL6361, A549, PC12, K562, células 293, células Sf9 tales como ATCC Nº CRL 1711, células Cv1 tales como ATCC Nº CCL70 y células JRKAT tales como ATCC Tib152.

Las células no limitantes que se pueden usar en la presente solicitud incluyen las cepas de las células hospedadoras procarióticas tales como *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium* o cepas del género *Pseudomonas, Streptomyces* y *Staphylococcus* o cepas de células hospedadoras eucarióticas tales como los parásitos *Apicomplexan (Plasmodia, Toxoplasma, Cryptosporidia), Leishmania* o *Trypanosoma.*

Se pueden usar otras células adecuadas en la presente invención, y en particular incluyen las células de levadura tales como *Saccharomyces*, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae* o *pombe, Pichia pastoris* y células eucarióticas (células vegetales, células CHO y similares).

En un aspecto adicional, las células usadas para expresar los ácidos nucleicos de la presente invención son *Escherichia coli* y cepas seleccionadas, por ejemplo, de JM109, BL21(DE3)pLysS, TOP10 o Pir1. También se puede usar la cepa INVsc de *Saccharomyces cerevisiae*.

La presente invención se refiere a las células hospedadoras transformadas con las secuencias de ácidos nucleicos descritas anteriormente o con un vector como se describió anteriormente, y las células derivadas de células transformadas y que contienen el vector o las secuencias de ácidos nucleicos descritas en la presente memoria.

Los ejemplos de las células hospedadoras que se pueden citar son *Escherichia coli*, en la que se puede producir la dextransacarasa truncada y/o mutada. La preparación de tales células hospedadoras se conoce en la técnica.

Las proteínas y fragmentos biológicamente activos de tales proteínas, así como las proteínas mutadas que están codificadas por las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención, y sus métodos de preparación también se hallan dentro del alcance de la presente invención.

Así, la presente invención se refiere a un método para preparar una dextransacarasa mutada y/o truncada, que comprende las etapas siguientes:

(a) cultivar células hospedadoras transformadas con las secuencias de ácidos nucleicos descritas anteriormente o con un vector como se describió anteriormente en condiciones que permiten la expresión de una dextransacarasa; y

(b) aislar dicha dextransacarasa del medio de cultivo.

De manera más específica, las secuencias de ácidos nucleicos se pueden seleccionar de SEQ ID Nº: 1 de la posición 373 a la posición 4269, el fragmento de la secuencia SEQ ID Nº: 2 de la posición 373 a la posición 4005, el fragmento de la secuencia SEQ ID Nº: 3 de la posición 373 a la posición 3408, el fragmento de la secuencia SEQ ID Nº: 4 de la posición 373 a la posición 3018, y el fragmento de la secuencia SEQ ID Nº: 5 de la posición 373 a la posición 4269, las secuencias complementarias de dichas secuencias y las secuencias que hibridan con dichas secuencias en condiciones rigurosas, con tal de que se mantenga la actividad enzimática de dextransacarasa.

Después de aislarlas, las dextransacarasas de la presente invención también se pueden purificar. A este respecto, se pueden usar los métodos de purificación habituales, tales como precipitación, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio hidrófobo, filtración en gel, HPLC de fase inversa, separación de fases y similares. En un aspecto de la presente invención, las dextransacarasas mutadas o truncadas de la presente invención se pueden purificar mediante el uso de una resina cargada con níquel, teniendo en cuenta la existencia del marcador de tiorredoxina y 6xHis.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a proteínas dextransacarasas que consisten en una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID Nº: 6 a 10 o una secuencia de aminoácidos seleccionada del fragmento de SEQ ID Nº: 6 del aminoácido de la posición 125 al aminoácido de la posición 1423, el fragmento de SEQ ID Nº: 7 del aminoácido de la posición 125 al aminoácido de la posición 1335, el fragmento de SEQ ID Nº: 8 del aminoácido de la posición 125 al aminoácido de la posición 1136, el fragmento de SEQ ID Nº: 9 del aminoácido de la posición 125 al aminoácido de la posición 1006, y el fragmento de SEQ ID Nº: 10 del aminoácido de la posición 125 al aminoácido de la posición 1423.

También se describe una proteína codificada por una de las secuencias de nucleótidos SEQ ID Nº: 1 a SEQ ID Nº: 5 o los fragmentos de dichas secuencias, como se expuso anteriormente.

También se describen en la presente solicitud secuencias de aminoácidos homólogas, es decir, en las que el grado de similitud con las secuencias definidas anteriormente es suficiente para que se mantenga la actividad enzimática. Así, se pueden usar los programas Blast y Fasta para investigar la similitud. Debido a que se demostró en la presente memoria que fue posible truncar los extremos N- y C-terminales de las dextransacarasas, manteniendo la actividad enzimática, la similitud de secuencia no se puede considerar solamente para la secuencia completa individual, sino también para las secuencias truncadas. La presente invención se refiere así a cualquier secuencia que contenga un 80%, 90% o 98% de similitud de secuencia con la secuencia completa, pero también las que

tendrían un 80%, 90% o 98% de similitud de secuencia con una de las secuencias truncadas, con tal de que se mantenga la actividad enzimática.

De manera más específica, se describen en la presente memoria secuencias que tienen un grado de similitud del orden del 90%, 95% o 98% de similitud con SEQ ID Nº: 6 a 10 o las secuencias de aminoácidos seleccionadas del fragmento de SEQ ID Nº: 6 del aminoácido de la posición 125 al aminoácido de la posición 1423, SEQ ID Nº: 7 del aminoácido de la posición 125 al aminoácido de la posición 1335, SEQ ID Nº: 8 del aminoácido de la posición 125 al aminoácido de la posición 1136, SEQ ID Nº: 9 del aminoácido de la posición 125 al aminoácido de la posición 1006, y SEQ ID Nº: 10 del aminoácido de la posición 125 al aminoácido de la posición 1423, con tal de que estas proteínas tengan la actividad enzimática de dichas dextransacarasas. Claramente, las secuencias de aminoácidos con una identidad específica definida anteriormente tienen una mayoría de sustituciones conservativas de aminoácidos.

Las sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen las sustituciones de aminoácidos de la misma clase. Estas clases comprenden, por ejemplo, los aminoácidos que tienen cadenas laterales polares sin carga, tales como Asn, Gln, Ser, Thr o Tyr; los aminoácidos que contienen cadenas laterales básicas, tales como His, Lys o Arg; los aminoácidos que contienen cadenas laterales ácidas, tales como Glu o Asp y los aminoácidos que contienen cadenas laterales apolares, tales como Ala, Gly, Leu, Val, Ile, Phe, Cys o Trp.

Además, con respecto a la actividad enzimática de dextransacarasa con sustituciones de aminoácidos, esto se puede ensayar como se expone en los Ejemplos, pero la actividad también se puede determinar mediante análisis de HPLC o mediante el uso de las predicciones habituales con respecto a la manera en la que los cambios de aminoácidos afectan a las funciones de las proteínas.

En un aspecto adicional, ya que las secuencias de aminoácidos se indican en la presente memoria, la proteína se puede sintetizar mediante el uso del método de R B Merrifield, 1963 [20]. Por esta razón, las proteínas de dextransacarasa sintetizadas constituyen otro aspecto de la presente invención.

La presente invención también se refiere a dextransacarasas mutantes denominadas mutante SEV663YDA de DSR-S vardel Δ4N en las que la serina, el ácido glutámico y la valina de las posiciones 663, 664 y 665 se han modificado hasta tirosina, ácido aspártico y alanina, respectivamente.

Este mutante se puede usar para sintetizar isomaltosa a partir de sacarosa, mediante el uso de sacarosa como el único sustrato con un rendimiento que es equivalente al obtenido cuando se añade un aceptor, tal como glucosa, al medio de reacción.

Por esta razón, la presente invención se refiere a un método para producir isomaltosa directamente a partir de sacarosa, y dicho método comprende hacer reaccionar una dextransacarasa mutante con SEQ ID Nº: 10 con sacarosa, y producir isomaltosa.

Las proteínas de fusión que contienen un marcador proteico como se describió anteriormente también forman parte de la presente invención. A este respecto, las proteínas mutadas y/o truncadas de la presente invención se pueden fusionar con al menos un marcador proteico.

La preparación de dextranos de masa molar elevada (alrededor de 10^6 - 10^8 Da) y con propiedades reológicas modificadas en comparación con el dextrano sintetizado mediante DSR-S nativa de *L. mesenteroides* NRRL B-512F mediante el uso de la dextransacarasa truncada de la presente invención es otro aspecto de la invención.

De manera más específica, los microorganismos que secretan dextransacarasa o los extractos celulares de microorganismos que producen dextransacarasa de manera intracelular se pueden cultivar o usar en un medio que comprende sacarosa, lo que da como resultado la síntesis de isomaltosa (342 Da), (ii) isomalto-oligosacáridos de 342 a 5.000 Da, (iii) dextranos con un tamaño controlado de 1.300 a 5.200 Da centrado alrededor de 10.000 Da, (iv) dextranos con un tamaño controlado de 7.000 a 1,7 x 10^5 Da centrado alrededor de 40.000 Da, y (v) dextranos con una masa molar elevada de 2 x 10^6 Da a 10^9 Da. Estos compuestos se pueden aislar a partir del medio de cultivo mediante métodos convencionales tales como ultrafiltración, nanofiltración, precipitación alcohólica, cromatografía líquida y similares.

De manera alternativa, las dextransacarasas truncadas y/o mutadas descritas en la presente invención se pueden purificar y usar en un método para producir dextranos con una masa molar controlada.

Así, la invención se refiere a un método para producir dextranos y/o isomalto-oligosacáridos con una masa molar controlada, que comprende hacer reaccionar una dextransacarasa mutada y/o truncada que consiste en una secuencia seleccionada de las secuencias de nucleótidos SEQ ID Nº: 6 a SEQ ID Nº: 10 definidas anteriormente con al menos sacarosa y opcionalmente un aceptor.

La invención también se refiere a un método para producir isomaltosa, y el método comprende hacer reaccionar una dextransacarasa mutada y/o truncada con la secuencia SEQ ID Nº: 10 básicamente con sacarosa. La invención también se refiere a un método para producir dextranos con propiedades texturizantes interesantes, y el método comprende hacer reaccionar una dextransacarasa mutada y/o truncada con la secuencia de SEQ ID Nº: 6.

Se describen dextranos e isomalto-oligosacáridos que tienen las características definidas en la presente solicitud que se pueden obtener mediante los métodos descritos en la presente memoria. Estas propiedades características incluyen el hecho de que los dextranos de masa molar elevada tienen un comportamiento no newtoniano, y tienen el carácter de un gel o una naturaleza fibrosa, y la propiedad de cambiar desde un comportamiento de tipo disolución al de un gel tras la aplicación de una segunda serie de tensiones de corte.

Como será evidente en los Ejemplos, de manera ventajosa, las propiedades reológicas diferentes se pueden obtener dependiendo de si la enzima está o no purificada.

Los dextranos producidos enzimáticamente de la invención se pueden usar como soporte en la industria farmacéutica, como sustituto del plasma, aditivos en tejidos o pinturas, en cosméticos y en la industria agroalimentaria, así como agente texturizante, por ejemplo como sustituto de la goma arábiga o como agente gelificante. La invención también se refiere a las composiciones que comprenden los dextranos y los IMOs de la invención.

Una aplicación importante de los dextranos e isomalto-oligosacáridos de la presente solicitud es su uso como prebióticos. Estos productos no se metabolizan completamente, y se fermentan selectivamente en el colon mediante especies bacterianas adecuadas tales como *Bifidobacteria* y *Lactobacilli.*

Los oligosacáridos se han usado tradicionalmente para productos alimenticios para seres humanos o animales, en la industria farmacéutica y en la industria cosmética o como edulcorante, estabilizante o relleno [21]. Durante los últimos quince años, se ha desarrollado un nuevo campo de actividad para las propiedades prebióticas de ciertas moléculas no digeribles [23]. Los oligosacáridos como prebióticos son interesantes con respecto a su capacidad de resistir el ataque mediante enzimas digestivas y acentuar el crecimiento de las bacterias "sanas", principalmente *Bifidobacteria* y *Lactobacilli*, en el intestino. Este concepto se ha favorecido por la aparición de productos prebióticos comerciales que han ganado rápidamente popularidad. También son prometedores los oligómeros tales como fructo-oligosacáridos, lactulosa, galacto-oligosacáridos, xilo-oligosacáridos, oligosacáridos extraídos de soja o isomalto-oligosacáridos que se obtienen normalmente mediante procesos biológicos o mediante extracción de vegetales. Actualmente, la investigación en este campo se ha centrado en la producción de nuevas estructuras de oligosacáridos denominadas prebióticos de segunda generación que deberían tener nuevas propiedades fisico-químicas y actividades biológicas más específicas [18].

En un aspecto adicional, se describe una composición que comprende un dextrano obtenido a partir de una dextransacarasa de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable o un vehículo de calidad alimentaria.

El vehículo aceptable se puede seleccionar, por ejemplo, de adyuvantes, sales y similares, y los adyuvantes se pueden seleccionar de péptidos de muramilo, alumbre, Montanide y similares. Las dextransacarasas mutadas y/o truncadas pueden ser una proteína purificada, una proteína producida de manera recombinante o una proteína producida de manera sintética.

Con respecto al método para producir los dextranos y/o IMOs, los aceptores preferidos, cuando se usan, son glucosa, isomaltosa, maltosa e isomalto-oligosacáridos.

Preferiblemente, el método para producir isomalto-oligosacáridos con una masa molar controlada comprende hacer reaccionar una dextransacarasa mutada y/o truncada que consiste en las secuencias SEQ ID Nº: 7, 8, 9 o 10 básicamente con sacarosa. El grado de polimerización, así, varía de 2 a 60 unidades glucosilo (GP2 a GP60).

La reacción de producción tiene lugar a temperaturas en el intervalo de 4 °C a 80 °C, preferiblemente 4 °C a 40 °C.

Preferiblemente, cuando la secuencia es SEQ ID Nº: 7, SEQ ID Nº: 8 o SEQ ID Nº: 9, la temperatura está en el intervalo de 4 °C a 15 °C, preferiblemente 8 °C a 12 °C, y más preferiblemente la temperatura es del orden de 10 °C para la producción de dextranos con un tamaño controlado. Además, para tales secuencias, la temperatura está preferiblemente en el intervalo de alrededor de 8 °C a 25 °C, más preferiblemente del orden de 20 °C para la síntesis de IMO.

Además, preferiblemente cuando la secuencia es SEQ ID Nº: 6 o SEQ ID Nº: 10, la temperatura está en el intervalo de 15 °C a 45 °C, preferiblemente 17 °C a 30 °C, y más preferiblemente del orden de 20 °C a 25 °C.

Además, la concentración de sacarosa está en el intervalo de 10 a 600 g/l, preferiblemente 75 a 400 g/l, y más preferiblemente 90 a 280 g/l.

Cuando la secuencia es SEQ ID Nº: 7, SEQ ID Nº: 8 o SEQ ID Nº: 9, la concentración de sacarosa en el medio es preferiblemente del orden de 250 g/l.

Además, cuando la secuencia es SEQ ID Nº: 6 o SEQ ID Nº: 10, la concentración de sacarosa puede ser del orden de 100 g/l.

Además, según sea adecuado, la proporción en peso sacarosa/aceptor puede ser del orden de 0,5 a 12, preferiblemente 1 a 4, más preferiblemente alrededor de 2.

En el método de la invención, la dextransacarasa está en forma libre o inmovilizada sobre un soporte. Dicha inmovilización se puede llevar a cabo mediante adsorción, inclusión o unión covalente, por ejemplo.

Finalmente, para llevar a cabo el método, el pH está en el intervalo de 3,0 a 10,0, preferiblemente 4,0 a 7,0; más preferiblemente 4,5 a 6,0 e incluso más preferiblemente alrededor de 5,2.

Otros aspectos de la invención pueden ser evidentes a partir de un estudio de los Ejemplos siguientes.

Ejemplo 1: Construcción de variantes

Se usó el vector pBad/TOPO Thiofusion (Invitrogen) para clonar y expresar genes dsrS truncados y/o mutados bajo control del promotor de L-arabinosa. Permite la fusión del gen al marcador de 6xHis en el extremo C-terminal, y un marcador de tiorredoxina en el extremo N-terminal.

Para el uso como una matriz, se extrajo el ADN genómico de *L. mesenteroides* NRRL B-512F mediante el uso del kit "Blood and Cell culture DNA maxi" (Qiagen). La cepa se obtiene de la colección NCAUR, Peoria, IL, EE.UU.

Se usaron células One Shot TOP10 (Invitrogen) para la expresión de los genes *dsrS* truncados y/o mutados. Las enzimas de restricción se adquirieron de New England Biolabs y se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN se purificó mediante el uso de los kits "QIAquick" (purificación mediante PCR y extracción en gel) y "QIAprep" (purificación de plásmidos) de Qiagen.

Las variantes se construyeron mediante amplificación por PCR del gen DSR-S a partir de ADN genómico de *L. mesenteroides* NRRL B-512F mediante el uso de la polimerasa "Expand High Fidelity" (Roche) y los cebadores siguientes (proporcionados en la dirección 5'→ 3'):

1 DSR-S vardel Δ4N se construyó mediante el uso de los cebadores pBad y DSR-S vardel: 454-acacaacaagttagcggcaagtacgttgaaaaagac-490 y PBad Δ4N: 4350-actcaagttagtatctggatccacaatgatagc-4317. Contuvo los aminoácidos T152 a S1450 de DSR-S.

2 DSR-S vardel Δ3 se construyó mediante el uso de los cebadores PBad y DSR-S vardel: 454-acacaacaagttagcggcaagtacgttgaaaaagac-490 y PBad Δ3: 4086-cccgtctgcatcaatgaattcacc-4062. Contuvo los aminoácidos T152 a G1362 de DSR-S.

3 DSR-S vardel Core se construyó mediante el uso de los cebadores PBad y DSR-S vardel: 454-acacaacaagttagcggcaagtacgttgaaaaagac-490 y PBad Core: 3489-gccagtttctgacagatcattagttaactg-3459. Contuvo los aminoácidos T152 a G1162 de DSR-S.

4 DSR-S Core ΔA se construyó mediante el uso de los cebadores PBad DSR-S cat: 843-ggcttctctggtgtgattgatggtcaa-870 y PBad Core: 3489-gccagtttctgacagatcattagttaactg-3459. Contiene los aminoácidos G282 a G1162 de DSR-S.

5 El mutante DSR-S vardel Δ4N SEV663YDA se construyó mediante mutagénesis dirigida mediante el uso de la técnica del "mega cebador" [33, 21] y la ADN polimerasa Pfu (Strategene). Se llevó a cabo una primera reacción de PCR mediante el uso de la matriz plasmídica DSR-S vardel Δ4N y el par de cebadores SEV663YDA: 1965-agctttgtac<u>gagctc</u>acgactacgacgcgcaaacggtt-2004 e inverso: 3447-gtcaccatcctcagtg<u>ttcgaaa</u>cg-3422, que comprende el sitio de restricción *Bst*BI (subrayado). Este producto de PCR se usó después como un mega cebador inverso en una segunda PCR con el cebador directo: 1329-caaccacagtggaatgaa<u>actagt</u>c-1354 que comprende el sitio de restricción *Spe*I. Este segundo producto de PCR se digirió después con las dos enzimas de restricción *Spe*I y *Bst*BI de acuerdo con las condiciones del fabricante (New England Biolabs) y se clonó en el vector pBad DSR-S vardel Δ4N digerido previamente con las mismas enzimas. El cebador SEV663YDA se diseñó para introducir un único sitio de restricción para seleccionar los clones positivos (en este caso, el sitio *Sac*I).

La estructura primaria de cada una de las variantes DSR-S vardel Δ4N, DSR-S vardel Δ3, DSR-S vardel Core y DSR-S Core ΔA se muestra esquemáticamente en la Figura 6.

Ejemplo 2: Producción de variantes en E coli

Se llevaron a cabo cultivos en un matraz Erlenmeyer con deflectores en medio YT 2X tamponado a un pH de 6,4 con 100 mN de Tris-HCl, ya que se sabe que DSR-S es inestable en condiciones de pH alcalino [3].

Composición del medio YT 2X:

Bactotriptona	16 g/l
Extracto de levadura	10 g/l
NaCl	5 g/l
Tris	12,1 g/l

Se cultivaron células de *E. coli* TOP10 que portaban plásmidos pBad DSR-S vardel Δ4N y pBad DSR-S vardel Δ4N SEV663YDA a 23 °C. Se llevó a cabo la inducción con L-arabinosa cuando el crecimiento celular alcanzó una $DO_{600\ nm}$ de 0,2 con un 0,002% (p/v) de inductor. El cultivo se paró cuando el crecimiento celular alcanzó una meseta ($DO_{600\ nm}$ de alrededor de 3-3,5) antes de iniciar la fase de lisis celular.

Las células de *E. coli* TOP10 que portaban los plásmidos pBad DSR-S vardel Δ3, pBad DSR-S vardel Core y pBad DSR-S Core ΔA se llevaron a 16 °C. La inducción se llevó a cabo cuando el crecimiento celular alcanzó una DO_{600nm} de 0,2 con un 0,005% (p/v) de L-arabinosa en el caso de DSR-S vardel Δ3 y un 0,02% (p/v) en el caso de DSR-S vardel Core y DSR-S Core ΔA. El cultivo se detuvo cuando el crecimiento celular alcanzó una meseta ($DO_{600\ nm}$ de alrededor de 2,5) antes de iniciar la fase de lisis celular.

Tras el cultivo, las células se recuperaron mediante centrifugación (8.000 x g, 10 minutos, 4 °C), se resuspendieron y se concentraron a una $DO_{600\ nm}$ equivalente a 80 en un tampón de acetato sódico 50 mM, pH 5,2, complementado con 0,05 g/l de $CaCl_2$ 1 mM y fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF). La ruptura de las células se llevó a cabo mediante sonicación. Las preparaciones se centrifugaron después una vez más (20.000 x g, 30 min, 4 °C) para eliminar los restos celulares y recuperar solamente el sobrenadante de sonicación.

La actividad enzimática de los extractos se midió mediante el uso del método de ácido dinitrosalicílico (DNS) de Sumner y Howell, 1935 [22]. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un µmol de fructosa por minuto a una temperatura determinada (4 °C a 40 °C dependiendo del caso, más exactamente 20 °C o 30 °C) y en un tampón de acetato sódico (50 mM), pH 5,2, que contiene 0,05 g/l de $CaCl_2$ y 100 g/l de sacarosa.

Ejemplo 3: Purificación de la variante DSR-S vardel Δ4N

Se produjeron diferentes formas enzimáticas de DSR-S vardel Δ4N durante el cultivo de *E. coli* TOP10: una forma completa muy mayoritaria y diferentes formas degradadas en el extremo C-terminal (Figura 7). El origen de estas degradaciones sigue estando poco claro. La producción en el Ejemplo 2 alcanzó alrededor de 5500 U/l de cultivo en los sobrenadantes de sonicación (actividad ensayada a 30 °C).

Para determinar el número de formas enzimáticas activas en los extractos, se produjeron geles de electroforesis en condiciones nativas o desnaturalizantes. Tras la renaturalización del gel, se incubó durante la noche a 25 °C en un tampón de acetato sódico, 50 mM, pH 5,2 complementado con 100 g/l de sacarosa. Las formas enzimáticas activas sintetizaron después un polímero en la región en la que migraron en el gel. Se usó un reactivo (reactivo de Schiff) que coloreó de manera específica los polímeros sintetizados por las dextransacarasas activas, tras la oxidación de las funciones alcohol primarias del polímero con ácido peryódico, y los geles se tiñeron con este reactivo. Este tipo de gel se denomina zimograma. En el caso de DSR-S vardel Δ4N, o su mutante SEV663YDA, solamente se detectaron como activas las dos formas de mayor masa molar (resultados no mostrados). Sin embargo, solamente la forma completa tuvo tanto el marcador de tiorredoxina como el marcador de 6xHis.

La presencia del marcador de 6×His solamente en la forma completa de DSR-S vardel Δ4N se aprovechó para purificar la enzima mediante cromatografía de afinidad en una de resina níquel (Probond Ni-NTA, Invitrogen).

La purificación se llevó a cabo a 4 °C. Todos los tampones tuvieron concentraciones de acetato sódico 50 mM, 400 mM de NaCl, concentraciones diferentes de imidazol, y se ajustaron a un pH de 7,5. La resina se equilibró con 8 volúmenes de tampón que tenía una concentración de 40 mM de imidazol. La fijación se llevó a cabo durante 2 horas con 7 volúmenes de extracto enzimático complementado con 20 mM de imidazol y ajustado a un pH de 7,5. A continuación, la resina se lavó con 40 volúmenes de tampón de imidazol 40 mM, 8 volúmenes a 60 mM y 4 volúmenes a 100 mM. Finalmente, las proteínas se eluyeron con 7 volúmenes de tampón que tenía una concentración de 250 mM de imidazol.

Las fracciones que contenían las proteínas de fusión eluidas se mezclaron y se dializaron durante la noche a 4 °C con un tampón que contenía una concentración de 50 mM de acetato sódico, pH de 5,2, y 0,05 g/l de $CaCl_2$. La concentración de proteínas se determinó mediante el método de microbradford (Biorad Laboratories) con BSA (albúmina de suero bovino) como patrón.

Se estimó que la pureza de la preparación al final del procedimiento fue de alrededor de un 90% (Figura 8). Las

proteínas DSR-S vardel Δ4N purificadas tuvieron una tendencia muy intensa a agregarse, lo que provocó la formación de precipitados blancos y limitó los rendimientos obtenidos al final del procedimiento (Tabla 1). Sin embargo, se estimó que la actividad específica de la preparación fue de 584 U/mg de proteína, que correspondió a la mejor actividad específica descrita de una dextransacarasa recombinante. A modo de comparación, se estimó que la actividad específica de la DSR-S nativa (expresada por *L. mesenteroides* NRRL B-512F) fue de alrededor de 170 U/mg [24].

Tabla 1: Purificación de DSR-S vardel Δ4N mediante cromatografía de afinidad en una resina de níquel

Etapa de purificación	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Conc. de proteína (mg/l)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Sobrenadantes de sonicación	150	149,2	9,46	15,7	1	100
Fracción de elución tras la diálisis	150	67,6	0,25	270,5	17	45,3
Fracción soluble tras la eliminación de agregados	150	38,2	0,09	424,4	27	25,4

Ejemplo 4: Secuencias de nucleótidos y secuencias de aminoácidos

Las construcciones se secuenciaron, y las secuencias correspondientes se muestran en las Figuras 1 a 5.

Ejemplo 5: Síntesis de dextrano mediante DSR-S vardel Δ4N, comparación con DSR-S de *L. mesenteroides* NRRL B-512F

Se sintetizó dextrano con DSR-S nativa de *L. mesenteroides* NRRL B-512F, DSR-S recombinante completa (sobrenadante de sonicación) y DSR-S vardel Δ4N (sobrenadante de sonicación y enzima purificada).

Condiciones de síntesis y análisis de los productos formados

Se construyó DSR-S recombinante completa según el mismo principio que las variantes descritas en el Ejemplo 1, con cebadores que fueron adecuados para la amplificación del gen completo. Se cultivaron células de *E. coli* TOP10 que portaban el plásmido pBad DSR-S mediante el uso del protocolo descrito para DSR-S vardel Δ4N (Ejemplo 2). El sobrenadante contuvo tres formas enzimáticas, incluyendo dos con una masa molar activa mayor.

La forma con el tamaño mayor contuvo DSR-S en su totalidad; las otras dos formas se degradaron en su posición N-terminal (datos no mostrados).

Se determinó la actividad de cada preparación enzimática a 30 °C.

Las síntesis de dextrano se llevaron a cabo a 25 °C comenzando con una disolución de sacarosa de 100 g/l, en un tampón de acetato sódico 50 mM que contenía 0,05 g/l de $CaCl_2$ y con 1 unidad por ml de enzima. El agotamiento progresivo de sacarosa se monitorizó mediante análisis HPAEC-PAD (véase más adelante) y la reacción se paró tras su consumo completo, mediante calentamiento durante 5 min a 95 °C (desnaturalización completa de las dextransacarasas citadas).

Los productos formados se analizaron mediante HPAEC-PAD (cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada) con respecto a los mono-, di- y oligosacáridos, y mediante HPSEC (cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento) con respecto a los polisacáridos.

El sistema HPAEC-PAD comprendió una columna Dionex "Carbopack PA100" 4 x 250 mm. Se aplicó un gradiente de acetato sódico de 6 a 300 mM en 28 minutos en una disolución de hidróxido sódico 150 mM a un caudal de 1 ml/min. La detección se llevó a cabo mediante amperometría con el uso de un módulo Dionex ED40 con un electrodo de oro y un electrodo de referencia de pH de Ag/AgCl.

El sistema HPSEC estuvo constituido por dos columnas en serie Shodex OH-Pack SB-805 y SB-802.5, mediante el uso de nitrato sódico 0,45 M + 1% (v/v) de etilen glicol como disolvente, en una cantidad de 0,3 ml/min. Las columnas y pre-columnas se mantuvieron a 70 °C y las muestras se filtraron en filtros de 0,45 µm (Sartorius) antes de la inyección. La detección fue de tipo refractométrico, acoplada a un detector de difusión de luz (Wyatt) para determinar la masa de los dextranos.

Las concentraciones en peso de glucosa, fructosa y leucrosa (isómero de sacarosa) se determinaron mediante análisis HPAEC-PAD. Los porcentajes de residuos de glucosilo de la sacarosa incorporada en la glucosa y leucrosa libres se calcularon mediante el uso de la fórmula siguiente:

$\%G_{glucosa}$ = [$glucosa_{tf}$]/([$sacarosa_{t0}$]x(180/342))

y

$\%G_{leucrosa}$ = [$leucrosa_{tf}$]/[$sacarosa_{t0}$]

en las que [$glucosa_{tf}$] y [$leucrosa_{tf}$] corresponden a las concentraciones finales de glucosa y leucrosa al final de la reacción, y [$sacarosa_{t0}$] corresponde a la del sustrato inicial (g/l).

El porcentaje de residuos de glucosilo incorporados en el polímero MME se determinó mediante análisis HPSEC con el uso de la fórmula:

$\%G_{dextrano}$ = área $superficial_{dextrano\text{-}tf}$/(área $superficial_{sacarosa\text{-}t0}$/(162/342))

en la que el área $superficial_{dextrano\ tf}$ corresponde al área superficial del pico de dextrano, determinada mediante el uso del cromatograma de HPSEC al final de la reacción, y el área $superficial_{sacarosa\text{-}t0}$ corresponde a la del pico del sustrato inicial. Para una concentración determinada, la superficie obtenida mediante refractometría es idéntica independientemente del carbohidrato.

La proporción de unidades de glucosilo incorporadas en los polímeros u oligosacáridos MMI para los que no se pudo cuantificar directamente la concentración mediante HPAEC-PAD o HPSEC se determinó mediante el uso de la fórmula:

$\%G_{MMI} = 100 - \%G_{glucosa\text{-}tf} - \%G_{leucrosa\text{-}tf} - \%G_{dextrano\text{-}tf}$

Los perfiles de elución de los cuatro dextranos obtenidos mediante HPSEC se muestran en la Figura 9. Se pueden distinguir diferentes poblaciones: un primer pico eluido a los 38 minutos, que correspondió al polímero de masa molar elevada (MME), y un segundo pico a los 75 minutos que correspondió a fructosa, glucosa, leucrosa (5-O-α-D glucosil fructosa) y otros oligosacáridos con un grado de polimerización (GP) menor de 7, no separados por el sistema o en concentraciones muy bajas. Entre estos dos picos principales, tal como se indica mediante las perturbaciones de la línea base, también estuvieron presentes productos de tamaño intermedio (dextranos MMI). Estos compuestos, con tamaños muy variables, entre 1000 y 10^7 Da, fueron muy polidispersos, y estuvieron a concentraciones muy bajas, lo que explica su baja intensidad en el cromatograma. Sin embargo, los análisis HPAEC-PAD confirmaron su presencia (resultados no mostrados).

La cantidad relativa de unidades de glucosilo derivadas de sacarosa e incorporadas en los diferentes productos se enumera más adelante en la Tabla 2. El rendimiento de la síntesis para el dextrano MME representa alrededor del 60% de las unidades de glucosilo para cada una de las preparaciones. La transferencia de unidades de glucosilo a agua (glucosa) o fructosa (leucrosa) representa menos del 8%, mientras la síntesis de dextranos de tamaño intermedio (MMI) representó del 25% al 32% de las unidades de glucosilo transferidas. Todas las formas recombinantes de DSR-S tendieron a sintetizar más dextranos de tamaño intermedio. Los análisis HPSEC también mostraron que la enzima nativa pareció sintetizar dos poblaciones diferentes de dextrano, en lugar de solamente una para las enzimas recombinantes. La masa molar de los dextranos MME se determinó mediante difusión de luz y se estimó que fue de más de 10^7 g/mol para todas las muestras (límite de exclusión de las columnas usadas).

Tabla 2: Porcentaje de unidades de glucosilo incorporadas en los diversos productos derivados de la síntesis de dextrano a 25 °C y 100 g/l de sacarosa, para las cuatro preparaciones de DSR-S citadas

	Glucosa	Leucrosa	Dextranos MMI	Dextranos MME	
				% rel.	MME (g/mol)
DSR-S nativa	4,12	5,80	25,60	64,47	$1,5 \times 10^8$ $8,88 \times 10^7$
DSR-S completa	2,32	5,39	29,32	62,96	$1,86 \times 10^8$
DSR-S vardel Δ4N	2,43	5,90	31,03	60,64	$4,87 \times 10^7$
DSR-S vardel Δ4N purificada	2,33	5,80	32,24	59,62	$2,47 \times 10^7$

Estructura de los dextranos formados

La estructura del dextrano producido mediante DSR-S vardel Δ4N (purificada o no) se comparó con la de los dextranos sintetizados a partir de DSR-S recombinante completa y DSR-S nativa. Estas estructuras se determinaron mediante resonancia magnética nuclear (^{1}H RMN) con el uso de un aparato Brücker AC 300, a 85 °C y con una

frecuencia de adquisición de 300,13 MHz. El tiempo de adquisición fue 3 seg, con 32 a 64 pasos. Los dextranos se separaron inicialmente de la fructosa co-producida precipitando 3 veces con 1 volumen de etanol absoluto, se recuperaron mediante centrifugación, se lavaron con agua destilada y se liofilizaron. Las muestras se disolvieron en D_2O hasta una concentración de 6 mg/ml.

Los espectros de RMN se muestran en la Figura 10. Solamente se detectaron enlaces α-1,6. También se llevó a cabo un análisis de RMN de carbono-13 con el dextrano sintetizado mediante DSR-S vardel Δ4N purificada. El espectro obtenido fue idéntico a los publicados para el dextrano de *L. mesenteroides* NRRL B-512F y DSR-S completa [3].

Estos polímeros se digirieron también con endodextranasa de *Chaetomium gracile* realizado durante 16 h a 37 °C con 3 unidades de enzima por ml de medio de síntesis. Los productos de la digestión se analizaron mediante HPAEC-PAD (Figura 11). Los perfiles de digestión obtenidos fueron idénticos a los cuatro dextranos analizados, lo que confirmó que todos tuvieron al menos un 95% de enlaces α-1,6.

Las deleciones hechas en las posiciones N- y C-terminales de la DSR-S para construir la variante DSR-S vardel Δ4N, así, no tienen una influencia significativa sobre la actividad inicial de DSR-S o sobre la porción de unidades de glucosilo derivadas de la sacarosa incorporada en la síntesis del dextrano MME, el tamaño o la estructura del polisacárido.

Comportamiento reológico de los dextranos formados

El comportamiento reológico de los cuatro dextranos se analizó mediante el uso de un sistema cono-placa (AR 1000, TA Instruments) equipado con un cono de 4 cm de diámetro en un ángulo de 3,59°, y cubriendo velocidades de 0,01 a 100 s^{-1}. Las medidas se llevaron a cabo a 25 °C. Los experimentos dinámicos se llevaron a cabo en el dominio lineal entre 0 y 10 Pa, con una deformación del 8% para el dextrano sintetizado mediante DSR-S nativa de *L. mesenteroides* NRRL B-512F (control), 3% para el sintetizado mediante la DSR-S recombinante completa, 5% para el sintetizado mediante un extracto no purificado de DSR-S vardel Δ4N y 0,4% para el sintetizado mediante DSR-S vardel Δ4N purificada. El módulo de rigidez complejo se define mediante la relación:

$$G^*(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega).$$

El módulo de conservación de energía G'(ω) es mayor cuando la muestra es predominantemente elástica o sumamente estructurada. El módulo de pérdida G" (ω) representa la energía disipada durante la deformación. Las muestras predominantemente viscosas tienen un G" (ω) elevado.

Estos análisis reológicos produjeron resultados completamente originales (Figura 12). Como se describió en la bibliografía, la DSR-S nativa sintetizó un dextrano con comportamiento newtoniano [25].

Los extractos de DSR-S recombinante completa y los extractos de DSR-S vardel Δ4N sin purificar produjeron disoluciones viscosas con un comportamiento idéntico (viscosidad alrededor de 10 veces mayor que la del dextrano producido mediante la enzima nativa). Cuando se observó a simple vista, también tuvieron un comportamiento fibroso bastante pronunciado. Además, tras la aplicación de nuevas tensiones de corte, el comportamiento de dichos polímeros cambió desde un tipo de disolución a un tipo de gel, lo cual es una propiedad nueva que se ha identificado para este tipo de biopolímero. El dextrano producido mediante la enzima nativa, en contraste, no fue fibroso, y su comportamiento fue completamente reversible tras la aplicación de una segunda serie de tensiones (Figura 12A).

La enzima purificada sintetizó directamente un polímero que tuvo las propiedades de un gel sumamente estructurado (Figura 12B, módulo G' mucho mayor que G"), que retuvo sus características en un intervalo de temperaturas de 10 °C a 70 °C (resultados no mostrados). Este comportamiento es completamente diferente del de la enzima nativa.

Solamente la preparación de DSR-S vardel Δ4N purificada contuvo solamente una dextransacarasa activa en el extracto. Se sabe que la DSR-S nativa es propensa a problemas de degradación proteolítica [26], y las técnicas de purificación desarrolladas podrían no resolver ese problema [27, 28, 29]. La DSR-S recombinante completa usada en el ensayo contuvo al menos dos formas enzimáticas activas, similares a la preparación de DSR-S vardel Δ4N antes de la purificación. Sin embargo, las formas degradadas de DSR-S nativa, DSR-S recombinante completa y DSR-S vardel Δ4N son completamente diferentes. Actualmente se supone que la cooperación entre estas diferentes formas enzimáticas activas presentes en el medio podría ser el origen de las modificaciones en las cadenas de dextrano, que provoca estas diferencias de comportamiento.

Ejemplo 6: Síntesis de isomaltosa a partir de sacarosa

Se estudió la capacidad de DSR-S vardel Δ4N mutante SEV663YDA de sintetizar solamente isomaltosa (IMO con GP 2) a partir de sacarosa en detrimento de los dextranos de masa molar elevada.

El mutante se purificó mediante cromatografía de afinidad con el uso del procedimiento descrito para DSR-S vardel Δ4N proporcionado en el Ejemplo 3.

La actividad se ensayó a 30 °C.

Con una actividad específica de solamente 9 U/mg, las mutaciones de SEV663YDA indujeron efectos graves sobre la actividad de DSR-S (pérdida del 98% de la tasa de consumo de sacarosa inicial). Esa actividad específica, sin embargo, es equivalente a la de la amilosacarasa recombinante de *N. polysaccharea* [32], que se ha estudiado de manera generalizada por su potencial de aplicación.

Las caracterizaciones que se llevaron a cabo demuestran la viabilidad de producir isomaltosa mediante esta DSR-S mutante, mientras la enzima natural produce solamente dextranos de masa molar elevada. Las síntesis se llevaron a cabo a 25 °C en un tampón que contenía una concentración de 50 mM de acetato sódico a un pH de 5,2 y 0,05 g/l de $CaCl_2$, 1 U/ml de enzima purificada y con el uso de 100 g/l de sacarosa como único sustrato, o mediante una reacción de aceptor comenzando con 100 g/l de sacarosa y 50 g/l de glucosa. El agotamiento de la sacarosa se monitorizó mediante análisis HPAEC-PAD (véase el Ejemplo 4 para las condiciones de análisis), y las reacciones se interrumpieron tras el consumo completo.

La producción de isomaltosa alcanzó así un rendimiento del 47% mediante el uso de sacarosa como único sustrato (Tabla 3 y Figura 13), un rendimiento que fue equivalente al obtenido mediante la reacción de aceptor. Así, no fue necesario añadir un aceptor exógeno. También se identificaron cantidades mínimas de isomaltotriosa, maltosa o nigerosa (no separadas por el sistema) (Figura 13), así como la presencia de otros oligosacáridos con un GP menor de 7 y de estructura desconocida.

Tabla 3: Síntesis de isomaltosa mediante DSR-S vardel Δ4N mutante SEV663YDA a partir de 100 g/l de sacarosa sola, o mediante reacción de aceptor con 50 g/l de glucosa. Concentración de los diferentes productos presentes al final de la reacción.

	100 g/l de sacarosa	100 g/l de sacarosa + 50 g/l de glucosa
Glucosa	16,73	33,14
Fructosa	45,95	42,31
isomaltosa	23,99	47,17
Otros oligosacáridos	13,33	27,38
% de residuos de glucosa transferidos a isomaltosa	47,98%	47,17%[2]

[2]: calculado a partir de los residuos de glucosilo obtenidos a partir de glucosa y sacarosa exógenas añadidas al medio.

Así, en este Ejemplo, la producción de isomaltosa obtuvo un rendimiento del 47%. Actualmente, este es el primer método que implica una única enzima para sintetizar isomaltosa a partir de sacarosa; todos los estudios anteriores estuvieron asociados a la degradación de almidón mediante un cóctel de α-amilasas y glicosidasas [11], o a la acción conjunta de dextransacarasa y dextranasa [30]. Además, la sacarosa es un sustrato barato y ampliamente disponible, y la fructosa liberada durante las síntesis constituye un coproducto cuyo valor se puede aprovechar por separado.

Ejemplo 7: Síntesis de dextrano mediante DSR-S vardel Δ3

Se produjeron diferentes formas enzimáticas de DSR-S vardel Δ3 durante el cultivo de *E. coli* TOP10. Sin embargo, la forma completa fue muy mayoritaria, y los zimogramas producidos (véase el Ejemplo 3) mostraron que solamente fue activa la forma completa.

La temperatura óptima de actividad para esta variante fue 20 °C. Así, los ensayos de actividad se llevaron a cabo a esta temperatura. La producción de DSR-S vardel Δ3 de acuerdo con el Ejemplo 2 alcanzó alrededor de 320 U/l de cultivo.

Las síntesis de dextrano se llevaron a cabo a 20 °C en un tampón que contenía 50 mM de acetato sódico, pH de 5,2, y 0,05 g/l de $CaCl_2$, 100 g/l de sacarosa y 1 U/ml de extracto de DSR-S vardel Δ3 sin purificar. El extracto de DSR-S vardel Δ3 se pudo purificar mediante cromatografía de afinidad con una resina de níquel mediante el uso del protocolo descrito para DSR-S vardel Δ4N en el Ejemplo 3. Sin embargo, debido a que el sobrenadante de sonicación contuvo solamente una única forma enzimática de dextransacarasa y *E. coli* no produjo otra enzima que pudiera consumir la sacarosa, la purificación de la variante no constituyó un prerrequisito para la caracterización rigurosa de sus propiedades. A modo de comparación, se llevaron a cabo síntesis de dextrano en las mismas condiciones que con DSR-S vardel Δ4N (sin purificar). La desaparición de la sacarosa se monitorizó mediante análisis HPAEC-PAD, y las reacciones se pararon (5 minutos, 95 °C) tras el agotamiento total.

Los productos sintetizados se analizaron y se cuantificaron mediante HPAEC-PAD y HPSEC con el uso de las condiciones descritas en el Ejemplo 4. Para los análisis HPSEC, se estimó el tamaño de los dextranos mediante el uso de dextranos disponibles comercialmente con tamaños de 2 x 10^6, 503 x 10^3, 70.000, 10.000 Da, maltoheptaosa y glucosa (Sigma).

Como se puede observar en la Figura 13, a 20 °C la variante de DSR-S vardel Δ3 sintetizó dos poblaciones de polímeros; la población principal de dextrano MME con un tamaño de 2 x 10^6 Da, que representa alrededor del 39% de los residuos de glucosilo derivados de sacarosa (Tabla 4) y una segunda población de 1.300 a 52.000 Da, centrada en el pico más alto a alrededor de 10.000 Da (alrededor del 25% de los residuos de glucosilo). Esta es la primera vez que se ha observado una segunda población de dextrano que es claramente visible en el cromatograma de HPSEC para una variante de DSR-S.

Efecto de la temperatura sobre el perfil de los productos

Las síntesis de dextrano se llevaron a cabo también a una temperatura de 10 °C, todavía con un tampón que contenía 50 mM de acetato sódico, pH 5,2, 0,05 g/l de $CaCl_2$ y 1 U/ml de enzima (actividad ensayada a 20 °C). El agotamiento de la sacarosa se monitorizó mediante análisis HPAEC-PAD, y las reacciones se pararon (5 min, 95 °C) tras el consumo total de la misma.

Como se puede observar en la Figura 14, a 10 °C la variante de DSR-S vardel Δ3 sintetizó una población de dextrano que fue muy diferente de la producida a 20 °C. El polímero principal (alrededor del 44%) formado a esa temperatura tuvo una masa molar en el intervalo de 7.000 y 1,7 x 10^5 Da centrada en el pico a alrededor de 40.000 Da.

Tabla 4: Porcentaje de unidades de glucosilo incorporadas en diferentes productos sintetizados mediante DSR-S vardel Δ4N y DSR-S vardel Δ3 a 10 °C y 20 °C partiendo de 100 g/l de sacarosa

	DSR-S vardel Δ4N		DSR-S vardel Δ3	
	20 °C	10 °C	20 °C	10 °C
Dextrano MME > 2 x 10^6 Da	55,2	37,1	39,2	8,8
Dextrano 40.000 Da	nd[1]	nd	nd	43,9
Dextrano 10.000 Da	18,2	14,7	24,8	nd
Oligosacáridos con GP ≤ 8[2]	16,2	39,1	27,3	36,7
Leucrosa	9,2	7,6	5,3	9,3
Glucosa	1,2	1,5	3,4	1,3

[1]: nd: no detectado

[2]: grado de polimerización calculado a partir del tiempo de retención estimado en el límite inferior del pico de dextrano de 10.000 Da.

Efecto de la concentración de sacarosa

Se ensayaron cuatro concentraciones crecientes de sacarosa (100, 150, 200 y 250 g/l) para las síntesis de dextrano llevadas a cabo a 20 °C y 10 °C con DSR-S vardel Δ3 (1 U/ml). El consumo total de sacarosa se monitorizó mediante análisis HPAEC-PAD, y las síntesis se pararon tras su consumo total (menos de 48 h).

Para las dos temperaturas, el incremento inicial de la concentración de sustrato favoreció la síntesis de dextranos de masa molar baja. A 20 °C, la síntesis de dextrano de 10.000 Da cambió así de un rendimiento del 25% al 48% al cambiar de 100 a 250 g/l de sacarosa inicial. A 10 °C y a partir de 250 g/l, se suprimió completamente la síntesis de dextrano MME, y la del dextrano con la población principal con una masa molar centrada alrededor de 40.000 Da alcanzó de manera ventajosa un rendimiento del 69%.

Para todos los dextranos sintetizados mediante DSR-S vardel Δ3, a 10 °C y 20 °C, y a partir de 100 a 250 g/l de sacarosa, los perfiles de digestión con endodextranasa (véase el Ejemplo 5) llevados a cabo confirmaron que la especificidad de unión de DSR-S permaneció sin cambios (mismos perfiles de oligosacáridos detectados mediante HPAEC-PAD como con DSR-S vardel Δ4N, es decir, al menos un 95% de enlaces α-1,6).

Ejemplo 8: Síntesis de dextrano mediante DSR-S vardel Core y DSR-S Core ΔA

Las variantes DSR-S vardel Core y DSR-S Core ΔA también se degradaron ligeramente durante la expresión

mediante *E. coli* TOP en las condiciones descritas en el Ejemplo 2. Sin embargo, como fue el caso para la variante DSR-S vardel Δ3, solamente la forma completa, que fue muy mayoritaria, fue activa según el zimograma (resultados no mostrados).

La temperatura de actividad óptima para estas variantes fue también 20 °C. La producción alcanzó así 38 y 180 U/L de cultivo para DSR-S vardel Core y DSR-S Core ΔA, respectivamente.

Las síntesis de dextrano se llevaron a cabo a 20 °C y 10 °C mediante el uso de 100 a 250 g/l de sacarosa en un tampón que contenía 50 mM de acetato sódico, pH 5,2, 0,05 g/l de $CaCl_2$ y 1 U/ml de extracto enzimático (no purificado). El consumo de sacarosa se monitorizó mediante análisis HPAEC-PAD y las síntesis se pararon (5 min, 95 °C) tras el agotamiento completo (menos de 48 h). Los productos formados se analizaron mediante HPAEC-PAD y HPSEC y su concentración se cuantificó como se describió en el Ejemplo 5.

La Figura 15 muestra el perfil de los productos sintetizados a 20 °C mediante las dos variantes (cromatograma de HPSEC). Se puede observar claramente que con estas variantes, y en contraste con DSR-S vardel Δ4N y DSR-S vardel Δ3, la población principal de dextrano formada tuvo una masa molar de cerca de 10.000 Da, con la base del pico entre 1.300 y 52.000 (a media altura entre 5.000 y 22.000). Con la variante DSR-S Core ΔA, la síntesis de dextrano MME se suprimió completamente (Tabla 5). Una reducción de la temperatura a 10 °C pudo incrementar los rendimientos de dextrano con ~ 10.000 Da sin una diferencia significativa de tamaño, como fue el caso con DSR-S vardel Δ3 (Tabla 5). La síntesis de dextrano con la variante DSR-S Core ΔA alcanzó así un rendimiento del 75%. Se obtuvo un rendimiento equivalente con la variante DSR-S vardel Core cuando la concentración inicial de sacarosa fue 250 g/l (resultados no mostrados).

Tabla 5: Porcentaje de unidades de glucosilo incorporadas en diferentes productos sintetizados mediante DSR-S vardel Core y DSR-S Core ΔA a 10 °C y 20 °C partiendo de 100 g/l de sacarosa

	DSR-S vardel Δ4N		DSR-S vardel Core		DSR-S Core ΔA	
	20 °C	10 °C	20 °C	10 °C	20 °C	10 °C
Dextrano MME > 2 × 10^6 Da	55,2	37,1	9,9	2,4	nd	Nd
Dextrano 10.000 Da	18,2	14,7	57,5	62,5	64,4	74,5
Oligosacáridos con GP ≤ 8[2]	16,2	39,1	19,6	14,8	19,8	10,0
Leucrosa	9,2	7,6	6,5	10,2	12,7	12,8
Glucosa	1,2	1,5	6,5	10,1	3,1	2,7

[1]: nd: no detectado

[2]: grado de polimerización calculado a partir del tiempo de retención estimado en el límite inferior del pico de dextrano de 10.000 Da.

El análisis HPAEC-PAD del dextrano sintetizado a partir de 100 g/l de sacarosa a 20 °C mediante las diferentes variantes mostró la muy elevada polidispersibilidad del producto (Figura 16), que contuvo isomalto-oligosacáridos con un GP de 2 a un GP de alrededor de 60 para DSR-S Core ΔA en particular.

Para todos los dextranos sintetizados mediante DSR-S vardel Core y DSR-S Core ΔA a 10 °C y 20 °C, y mediante el uso de 100 a 250 g/l de sacarosa, los perfiles de digestión con endodextranasa (véase el Ejemplo 5) llevados a cabo confirmaron que la especificidad de unión de DSR-S permaneció sin cambios (mismos perfiles de oligosacáridos detectados mediante HPAEC-PAD que con DSR-S vardel Δ4N, así al menos un 95% de enlaces α-1,6).

Ejemplo 9: Reacción de aceptor con glucosa

Se llevaron a cabo reacciones de aceptor a 20 °C con una proporción de sacarosa/glucosa de 2 (100 g/l de sacarosa, 50 g/l de glucosa), 1 U/ml de extracto de DSR-S vardel Δ4N, DSR-S vardel Δ3, DSR-S vardel Core y DSR-S Core ΔA en un tampón que contenía 50 mM de acetato sódico a un pH de 5,2 y 0,05 g/l de $CaCl_2$. El consumo total de sacarosa se monitorizó mediante HPAEC-PAD y las reacciones se pararon después de que se agotasen completamente. Todas las variantes sintetizaron isomalto-oligosacáridos (IMO) con un GP de 2 a alrededor de 30, en detrimento de la síntesis de polímero con un GP mayor.

Sin embargo, los rendimientos obtenidos fueron mayores para las variantes truncadas de las unidades A. Por lo tanto, la producción de IMO alcanzó un 52% en el caso de DSR-S vardel Δ3 y un 58% para DSR-S vardel Core y DSR-S Core ΔA, en lugar de un 47% en el caso de DSR-S vardel Δ4N. También se modificó la distribución de oligosacáridos (Figura 17).

Para DSR-S vardel Δ3, la proporción de IMO con un GP de 2 a GP de 15 fue menor que la de los productos

sintetizados mediante DSR-S vardel Δ4N. La situación se invirtió para los IMOs con un GP de más de 15.

De forma similar, se demostró que los mutantes DSR-S vardel Core y DSR-S Core ΔA funcionaron mejor para la síntesis de IMO con un GP elevado que DSR-S vardel Δ4N o DSR-S nativa (GP básicamente 2 a 15): la producción de IMO con un GP de 12 a un GP de 27 fue de dos a cinco veces mayor con estas dos variantes (según la proporción de las áreas superficiales obtenidas mediante HPAEC-PAD).

Referencias

[1] Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R. M., y Remaud-Simeon, M. 2001. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. International Dairy Journal 11, 675-685.

[2] Coutinho, P. M., y Henrissat, B. 1999, Carbohydrate-Active Enzymes server, http://afmb.cnrs-mrs.fr/-cazy/CAZYlindex.html

[3] Monchois, V., Remaud-Simeon, M., Russell, R. R., Monsan, P., y Willemot, R. M. 1997. Characterization of Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F dextransucrase (DSR-S) and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity. Appl.Microbiol.Biotechnol. 48,465.

[4] Koepsell, H. J., Tsuchiya, H. M., Hellman, N. N., Kazenko, A., Hoffman, C. A., Sharpe, E. S., y Jackson, R. W. 1953. Enzymatic synthesis of dextran; acceptor specificity and chain initiation. J Biol Chem 200, 793-801.

[5] Groenwall, A. J., e Ingelman, G. A. 1948. Manufacture of infusion and injection fluids. Patente de EE.UU. 2.437.518.

[6] Robyt, J. F. 1985. Dextran, págs. 753-767. En J. I. Kroschwitz (ed.), Encyclopedia of polymer Science, vol. 4. Wiley-VCH, Nueva York.

[7] Ahsan, N. 1998. Intravenous infusion of total dose iron is superior to oral iron in treatment of anemia in peritoneal dialysis patients: a single center comparative study. J Am Soc Nephrol 9, 664-8.

[8] De Belder, A. N. 1996 Medical applications of dextran and its derivatives, págs. 275-296. En S. Domitriu (ed.), Polysaccharides in medicinal applications. Marcel Dekker, Inc., Nueva York.

[9] Jagodzinski, P. P., Lewandowska, M., Januchowski, R., Franciszkiewicz, K., y Trzeciak, W. H. 2002. The effect of high molecular weight dextran sulfate on the production of interleukin-8 in monocyte cell culture. Biomed Pharmacother 56, 254-7.

[10] Hersline, R. 2004. Antiviral composition. Patente de EE.UU. 6.821.958.

[11] Nakakuki, T. 2002. Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. Pure App Chem 74, 1245-1251.

[12] Goulas, A. K., Fisher, D. A., Grimble, G. K.. Grandison, A. S., y Rastall, R. A. 2004b. Synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans by the combined use of dextransucrase and dextranase. Enzyme and Microbial Technology 35,327-338.

[13] Rousseau, V., Lepargneur, J., Roques, C., Remaud-Simeon, M., y Paul, F. 2005. Prebiotic effect of oligosaccharides on selected vaginal lactobacilli and pathogenic microorganisms. Anaerobe, 11(3),145-153.

[14] Goulas, A. K., Cooper, J. M., Grandison, A. S., y Rastall, R. A. 2004a. Synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans in a recycle membrane bioreactor by the combined use of dextransucrase and dextranase. Biotechnol Bioeng 88, 778-87.

[15] Scientific Committee On Food. 2000. Opinion on the scientific committee on food on a dextran preparation produced using Leuconostoc mesenteroides, Saccharomyces cerevisiae and Lactobacillus ssp as a novel food ingredient in bakery products. Comisión Europea, Dirección General de Sanidad y Protección de los Consumidores, Bruselas.

[16] Monchois, V., Reverte, A., Remaud-Simeon, M., Monsan, P., y Willemot, R. M. 1998. Effect of Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F dextransucrase carboxy- terminal deletions on dextran and oligosaccharide synthesis. Appl.Environ.Microbiol. 64, 1644-49.

[17] R. Kaufman, Methods in Enzymology 185, 537-566 (1990)

[18] Tannock, W. G. Probiotics and Prebiotics. Where are we going? Caister Academic Press, Wymondham, R.U. 2002

[19] Khalikova, E., Susi, P. y Korpela, T., 2005. Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: fundamentals and applications. Microbial. Mol. Biol. 69,306-25

[20] Merrifield, R.B., 1963 J. Am. Chem. Soc. 85,2149.

[21] Monsan, P., Paul, F., 1995 Enzymatic synthesis of oligosaccharides FEMS Microbiol. Rev, 16, 187-192.

[22] Sumner, J., y Howell, S. 1935. A method for determination of invertase activity. Journal of Biological Chemistry 108, 51.

[23] Gibson, G. R., Roberfroid, M. B., 1995 Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics J. Nutr., 125, 1401-12.

[24] Paul, F., Auriol, D., Oriol, E., y Monsan, P. 1984. Production and purification of dextransucrase from Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F. Ann. N.Y. Acad. Sci. 434, 267-270.

[25] Carrasco, F., Chornet, E., Overend, R. P., y Costa, J. 1989 A generalized correlation for the viscosity of dextrans in aqueous solutions as a function of temperature, concentration, and molecular weight at low shear rate. J Appl Polymer Sci 37, 2087-98.

[26] Arguello-Morales, M., Sanchez-Gonzalez. M., Canedo, M., Quirasco. M., Farres, A., y Lopez-Munguia, A. 2005. Proteolytic modification of Leuconostoc mesenteroides B-512F dextransucrase. Antonie Van Leeuwenhoek 87, 131-41.

[27] Miller, A. W., Eklund; S. H., y Robyt, J. F. 1986. Milligram to gram scale purification and characterization of dextransucrase from Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F. Carbohydr.Res. 147, 119.

[28] Kobayashi, M., y Matsumada, K. 1986. Electrophoretic analysis of the multiple forms of dextransucrase from Leuconostoc mesenteroides. J.Biochem. (Tokyo) 100, 615

[29] Kobayashi, M., Mihara, K., y Matsuda, K. 1986. Dextransucrase from Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F: characterization of the enzyme bound to Sephadex gel. Agric Biol Chem 50,551-556.

[30] Paul, F., Monsan, P., Remaud, M., Pelenc, V. Process for preparing enzymatically a sugar mixture having a high content of isomaltose from sucrose, Patente de EE.UU. 4.861.381

[31] Blood Products Committee 83rd Meeting - 21 de julio de 2005

[32] Potocki-de-Montalk, G., Remaud-Simeon, M., Willemot, R.M., Planchot, V., y Monsan, P. 1999. Sequence analysis of the gene encoding amylosucrase from Neisseria polysaccharea and characterization of the recombinant enzyme. J. Bacteriol. 181, 375-381.

[33] Barik, S. 1995. Site-directed mutagenesis by double polymerase chain reaction. Mol Biotechno/3, 1-7.

Listado de secuencias

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE TOULOUSE

<120> CONSTRUCCIÓN DE VARIANTES NUEVAS DE DEXTRANSACARASA DSR-S MEDIANTE INGENIERÍA GENÉTICA

<130> B6624A-JAZ/JV

<140> Nueva solicitud de patente PCT
<141> 2007-02-08

<150> FR 06/01117
<151> 2006-02-08

<160> 26

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 4356
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Dextransacarasa truncada

<400> 1

```
atgggatctg ataaaattat tcatctgact gatgattctt ttgatactga tgtacttaag     60
gcagatggtg caatcctggt tgatttctgg gcacactggt gcggtccgtg caaaatgatc    120
gctccgattc tggatgaaat cgctgacgaa tatcagggca aactgaccgt tgcaaaactg    180
aacatcgatc acaacccggg cactgcgccg aaatatggca tccgtggtat cccgactctg    240
ctgctgttca aaaacggtga agtggcggca accaaagtgg gtgcactgtc taaaggtcag    300
ttgaaagagt tcctcgacgc taacctggcc ggctctggat ccggtgatga cgatgacaag    360
ctcgccctta tgacacaaca agttagcggc aagtacgttg aaaaagacgg tagttggtat    420
tattattttg atgatggcaa aaatgctaaa ggtttatcaa cgatagacaa caatattcaa    480
tatttttacg agagtggtaa acaagccaaa ggacagtatg tcacaattga taatcaaaca    540
tattattttg ataagggctc aggtgatgag ttaactggtc tgcaaagcat tgatgggaac    600
atagttgctt ttaacgatga agggcaacaa atttttaatc aatattacca atctgaaaat    660
ggtacaacat actactttga tgataaagga cacgctgcta ccggtattaa gaatatcgag    720
ggcaaaaatt attattttga taatcttggg caactaaaaa aaggcttctc tggtgtgatt    780
gatggtcaaa taatgacatt tgatcaggaa acagggcaag aagtttctaa cacaacttct    840
gaaataaaag aaggtttgac gactcaaaac acggattata gcgaacataa tgcagcccac    900
ggtacggatg ctgaggactt tgaaaatatt gacggctatt taacagctag ttcatggtat    960
cgtccaacag gtattttacg taacggaaca gactgggaac cttctacaga tacagatttc   1020
agaccaatat tgtcagtgtg gtggccagat aagaacaccc aggtcaatta tttaaattac   1080
atggctgatt tagggtttat cagtaatgcg gacagttttg aaactgggga tagccaaagc   1140
```

ttattaaatg aagcaagtaa ctatgttcaa aaatcaattg aaatgaaaat tagtgcgcaa 1200
caaagtacag agtggttaaa ggatgcaatg gcggccttca ttgtcgcgca accacagtgg 1260
aatgaaacta gtgaagatat gagcaatgac catttacaaa atggcgcatt aacttatgtc 1320
aacagtccac tgacacctga cgctaattca aactttagac tacttaatcg gacaccaaca 1380
aaccagactg gtgaacaagc gtataattta gataattcaa aaggtggttt tgaattgttg 1440
ttagccaatg acgttgataa ttcaaaccct gtagtacaag cagaacaatt gaattggtta 1500
tattatttaa tgaattttgg tacgattacg gccaacgacg cggatgctaa ttttgatggt 1560
attcgtgtag atgcagtcga caatgtggat gctgatttgt tacaaattgc tgccgattat 1620
ttcaaactag cttacggtgt tgatcaaaat gatgctactg ctaatcagca tctttcaatt 1680
ttggaagatt ggagtcacaa tgatcctttg tatgtaacag atcaaggaag caatcaatta 1740
accatggatg attatgtgca cacacaatta atctggtctc taacaaaatc atctgacata 1800
cgaggtacaa tgcagcgctt cgtggattat tatatggtgg atcgatctaa tgatagtaca 1860
gaaaacgaag ccattcctaa ttacagcttt gtacgtgcac acgacagcga agtgcaaacg 1920
gttattgccc aaattgtttc cgatttgtat cctgatgttg aaaatagttt agcaccaaca 1980
acagaacaat tggcagctgc tttcaaagta tacaatgaag atgaaaaatt agcagacaaa 2040
aagtacacac aatataatat ggctagtgct tatgcgatgt tgctaaccaa taaggatact 2100
gttcctcgtg tctattatgg cgatttatat acagatgatg gtcaatatat ggcaacaaag 2160
tcaccatact atgatgcgat taacactttg ctaaaggcta gagttcagta tgttgctggt 2220
ggccaatcga tgtccgttga tagtaatgac gtgttaacaa gtgttcgcta tggtaaagat 2280
gccatgacag cttctgacac tggaacatct gagacgcgta ctgaaggtat tggagtcatc 2340
gtcagcaata acgcggagct acaattagag gatgggcata ctgtcacatt gcatatgggg 2400
gcagctcata agaaccaagc ttatcgtgct ttgttatcaa caactgcaga tggattagct 2460
tattatgata ctgatgaaaa tgcacctgtg gcgtacacag atgctaacgg cgatttgatt 2520
tttacgaatg aatcaattta tggtgtacaa aatccacaag tttctggtta cttggcagtt 2580
tgggttccgg taggtgcgca acaagatcaa gatgcacgaa cggcctctga tacaacaaca 2640
aacacgagtg ataaagtgtt ccattcaaac gctgctcttg attctcaagt catctacgaa 2700
ggtttctcaa acttccaagc atttgctaca gacagcagtg aatatacaaa cgtagtcatc 2760
gctcagaatg cggaccaatt taagcaatgg ggtgtgacaa gcttccaatt ggcaccacaa 2820
tatcgttcaa gtacagatac aagtttcttg gattcaatta ttcaaaacgg gtatgcattc 2880
acggatcgtt atgacttagg ttatggcaca ccgacaaaat atggaactgc tgatcagttg 2940
cgcgatgcta ttaaagcctt acatgctagc ggtattcaag ccattgccga ttgggtgccg 3000
gaccaaattt ataatttgcc agagcaagaa ttagctactg tcacaagaac aaattcattt 3060
ggagatgacg atacagattc tgatattgac aatgccttat atgttgtaca aagtcgtggg 3120
ggtggtcaat atcaagagat gtatggtggt gccttcttag aagagttaca ggcactctat 3180

ccatccctat ttaaagtgaa tcaaatctca actggcgttc caattgatgg cagtgtaaag 3240
attactgagt gggcggctaa gtacttcaat ggctctaaca tccaaggtaa aggtgctgga 3300
tacgtattga aagatatggg ttctaataag tactttaagg tcgtttcgaa cactgaggat 3360
ggtgactact taccaaaaca gttaactaat gatctgtcag aaactggctt tacacacgat 3420
gataaaggaa tcatctatta tacattaagt ggttatcgtg cccaaaatgc atttattcaa 3480
gatgatgata ataactatta ctattttgat aaaacaggtc atttagtaac aggtttgcaa 3540
aagattaata accataccta cttcttctta cctaatggta tcgaactggt caagagcttc 3600
ttacaaaacg aagatggtac aattgtttat ttcgataaga aaggtcatca agtttttgat 3660
caatatataa ctgatcaaaa tggaaatgcg tattactttg atgatgctgg tgtaatgctt 3720
aaatcagggc ttgcaacgat tgatggacat caacagtatt ttgatcaaaa tggtgtgcag 3780
gttaaggata agtttgtgat tggcactgat ggttataagt attactttga accaggtagt 3840
ggtaacttag ctatcctacg ttatgtgcaa aatagtaaga atcaatggtt ctattttgat 3900
ggtaatggcc atgctgtcac tggtttccaa acaattaatg gtaaaaaaca atatttctat 3960
aatgatggtc atcaaagtaa aggtgaattc attgatgcag acggggatac tttctatacg 4020
agtgccactg atggtcgcct agtaactggt gttcagaaga ttaatggtat tacctatgct 4080
tttgataaca caggaaattt gatcacaaat cagtattatc aattagcaga tggtaaatat 4140
atgttgttag atgatagtgg tcgtgcgaaa acagggtttg tattgcaaga tggtgtacta 4200
agatacttcg atcaaaacgg tgagcaagtg aaagatgcta tcattgtgga tccagatact 4260
aacttgagtt acaagggcga gcttgaaggt aagcctatcc ctaaccctct cctcggtctc 4320
gattctacgc gtaccggtca tcatcaccat caccat 4356

<210> 2
<211> 4092
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Dextransacarasa truncada

<400> 2

atgggatctg ataaaattat tcatctgact gatgattctt ttgatactga tgtacttaag 60
gcagatggtg caatcctggt tgatttctgg gcacactggt gcggtccgtg caaaatgatc 120
gctccgattc tggatgaaat cgctgacgaa tatcagggca aactgaccgt tgcaaaactg 180
aacatcgatc acaacccggg cactgcgccg aaatatggca tccgtggtat cccgactctg 240
ctgctgttca aaaacggtga agtggcggca accaaagtgg gtgcactgtc taaaggtcag 300
ttgaaagagt tcctcgacgc taacctggcc ggctctggat ccggtgatga cgatgacaag 360
ctcgccctta tgacacaaca agttagcggc aagtacgttg aaaaagacgg tagttggtat 420
tattattttg atgatggcaa aaatgctaaa ggtttatcaa cgatagacaa caatattcaa 480
tatttttacg agagtggtaa acaagccaaa ggacagtatg tcacaattga taatcaaaca 540

tattattttg ataagggctc aggtgatgag ttaactggtc tgcaaagcat tgatgggaac 600
atagttgctt ttaacgatga agggcaacaa atttttaatc aatattacca atctgaaaat 660
ggtacaacat actactttga tgataaagga cacgctgcta ccggtattaa gaatatcgag 720
ggcaaaaatt attattttga taatcttggg caactaaaaa aaggcttctc tggtgtgatt 780
gatggtcaaa taatgacatt tgatcaggaa acagggcaag aagtttctaa cacaacttct 840
gaaataaaag aaggtttgac gactcaaaac acggattata gcgaacataa tgcagcccac 900
ggtacggatg ctgaggactt tgaaaatatt gacggctatt taacagctag ttcatggtat 960
cgtccaacag gtattttacg taacggaaca gactgggaac cttctacaga tacagatttc 1020
agaccaatat tgtcagtgtg gtggccagat aagaacaccc aggtcaatta tttaaattac 1080
atggctgatt tagggtttat cagtaatgcg gacagttttg aaactgggga tagccaaagc 1140
ttattaaatg aagcaagtaa ctatgttcaa aaatcaattg aaatgaaaat tagtgcgcaa 1200
caaagtacag agtggttaaa ggatgcaatg gcggccttca ttgtcgcgca accacagtgg 1260
aatgaaacta gtgaagatat gagcaatgac catttacaaa atggcgcatt aacttatgtc 1320
aacagtccac tgacacctga cgctaattca aactttagac tacttaatcg gacaccaaca 1380
aaccagactg gtgaacaagc gtataattta gataattcaa aaggtggttt tgaattgttg 1440
ttagccaatg acgttgataa ttcaaaccct gtagtacaag cagaacaatt gaattggtta 1500
tattatttaa tgaattttgg tacgattacg gccaacgacg cggatgctaa ttttgatggt 1560
attcgtgtag atgcagtcga caatgtggat gctgatttgt tacaaattgc tgccgattat 1620
ttcaaactag cttacggtgt tgatcaaaat gatgctactg ctaatcagca tctttcaatt 1680
ttggaagatt ggagtcacaa tgatcctttg tatgtaacag atcaaggaag caatcaatta 1740
accatggatg attatgtgca cacacaatta atctggtctc taacaaaatc atctgacata 1800
cgaggtacaa tgcagcgctt cgtggattat tatatggtgg atcgatctaa tgatagtaca 1860
gaaaacgaag ccattcctaa ttacagcttt gtacgtgcac acgacagcga agtgcaaacg 1920
gttattgccc aaattgtttc cgatttgtat cctgatgttg aaaatagttt agcaccaaca 1980
acagaacaat tggcagctgc tttcaaagta tacaatgaag atgaaaaatt agcagacaaa 2040
aagtacacac aatataatat ggctagtgct tatgcgatgt tgctaaccaa taaggatact 2100
gttcctcgtg tctattatgg cgatttatat acagatgatg gtcaatatat ggcaacaaag 2160
tcaccatact atgatgcgat taacactttg ctaaaggcta gagttcagta tgttgctggt 2220
ggccaatcga tgtccgttga tagtaatgac gtgttaacaa gtgttcgcta tggtaaagat 2280
gccatgacag cttctgacac tggaacatct gagacgcgta ctgaaggtat tggagtcatc 2340
gtcagcaata acgcggagct acaattagag gatgggcata ctgtcacatt gcatatgggg 2400
gcagctcata agaaccaagc ttatcgtgct ttgttatcaa caactgcaga tggattagct 2460
tattatgata ctgatgaaaa tgcacctgtg gcgtacacag atgctaacgg cgatttgatt 2520
tttacgaatg aatcaattta tggtgtacaa aatccacaag tttctggtta cttggcagtt 2580

tgggttccgg taggtgcgca acaagatcaa gatgcacgaa cggcctctga tacaacaaca 2640
aacacgagtg ataaagtgtt ccattcaaac gctgctcttg attctcaagt catctacgaa 2700
ggtttctcaa acttccaagc atttgctaca gacagcagtg aatatacaaa cgtagtcatc 2760
gctcagaatg cggaccaatt taagcaatgg ggtgtgacaa gcttccaatt ggcaccacaa 2820
tatcgttcaa gtacagatac aagtttcttg gattcaatta ttcaaaacgg gtatgcattc 2880
acggatcgtt atgacttagg ttatggcaca ccgacaaaat atggaactgc tgatcagttg 2940
cgcgatgcta ttaaagcctt acatgctagc ggtattcaag ccattgccga ttgggtgccg 3000
gaccaaattt ataatttgcc agagcaagaa ttagctactg tcacaagaac aaattcattt 3060
ggagatgacg atacagattc tgatattgac aatgccttat atgttgtaca aagtcgtggg 3120
ggtggtcaat atcaagagat gtatggtggt gccttcttag aagagttaca ggcactctat 3180
ccatccctat ttaaagtgaa tcaaatctca actggcgttc caattgatgg cagtgtaaag 3240
attactgagt gggcggctaa gtacttcaat ggctctaaca tccaaggtaa aggtgctgga 3300
tacgtattga aagatatggg ttctaataag tactttaagg tcgtttcgaa cactgaggat 3360
ggtgactact taccaaaaca gttaactaat gatctgtcag aaactggctt tacacacgat 3420
gataaaggaa tcatctatta tacattaagt ggttatcgtg cccaaaatgc atttattcaa 3480
gatgatgata ataactatta ctattttgat aaaacaggtc atttagtaac aggtttgcaa 3540
aagattaata accataccta cttcttctta cctaatggta tcgaactggt caagagcttc 3600
ttacaaaacg aagatggtac aattgtttat ttcgataaga aaggtcatca agtttttgat 3660
caatatataa ctgatcaaaa tggaaatgcg tattactttg atgatgctgg tgtaatgctt 3720
aaatcagggc ttgcaacgat tgatggacat caacagtatt ttgatcaaaa tggtgtgcag 3780
gttaaggata agtttgtgat tggcactgat ggttataagt attactttga accaggtagt 3840
ggtaacttag ctatcctacg ttatgtgcaa aatagtaaga atcaatggtt ctattttgat 3900
ggtaatggcc atgctgtcac tggtttccaa acaattaatg gtaaaaaaca atatttctat 3960
aatgatggtc atcaaagtaa aggtgaattc attgatgcag acgggtacaa gggcgagctt 4020
gaaggtaagc ctatccctaa ccctctcctc ggtctcgatt ctacgcgtac cggtcatcat 4080
caccatcacc at 4092

<210> 3
<211> 3495
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Dextransacarasa truncada

<400> 3

atgggatctg ataaaattat tcatctgact gatgattctt ttgatactga tgtacttaag 60
gcagatggtg caatcctggt tgatttctgg gcacactggt gcggtccgtg caaaatgatc 120
gctccgattc tggatgaaat cgctgacgaa tatcagggca aactgaccgt tgcaaaactg 180

aacatcgatc acaacccggg cactgcgccg aaatatggca tccgtggtat cccgactctg 240
ctgctgttca aaaacggtga agtggcggca accaaagtgg gtgcactgtc taaaggtcag 300
ttgaaagagt tcctcgacgc taacctggcc ggctctggat ccggtgatga cgatgacaag 360
ctcgccctta tgacacaaca agttagcggc aagtacgttg aaaaagacgg tagttggtat 420
tattattttg atgatggcaa aaatgctaaa ggtttatcaa cgatagacaa caatattcaa 480
tatttttacg agagtggtaa acaagccaaa ggacagtatg tcacaattga taatcaaaca 540
tattattttg ataagggctc aggtgatgag ttaactggtc tgcaaagcat tgatgggaac 600
atagttgctt ttaacgatga agggcaacaa atttttaatc aatattacca atctgaaaat 660
ggtacaacat actactttga tgataaagga cacgctgcta ccggtattaa gaatatcgag 720
ggcaaaaatt attattttga taatcttggg caactaaaaa aaggcttctc tggtgtgatt 780
gatggtcaaa taatgacatt tgatcaggaa acagggcaag aagtttctaa cacaacttct 840
gaaataaaag aaggtttgac gactcaaaac acggattata gcgaacataa tgcagcccac 900
ggtacggatg ctgaggactt tgaaaatatt gacggctatt taacagctag ttcatggtat 960
cgtccaacag gtattttacg taacggaaca gactgggaac cttctacaga tacagatttc 1020
agaccaatat tgtcagtgtg gtggccagat aagaacaccc aggtcaatta tttaaattac 1080
atggctgatt tagggtttat cagtaatgcg gacagttttg aaactgggga tagccaaagc 1140
ttattaaatg aagcaagtaa ctatgttcaa aaatcaattg aaatgaaaat tagtgcgcaa 1200
caaagtacag agtggttaaa ggatgcaatg gcggccttca ttgtcgcgca accacagtgg 1260
aatgaaacta gtgaagatat gagcaatgac catttacaaa atggcgcatt aacttatgtc 1320
aacagtccac tgacacctga cgctaattca aactttagac tacttaatcg gacaccaaca 1380
aaccagactg gtgaacaagc gtataattta gataattcaa aaggtggttt tgaattgttg 1440
ttagccaatg acgttgataa ttcaaaccct gtagtacaag cagaacaatt gaattggtta 1500
tattatttaa tgaattttgg tacgattacg gccaacgacg cggatgctaa ttttgatggt 1560
attcgtgtag atgcagtcga caatgtggat gctgatttgt tacaaattgc tgccgattat 1620
ttcaaactag cttacggtgt tgatcaaaat gatgctactg ctaatcagca tctttcaatt 1680
ttggaagatt ggagtcacaa tgatcctttg tatgtaacag atcaaggaag caatcaatta 1740
accatggatg attatgtgca cacacaatta atctggtctc taacaaaatc atctgacata 1800
cgaggtacaa tgcagcgctt cgtggattat tatatggtgg atcgatctaa tgatagtaca 1860
gaaaacgaag ccattcctaa ttacagcttt gtacgtgcac acgacagcga agtgcaaacg 1920
gttattgccc aaattgtttc cgatttgtat cctgatgttg aaaatagttt agcaccaaca 1980
acagaacaat tggcagctgc tttcaaagta tacaatgaag atgaaaaatt agcagacaaa 2040
aagtacacac aatataatat ggctagtgct tatgcgatgt tgctaaccaa taaggatact 2100
gttcctcgtg tctattatgg cgatttatat acagatgatg gtcaatatat ggcaacaaag 2160
tcaccatact atgatgcgat taacactttg ctaaaggcta gagttcagta tgttgctggt 2220

ggccaatcga tgtccgttga tagtaatgac gtgttaacaa gtgttcgcta tggtaaagat 2280
gccatgacag cttctgacac tggaacatct gagacgcgta ctgaaggtat tggagtcatc 2340
gtcagcaata acgcggagct acaattagag gatgggcata ctgtcacatt gcatatgggg 2400
gcagctcata agaaccaagc ttatcgtgct ttgttatcaa caactgcaga tggattagct 2460
tattatgata ctgatgaaaa tgcacctgtg gcgtacacag atgctaacgg cgatttgatt 2520
tttacgaatg aatcaattta tggtgtacaa aatccacaag tttctggtta cttggcagtt 2580
tgggttccgg taggtgcgca acaagatcaa gatgcacgaa cggcctctga tacaacaaca 2640
aacacgagtg ataaagtgtt ccattcaaac gctgctcttg attctcaagt catctacgaa 2700
ggtttctcaa acttccaagc atttgctaca gacagcagtg aatatacaaa cgtagtcatc 2760
gctcagaatg cggaccaatt taagcaatgg ggtgtgacaa gcttccaatt ggcaccacaa 2820
tatcgttcaa gtacagatac aagtttcttg gattcaatta ttcaaaacgg gtatgcattc 2880
acggatcgtt atgacttagg ttatggcaca ccgacaaaat atggaactgc tgatcagttg 2940
cgcgatgcta ttaaagcctt acatgctagc ggtattcaag ccattgccga ttgggtgccg 3000
gaccaaattt ataatttgcc agagcaagaa ttagctactg tcacaagaac aaattcattt 3060
ggagatgacg atacagattc tgatattgac aatgccttat atgttgtaca aagtcgtggg 3120
ggtggtcaat atcaagagat gtatggtggt gccttcttag aagagttaca ggcactctat 3180
ccatccctat ttaaagtgaa tcaaatctca actggcgttc caattgatgg cagtgtaaag 3240
attactgagt gggcggctaa gtacttcaat ggctctaaca tccaaggtaa aggtgctgga 3300
tacgtattga aagatatggg ttctaataag tactttaagg tcgtttcgaa cactgaggat 3360
ggtgactact taccaaaaca gttaactaat gatctgtcag aaactggcta caagggcgag 3420
cttgaaggta agcctatccc taaccctctc ctcggtctcg attctacgcg taccggtcat 3480
catcaccatc accat 3495

<210> 4
<211> 3105
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Dextransacarasa truncada

<400> 4

atgggatctg ataaaattat tcatctgact gatgattctt ttgatactga tgtacttaag 60
gcagatggtg caatcctggt tgatttctgg gcacactggt gcggtccgtg caaaatgatc 120
gctccgattc tggatgaaat cgctgacgaa tatcagggca aactgaccgt tgcaaaactg 180
aacatcgatc acaacccggg cactgcgccg aaatatggca tccgtggtat cccgactctg 240
ctgctgttca aaaacggtga agtggcggca accaaagtgg gtgcactgtc taaaggtcag 300
ttgaaagagt tcctcgacgc taacctggcc ggctctggat ccggtgatga cgatgacaag 360
ctcgccctta tgggcttctc tggtgtgatt gatggtcaaa taatgacatt tgatcaggaa 420

acagggcaag aagtttctaa cacaacttct gaaataaaag aaggtttgac gactcaaaac 480
acggattata gcgaacataa tgcagcccac ggtacggatg ctgaggactt tgaaaatatt 540
gacggctatt taacagctag ttcatggtat cgtccaacag gtattttacg taacggaaca 600
gactgggaac cttctacaga tacagatttc agaccaatat tgtcagtgtg gtggccagat 660
aagaacaccc aggtcaatta tttaaattac atggctgatt tagggtttat cagtaatgcg 720
gacagttttg aaactgggga tagccaaagc ttattaaatg aagcaagtaa ctatgttcaa 780
aaatcaattg aaatgaaaat tagtgcgcaa caaagtacag agtggttaaa ggatgcaatg 840
gcggccttca ttgtcgcgca accacagtgg aatgaaacta gtgaagatat gagcaatgac 900
catttacaaa atggcgcatt aacttatgtc aacagtccac tgacacctga cgctaattca 960
aactttagac tacttaatcg gacaccaaca aaccagactg gtgaacaagc gtataattta 1020
gataattcaa aaggtggttt tgaattgttg ttagccaatg acgttgataa ttcaaaccct 1080
gtagtacaag cagaacaatt gaattggtta tattatttaa tgaattttgg tacgattacg 1140
gccaacgacg cggatgctaa ttttgatggt attcgtgtag atgcagtcga caatgtggat 1200
gctgatttgt tacaaattgc tgccgattat ttcaaactag cttacggtgt tgatcaaaat 1260
gatgctactg ctaatcagca tctttcaatt ttggaagatt ggagtcacaa tgatcctttg 1320
tatgtaacag atcaaggaag caatcaatta accatggatg attatgtgca cacacaatta 1380
atctggtctc taacaaaatc atctgacata cgaggtacaa tgcagcgctt cgtggattat 1440
tatatggtgg atcgatctaa tgatagtaca gaaaacgaag ccattcctaa ttacagcttt 1500
gtacgtgcac acgacagcga agtgcaaacg gttattgccc aaattgtttc cgatttgtat 1560
cctgatgttg aaaatagttt agcaccaaca acagaacaat tggcagctgc tttcaaagta 1620
tacaatgaag atgaaaaatt agcagacaaa aagtacacac aatataatat ggctagtgct 1680
tatgcgatgt tgctaaccaa taaggatact gttcctcgtg tctattatgg cgatttatat 1740
acagatgatg gtcaatatat ggcaacaaag tcaccatact atgatgcgat taacactttg 1800
ctaaaggcta gagttcagta tgttgctggt ggccaatcga tgtccgttga tagtaatgac 1860
gtgttaacaa gtgttcgcta tggtaaagat gccatgacag cttctgacac tggaacatct 1920
gagacgcgta ctgaaggtat tggagtcatc gtcagcaata acgcggagct acaattagag 1980
gatgggcata ctgtcacatt gcatatgggg gcagctcata agaaccaagc ttatcgtgct 2040
ttgttatcaa caactgcaga tggattagct tattatgata ctgatgaaaa tgcacctgtg 2100
gcgtacacag atgctaacgg cgatttgatt tttacgaatg aatcaattta tggtgtacaa 2160
aatccacaag tttctggtta cttggcagtt tgggttccgg taggtgcgca acaagatcaa 2220
gatgcacgaa cggcctctga tacaacaaca aacacgagtg ataaagtgtt ccattcaaac 2280
gctgctcttg attctcaagt catctacgaa ggtttctcaa acttccaagc atttgctaca 2340
gacagcagtg aatatacaaa cgtagtcatc gctcagaatg cggaccaatt taagcaatgg 2400
ggtgtgacaa gcttccaatt ggcaccacaa tatcgttcaa gtacagatac aagtttcttg 2460

gattcaatta ttcaaaacgg gtatgcattc acggatcgtt atgacttagg ttatggcaca 2520
ccgacaaaat atggaactgc tgatcagttg cgcgatgcta ttaaagcctt acatgctagc 2580
ggtattcaag ccattgccga ttgggtgccg gaccaaattt ataatttgcc agagcaagaa 2640
ttagctactg tcacaagaac aaattcattt ggagatgacg atacagattc tgatattgac 2700
aatgccttat atgttgtaca aagtcgtggg ggtggtcaat atcaagagat gtatggtggt 2760
gccttcttag aagagttaca ggcactctat ccatccctat ttaaagtgaa tcaaatctca 2820
actggcgttc caattgatgg cagtgtaaag attactgagt gggcggctaa gtacttcaat 2880
ggctctaaca tccaaggtaa aggtgctgga tacgtattga aagatatggg ttctaataag 2940
tactttaagg tcgtttcgaa cactgaggat ggtgactact taccaaaaca gttaactaat 3000
gatctgtcag aaactggcta caagggcgag cttgaaggta agcctatccc taaccctctc 3060
ctcggtctcg attctacgcg taccggtcat catcaccatc accat 3105

<210> 5
<211> 4356
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Dextransacarasa mutante

<400> 5

atgggatctg ataaaattat tcatctgact gatgattctt ttgatactga tgtacttaag 60
gcagatggtg caatcctggt tgatttctgg gcacactggt gcggtccgtg caaaatgatc 120
gctccgattc tggatgaaat cgctgacgaa tatcagggca aactgaccgt tgcaaaactg 180
aacatcgatc acaacccggg cactgcgccg aaatatggca tccgtggtat cccgactctg 240
ctgctgttca aaaacggtga agtggcggca accaaagtgg gtgcactgtc taaaggtcag 300
ttgaaagagt tcctcgacgc taacctggcc ggctctggat ccggtgatga cgatgacaag 360
ctcgccctta tgacacaaca agttagcggc aagtacgttg aaaaagacgg tagttggtat 420
tattattttg atgatggcaa aaatgctaaa ggtttatcaa cgatagacaa caatattcaa 480
tatttttacg agagtggtaa acaagccaaa ggacagtatg tcacaattga taatcaaaca 540
tattattttg ataagggctc aggtgatgag ttaactggtc tgcaaagcat tgatgggaac 600
atagttgctt ttaacgatga agggcaacaa atttttaatc aatattacca atctgaaaat 660
ggtacaacat actactttga tgataaagga cacgctgcta ccggtattaa gaatatcgag 720
ggcaaaaatt attattttga taatcttggg caactaaaaa aaggcttctc tggtgtgatt 780
gatggtcaaa taatgacatt tgatcaggaa acagggcaag aagtttctaa cacaacttct 840
gaaataaaag aaggtttgac gactcaaaac acggattata gcgaacataa tgcagcccac 900
ggtacggatg ctgaggactt tgaaaatatt gacggctatt taacagctag ttcatggtat 960
cgtccaacag gtattttacg taacggaaca gactgggaac cttctacaga tacagatttc 1020
agaccaatat tgtcagtgtg gtggccagat aagaacaccc aggtcaatta tttaaattac 1080

atggctgatt tagggtttat cagtaatgcg gacagttttg aaactgggga tagccaaagc 1140
ttattaaatg aagcaagtaa ctatgttcaa aaatcaattg aaatgaaaat tagtgcgcaa 1200
caaagtacag agtggttaaa ggatgcaatg gcggccttca ttgtcgcgca accacagtgg 1260
aatgaaacta gtgaagatat gagcaatgac catttacaaa atggcgcatt aacttatgtc 1320
aacagtccac tgacacctga cgctaattca aactttagac tacttaatcg gacaccaaca 1380
aaccagactg gtgaacaagc gtataattta gataattcaa aaggtggttt tgaattgttg 1440
ttagccaatg acgttgataa ttcaaaccct gtagtacaag cagaacaatt gaattggtta 1500
tattatttaa tgaattttgg tacgattacg gccaacgacg cggatgctaa ttttgatggt 1560
attcgtgtag atgcagtcga caatgtggat gctgatttgt tacaaattgc tgccgattat 1620
ttcaaactag cttacggtgt tgatcaaaat gatgctactg ctaatcagca tctttcaatt 1680
ttggaagatt ggagtcacaa tgatcctttg tatgtaacag atcaaggaag caatcaatta 1740
accatggatg attatgtgca cacacaatta atctggtctc taacaaaatc atctgacata 1800
cgaggtacaa tgcagcgctt cgtggattat tatatggtgg atcgatctaa tgatagtaca 1860
gaaaacgaag ccattcctaa ttacagcttt gtacgagctc acgactacga cgcgcaaacg 1920
gttattgccc aaattgtttc cgatttgtat cctgatgttg aaaatagttt agcaccaaca 1980
acagaacaat tggcagctgc tttcaaagta tacaatgaag atgaaaaatt agcagacaaa 2040
aagtacacac aatataatat ggctagtgct tatgcgatgt tgctaaccaa taaggatact 2100
gttcctcgtg tctattatgg cgatttatat acagatgatg gtcaatatat ggcaacaaag 2160
tcaccatact atgatgcgat taacactttg ctaaaggcta gagttcagta tgttgctggt 2220
ggccaatcga tgtccgttga tagtaatgac gtgttaacaa gtgttcgcta tggtaaagat 2280
gccatgacag cttctgacac tggaacatct gagacgcgta ctgaaggtat tggagtcatc 2340
gtcagcaata acgcggagct acaattagag gatgggcata ctgtcacatt gcatatgggg 2400
gcagctcata agaaccaagc ttatcgtgct ttgttatcaa caactgcaga tggattagct 2460
tattatgata ctgatgaaaa tgcacctgtg gcgtacacag atgctaacgg cgatttgatt 2520
tttacgaatg aatcaattta tggtgtacaa aatccacaag tttctggtta cttggcagtt 2580
tgggttccgg taggtgcgca acaagatcaa gatgcacgaa cggcctctga tacaacaaca 2640
aacacgagtg ataaagtgtt ccattcaaac gctgctcttg attctcaagt catctacgaa 2700
ggtttctcaa acttccaagc atttgctaca gacagcagtg aatatacaaa cgtagtcatc 2760
gctcagaatg cggaccaatt taagcaatgg ggtgtgacaa gcttccaatt ggcaccacaa 2820
tatcgttcaa gtacagatac aagtttcttg gattcaatta ttcaaaacgg gtatgcattc 2880
acggatcgtt atgacttagg ttatggcaca ccgacaaaat atggaactgc tgatcagttg 2940
cgcgatgcta ttaaagcctt acatgctagc ggtattcaag ccattgccga ttgggtgccg 3000
gaccaaattt ataatttgcc agagcaagaa ttagctactg tcacaagaac aaattcattt 3060
ggagatgacg atacagattc tgatattgac aatgccttat atgttgtaca aagtcgtggg 3120

ggtggtcaat atcaagagat gtatggtggt gccttcttag aagagttaca ggcactctat 3180
ccatccctat ttaaagtgaa tcaaatctca actggcgttc caattgatgg cagtgtaaag 3240
attactgagt gggcggctaa gtacttcaat ggctctaaca tccaaggtaa aggtgctgga 3300
tacgtattga aagatatggg ttctaataag tactttaagg tcgtttcgaa cactgaggat 3360
ggtgactact taccaaaaca gttaactaat gatctgtcag aaactggctt tacacacgat 3420
gataaaggaa tcatctatta tacattaagt ggttatcgtg cccaaaatgc atttattcaa 3480
gatgatgata ataactatta ctattttgat aaaacaggtc atttagtaac aggtttgcaa 3540
aagattaata accataccta cttcttctta cctaatggta tcgaactggt caagagcttc 3600
ttacaaaacg aagatggtac aattgtttat ttcgataaga aaggtcatca agtttttgat 3660
caatatataa ctgatcaaaa tggaaatgcg tattactttg atgatgctgg tgtaatgctt 3720
aaatcagggc ttgcaacgat tgatggacat caacagtatt ttgatcaaaa tggtgtgcag 3780
gttaaggata agtttgtgat tggcactgat ggttataagt attactttga accaggtagt 3840
ggtaacttag ctatcctacg ttatgtgcaa aatagtaaga atcaatggtt ctattttgat 3900
ggtaatggcc atgctgtcac tggtttccaa acaattaatg gtaaaaaaca atatttctat 3960
aatgatggtc atcaaagtaa aggtgaattc attgatgcag acggggatac tttctatacg 4020
agtgccactg atggtcgcct agtaactggt gttcagaaga ttaatggtat tacctatgct 4080
tttgataaca caggaaattt gatcacaaat cagtattatc aattagcaga tggtaaatat 4140
atgttgttag atgatagtgg tcgtgcgaaa acagggtttg tattgcaaga tggtgtacta 4200
agatacttcg atcaaaacgg tgagcaagtg aaagatgcta tcattgtgga tccagatact 4260
aacttgagtt acaagggcga gcttgaaggt aagcctatcc ctaaccctct cctcggtctc 4320
gattctacgc gtaccggtca tcatcaccat caccat 4356

<210> 6
<211> 1452
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Dextransacarasa truncada

<400> 6

Met Gly Ser Asp Lys Ile Ile His Leu Thr Asp Asp Ser Phe Asp Thr
1 5 10 15

Asp Val Leu Lys Ala Asp Gly Ala Ile Leu Val Asp Phe Trp Ala His
20 25 30

Trp Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Ala Pro Ile Leu Asp Glu Ile Ala
35 40 45

Asp Glu Tyr Gln Gly Lys Leu Thr Val Ala Lys Leu Asn Ile Asp His
50 55 60

Asn Pro Gly Thr Ala Pro Lys Tyr Gly Ile Arg Gly Ile Pro Thr Leu
65 70 75 80

Leu Leu Phe Lys Asn Gly Glu Val Ala Ala Thr Lys Val Gly Ala Leu
85 90 95

Ser Lys Gly Gln Leu Lys Glu Phe Leu Asp Ala Asn Leu Ala Gly Ser
100 105 110

Gly Ser Gly Asp Asp Asp Asp Lys Leu Ala Leu Met Thr Gln Gln Val
115 120 125

Ser Gly Lys Tyr Val Glu Lys Asp Gly Ser Trp Tyr Tyr Tyr Phe Asp
130 135 140

Asp Gly Lys Asn Ala Lys Gly Leu Ser Thr Ile Asp Asn Asn Ile Gln
145 150 155 160

Tyr Phe Tyr Glu Ser Gly Lys Gln Ala Lys Gly Gln Tyr Val Thr Ile
165 170 175

Asp Asn Gln Thr Tyr Tyr Phe Asp Lys Gly Ser Gly Asp Glu Leu Thr
180 185 190

Gly Leu Gln Ser Ile Asp Gly Asn Ile Val Ala Phe Asn Asp Glu Gly
195 200 205

Gln Gln Ile Phe Asn Gln Tyr Tyr Gln Ser Glu Asn Gly Thr Thr Tyr
210 215 220

Tyr Phe Asp Asp Lys Gly His Ala Ala Thr Gly Ile Lys Asn Ile Glu
225 230 235 240

Gly Lys Asn Tyr Tyr Phe Asp Asn Leu Gly Gln Leu Lys Lys Gly Phe
245 250 255

Ser Gly Val Ile Asp Gly Gln Ile Met Thr Phe Asp Gln Glu Thr Gly
260 265 270

Gln Glu Val Ser Asn Thr Thr Ser Glu Ile Lys Glu Gly Leu Thr Thr
275 280 285

Gln Asn Thr Asp Tyr Ser Glu His Asn Ala Ala His Gly Thr Asp Ala
290 295 300

Glu Asp Phe Glu Asn Ile Asp Gly Tyr Leu Thr Ala Ser Ser Trp Tyr
305 310 315 320

Arg Pro Thr Gly Ile Leu Arg Asn Gly Thr Asp Trp Glu Pro Ser Thr
325 330 335

Asp Thr Asp Phe Arg Pro Ile Leu Ser Val Trp Trp Pro Asp Lys Asn
340 345 350

Thr Gln Val Asn Tyr Leu Asn Tyr Met Ala Asp Leu Gly Phe Ile Ser
355 360 365

Asn Ala Asp Ser Phe Glu Thr Gly Asp Ser Gln Ser Leu Leu Asn Glu
370 375 380

Ala Ser Asn Tyr Val Gln Lys Ser Ile Glu Met Lys Ile Ser Ala Gln
385 390 395 400

Gln Ser Thr Glu Trp Leu Lys Asp Ala Met Ala Ala Phe Ile Val Ala
405 410 415

Gln Pro Gln Trp Asn Glu Thr Ser Glu Asp Met Ser Asn Asp His Leu
420 425 430

Gln Asn Gly Ala Leu Thr Tyr Val Asn Ser Pro Leu Thr Pro Asp Ala
435 440 445

Asn Ser Asn Phe Arg Leu Leu Asn Arg Thr Pro Thr Asn Gln Thr Gly
450 455 460

Glu Gln Ala Tyr Asn Leu Asp Asn Ser Lys Gly Gly Phe Glu Leu Leu
465 470 475 480

Leu Ala Asn Asp Val Asp Asn Ser Asn Pro Val Val Gln Ala Glu Gln
485 490 495

Leu Asn Trp Leu Tyr Tyr Leu Met Asn Phe Gly Thr Ile Thr Ala Asn
500 505 510

Asp Ala Asp Ala Asn Phe Asp Gly Ile Arg Val Asp Ala Val Asp Asn
515 520 525

Val Asp Ala Asp Leu Leu Gln Ile Ala Ala Asp Tyr Phe Lys Leu Ala
530 535 540

Tyr Gly Val Asp Gln Asn Asp Ala Thr Ala Asn Gln His Leu Ser Ile
545 550 555 560

Leu Glu Asp Trp Ser His Asn Asp Pro Leu Tyr Val Thr Asp Gln Gly
565 570 575

Ser Asn Gln Leu Thr Met Asp Asp Tyr Val His Thr Gln Leu Ile Trp
580 585 590

Ser Leu Thr Lys Ser Ser Asp Ile Arg Gly Thr Met Gln Arg Phe Val
595 600 605

Asp Tyr Tyr Met Val Asp Arg Ser Asn Asp Ser Thr Glu Asn Glu Ala
610 615 620

Ile Pro Asn Tyr Ser Phe Val Arg Ala His Asp Ser Glu Val Gln Thr
625 630 635 640

Val Ile Ala Gln Ile Val Ser Asp Leu Tyr Pro Asp Val Glu Asn Ser
645 650 655

Leu Ala Pro Thr Thr Glu Gln Leu Ala Ala Ala Phe Lys Val Tyr Asn
660 665 670

Glu Asp Glu Lys Leu Ala Asp Lys Lys Tyr Thr Gln Tyr Asn Met Ala
675 680 685

Ser Ala Tyr Ala Met Leu Leu Thr Asn Lys Asp Thr Val Pro Arg Val
690 695 700

Tyr Tyr Gly Asp Leu Tyr Thr Asp Asp Gly Gln Tyr Met Ala Thr Lys
705 710 715 720

Ser Pro Tyr Tyr Asp Ala Ile Asn Thr Leu Leu Lys Ala Arg Val Gln
725 730 735

Tyr Val Ala Gly Gly Gln Ser Met Ser Val Asp Ser Asn Asp Val Leu
740 745 750

Thr Ser Val Arg Tyr Gly Lys Asp Ala Met Thr Ala Ser Asp Thr Gly
755 760 765

Thr Ser Glu Thr Arg Thr Glu Gly Ile Gly Val Ile Val Ser Asn Asn
770 775 780

Ala Glu Leu Gln Leu Glu Asp Gly His Thr Val Thr Leu His Met Gly
785 790 795 800

Ala Ala His Lys Asn Gln Ala Tyr Arg Ala Leu Leu Ser Thr Thr Ala
805 810 815

Asp Gly Leu Ala Tyr Tyr Asp Thr Asp Glu Asn Ala Pro Val Ala Tyr
820 825 830

Thr Asp Ala Asn Gly Asp Leu Ile Phe Thr Asn Glu Ser Ile Tyr Gly
835 840 845

Val Gln Asn Pro Gln Val Ser Gly Tyr Leu Ala Val Trp Val Pro Val
850 855 860

Gly Ala Gln Gln Asp Gln Asp Ala Arg Thr Ala Ser Asp Thr Thr Thr
865 870 875 880

Asn Thr Ser Asp Lys Val Phe His Ser Asn Ala Ala Leu Asp Ser Gln
885 890 895

Val Ile Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Phe Gln Ala Phe Ala Thr Asp Ser
900 905 910

Ser Glu Tyr Thr Asn Val Val Ile Ala Gln Asn Ala Asp Gln Phe Lys
915 920 925

Gln Trp Gly Val Thr Ser Phe Gln Leu Ala Pro Gln Tyr Arg Ser Ser
930 935 940

Thr Asp Thr Ser Phe Leu Asp Ser Ile Ile Gln Asn Gly Tyr Ala Phe
945 950 955 960

Thr Asp Arg Tyr Asp Leu Gly Tyr Gly Thr Pro Thr Lys Tyr Gly Thr
965 970 975

Ala Asp Gln Leu Arg Asp Ala Ile Lys Ala Leu His Ala Ser Gly Ile
980 985 990

Gln Ala Ile Ala Asp Trp Val Pro Asp Gln Ile Tyr Asn Leu Pro Gl
995 1000 1005

Gln Glu Leu Ala Thr Val Thr Arg Thr Asn Ser Phe Gly Asp Asp
1010 1015 1020

Asp Thr Asp Ser Asp Ile Asp Asn Ala Leu Tyr Val Val Gln Ser
1025 1030 1035

Arg Gly Gly Gly Gln Tyr Gln Glu Met Tyr Gly Gly Ala Phe Leu
1040 1045 1050

Glu Glu Leu Gln Ala Leu Tyr Pro Ser Leu Phe Lys Val Asn Gln
1055 1060 1065

Ile Ser Thr Gly Val Pro Ile Asp Gly Ser Val Lys Ile Thr Glu
1070 1075 1080

Trp Ala Ala Lys Tyr Phe Asn Gly Ser Asn Ile Gln Gly Lys Gly
1085 1090 1095

Ala Gly Tyr Val Leu Lys Asp Met Gly Ser Asn Lys Tyr Phe Lys
1100 1105 1110

Val Val Ser Asn Thr Glu Asp Gly Asp Tyr Leu Pro Lys Gln Leu
1115 1120 1125

Thr Asn Asp Leu Ser Glu Thr Gly Phe Thr His Asp Asp Lys Gly
1130 1135 1140

Ile Ile Tyr Tyr Thr Leu Ser Gly Tyr Arg Ala Gln Asn Ala Phe
1145 1150 1155

Ile Gln Asp Asp Asp Asn Asn Tyr Tyr Tyr Phe Asp Lys Thr Gly
1160 1165 1170

His Leu Val Thr Gly Leu Gln Lys Ile Asn Asn His Thr Tyr Phe
1175 1180 1185

Phe Leu Pro Asn Gly Ile Glu Leu Val Lys Ser Phe Leu Gln Asn
1190 1195 1200

Glu Asp Gly Thr Ile Val Tyr Phe Asp Lys Lys Gly His Gln Val
1205 1210 1215

Phe Asp Gln Tyr Ile Thr Asp Gln Asn Gly Asn Ala Tyr Tyr Phe
1220 1225 1230

Asp Asp Ala Gly Val Met Leu Lys Ser Gly Leu Ala Thr Ile Asp
1235 1240 1245

Gly His Gln Gln Tyr Phe Asp Gln Asn Gly Val Gln Val Lys Asp
1250 1255 1260

Lys Phe Val Ile Gly Thr Asp Gly Tyr Lys Tyr Tyr Phe Glu Pro
1265 1270 1275

Gly Ser Gly Asn Leu Ala Ile Leu Arg Tyr Val Gln Asn Ser Lys
1280 1285 1290

Asn Gln Trp Phe Tyr Phe Asp Gly Asn Gly His Ala Val Thr Gly
1295 1300 1305

Phe Gln Thr Ile Asn Gly Lys Lys Gln Tyr Phe Tyr Asn Asp Gly
1310 1315 1320

His Gln Ser Lys Gly Glu Phe Ile Asp Ala Asp Gly Asp Thr Phe
1325 1330 1335

Tyr Thr Ser Ala Thr Asp Gly Arg Leu Val Thr Gly Val Gln Lys
1340 1345 1350

Ile Asn Gly Ile Thr Tyr Ala Phe Asp Asn Thr Gly Asn Leu Ile
1355 1360 1365

Thr Asn Gln Tyr Tyr Gln Leu Ala Asp Gly Lys Tyr Met Leu Leu
1370 1375 1380

Asp Asp Ser Gly Arg Ala Lys Thr Gly Phe Val Leu Gln Asp Gly
1385 1390 1395

Val Leu Arg Tyr Phe Asp Gln Asn Gly Glu Gln Val Lys Asp Ala
1400 1405 1410

Ile Ile Val Asp Pro Asp Thr Asn Leu Ser Tyr Lys Gly Glu Leu
1415 1420 1425

Glu Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr
1430 1435 1440

Arg Thr Gly His His His His His His
1445 1450

<210> 7
<211> 1364
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Dextransacarasa truncada

<400> 7

Met Gly Ser Asp Lys Ile Ile His Leu Thr Asp Asp Ser Phe Asp Thr
1 5 10 15

Asp Val Leu Lys Ala Asp Gly Ala Ile Leu Val Asp Phe Trp Ala His
20 25 30

Trp Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Ala Pro Ile Leu Asp Glu Ile Ala
35 40 45

Asp Glu Tyr Gln Gly Lys Leu Thr Val Ala Lys Leu Asn Ile Asp His
50 55 60

Asn Pro Gly Thr Ala Pro Lys Tyr Gly Ile Arg Gly Ile Pro Thr Leu
65 70 75 80

Leu Leu Phe Lys Asn Gly Glu Val Ala Ala Thr Lys Val Gly Ala Leu
85 90 95

Ser Lys Gly Gln Leu Lys Glu Phe Leu Asp Ala Asn Leu Ala Gly Ser
100 105 110

Gly Ser Gly Asp Asp Asp Asp Lys Leu Ala Leu Met Thr Gln Gln Val
115 120 125

Ser Gly Lys Tyr Val Glu Lys Asp Gly Ser Trp Tyr Tyr Tyr Phe Asp
130 135 140

Asp Gly Lys Asn Ala Lys Gly Leu Ser Thr Ile Asp Asn Asn Ile Gln
145 150 155 160

Tyr Phe Tyr Glu Ser Gly Lys Gln Ala Lys Gly Gln Tyr Val Thr Ile

165 170 175

Asp Asn Gln Thr Tyr Tyr Phe Asp Lys Gly Ser Gly Asp Glu Leu Thr
180 185 190

Gly Leu Gln Ser Ile Asp Gly Asn Ile Val Ala Phe Asn Asp Glu Gly
195 200 205

Gln Gln Ile Phe Asn Gln Tyr Tyr Gln Ser Glu Asn Gly Thr Thr Tyr
210 215 220

Tyr Phe Asp Asp Lys Gly His Ala Ala Thr Gly Ile Lys Asn Ile Glu
225 230 235 240

Gly Lys Asn Tyr Tyr Phe Asp Asn Leu Gly Gln Leu Lys Lys Gly Phe
245 250 255

Ser Gly Val Ile Asp Gly Gln Ile Met Thr Phe Asp Gln Glu Thr Gly
260 265 270

Gln Glu Val Ser Asn Thr Thr Ser Glu Ile Lys Glu Gly Leu Thr Thr
275 280 285

Gln Asn Thr Asp Tyr Ser Glu His Asn Ala Ala His Gly Thr Asp Ala
290 295 300

Glu Asp Phe Glu Asn Ile Asp Gly Tyr Leu Thr Ala Ser Ser Trp Tyr
305 310 315 320

Arg Pro Thr Gly Ile Leu Arg Asn Gly Thr Asp Trp Glu Pro Ser Thr
325 330 335

Asp Thr Asp Phe Arg Pro Ile Leu Ser Val Trp Trp Pro Asp Lys Asn
340 345 350

Thr Gln Val Asn Tyr Leu Asn Tyr Met Ala Asp Leu Gly Phe Ile Ser
355 360 365

Asn Ala Asp Ser Phe Glu Thr Gly Asp Ser Gln Ser Leu Leu Asn Glu
370 375 380

Ala Ser Asn Tyr Val Gln Lys Ser Ile Glu Met Lys Ile Ser Ala Gln
385 390 395 400

Gln Ser Thr Glu Trp Leu Lys Asp Ala Met Ala Ala Phe Ile Val Ala
405 410 415

Gln Pro Gln Trp Asn Glu Thr Ser Glu Asp Met Ser Asn Asp His Leu
420 425 430

Gln Asn Gly Ala Leu Thr Tyr Val Asn Ser Pro Leu Thr Pro Asp Ala

435 440 445

Asn Ser Asn Phe Arg Leu Leu Asn Arg Thr Pro Thr Asn Gln Thr Gly
450 455 460

Glu Gln Ala Tyr Asn Leu Asp Asn Ser Lys Gly Gly Phe Glu Leu Leu
465 470 475 480

Leu Ala Asn Asp Val Asp Asn Ser Asn Pro Val Val Gln Ala Glu Gln
485 490 495

Leu Asn Trp Leu Tyr Tyr Leu Met Asn Phe Gly Thr Ile Thr Ala Asn
500 505 510

Asp Ala Asp Ala Asn Phe Asp Gly Ile Arg Val Asp Ala Val Asp Asn
515 520 525

Val Asp Ala Asp Leu Leu Gln Ile Ala Ala Asp Tyr Phe Lys Leu Ala
530 535 540

Tyr Gly Val Asp Gln Asn Asp Ala Thr Ala Asn Gln His Leu Ser Ile
545 550 555 560

Leu Glu Asp Trp Ser His Asn Asp Pro Leu Tyr Val Thr Asp Gln Gly
565 570 575

Ser Asn Gln Leu Thr Met Asp Asp Tyr Val His Thr Gln Leu Ile Trp
580 585 590

Ser Leu Thr Lys Ser Ser Asp Ile Arg Gly Thr Met Gln Arg Phe Val
595 600 605

Asp Tyr Tyr Met Val Asp Arg Ser Asn Asp Ser Thr Glu Asn Glu Ala
610 615 620

Ile Pro Asn Tyr Ser Phe Val Arg Ala His Asp Ser Glu Val Gln Thr
625 630 635 640

Val Ile Ala Gln Ile Val Ser Asp Leu Tyr Pro Asp Val Glu Asn Ser
645 650 655

Leu Ala Pro Thr Thr Glu Gln Leu Ala Ala Ala Phe Lys Val Tyr Asn
660 665 670

Glu Asp Glu Lys Leu Ala Asp Lys Lys Tyr Thr Gln Tyr Asn Met Ala
675 680 685

Ser Ala Tyr Ala Met Leu Leu Thr Asn Lys Asp Thr Val Pro Arg Val
690 695 700

Tyr Tyr Gly Asp Leu Tyr Thr Asp Asp Gly Gln Tyr Met Ala Thr Lys

705 710 715 720

Ser Pro Tyr Tyr Asp Ala Ile Asn Thr Leu Leu Lys Ala Arg Val Gln
725 730 735

Tyr Val Ala Gly Gly Gln Ser Met Ser Val Asp Ser Asn Asp Val Leu
740 745 750

Thr Ser Val Arg Tyr Gly Lys Asp Ala Met Thr Ala Ser Asp Thr Gly
755 760 765

Thr Ser Glu Thr Arg Thr Glu Gly Ile Gly Val Ile Val Ser Asn Asn
770 775 780

Ala Glu Leu Gln Leu Glu Asp Gly His Thr Val Thr Leu His Met Gly
785 790 795 800

Ala Ala His Lys Asn Gln Ala Tyr Arg Ala Leu Leu Ser Thr Thr Ala
805 810 815

Asp Gly Leu Ala Tyr Tyr Asp Thr Asp Glu Asn Ala Pro Val Ala Tyr
820 825 830

Thr Asp Ala Asn Gly Asp Leu Ile Phe Thr Asn Glu Ser Ile Tyr Gly
835 840 845

Val Gln Asn Pro Gln Val Ser Gly Tyr Leu Ala Val Trp Val Pro Val
850 855 860

Gly Ala Gln Gln Asp Gln Asp Ala Arg Thr Ala Ser Asp Thr Thr Thr
865 870 875 880

Asn Thr Ser Asp Lys Val Phe His Ser Asn Ala Ala Leu Asp Ser Gln
885 890 895

Val Ile Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Phe Gln Ala Phe Ala Thr Asp Ser
900 905 910

Ser Glu Tyr Thr Asn Val Val Ile Ala Gln Asn Ala Asp Gln Phe Lys
915 920 925

Gln Trp Gly Val Thr Ser Phe Gln Leu Ala Pro Gln Tyr Arg Ser Ser
930 935 940

Thr Asp Thr Ser Phe Leu Asp Ser Ile Ile Gln Asn Gly Tyr Ala Phe
945 950 955 960

Thr Asp Arg Tyr Asp Leu Gly Tyr Gly Thr Pro Thr Lys Tyr Gly Thr
965 970 975

Ala Asp Gln Leu Arg Asp Ala Ile Lys Ala Leu His Ala Ser Gly Ile

980 985 990

Gln Ala Ile Ala Asp Trp Val Pro Asp Gln Ile Tyr Asn Leu Pro Gl
995 1000 1005

Gln Glu Leu Ala Thr Val Thr Arg Thr Asn Ser Phe Gly Asp Asp
1010 1015 1020

Asp Thr Asp Ser Asp Ile Asp Asn Ala Leu Tyr Val Val Gln Ser
1025 1030 1035

Arg Gly Gly Gly Gln Tyr Gln Glu Met Tyr Gly Gly Ala Phe Leu
1040 1045 1050

Glu Glu Leu Gln Ala Leu Tyr Pro Ser Leu Phe Lys Val Asn Gln
1055 1060 1065

Ile Ser Thr Gly Val Pro Ile Asp Gly Ser Val Lys Ile Thr Glu
1070 1075 1080

Trp Ala Ala Lys Tyr Phe Asn Gly Ser Asn Ile Gln Gly Lys Gly
1085 1090 1095

Ala Gly Tyr Val Leu Lys Asp Met Gly Ser Asn Lys Tyr Phe Lys
1100 1105 1110

Val Val Ser Asn Thr Glu Asp Gly Asp Tyr Leu Pro Lys Gln Leu
1115 1120 1125

Thr Asn Asp Leu Ser Glu Thr Gly Phe Thr His Asp Asp Lys Gly
1130 1135 1140

Ile Ile Tyr Tyr Thr Leu Ser Gly Tyr Arg Ala Gln Asn Ala Phe
1145 1150 1155

Ile Gln Asp Asp Asp Asn Asn Tyr Tyr Tyr Phe Asp Lys Thr Gly
1160 1165 1170

His Leu Val Thr Gly Leu Gln Lys Ile Asn Asn His Thr Tyr Phe
1175 1180 1185

Phe Leu Pro Asn Gly Ile Glu Leu Val Lys Ser Phe Leu Gln Asn
1190 1195 1200

Glu Asp Gly Thr Ile Val Tyr Phe Asp Lys Lys Gly His Gln Val
1205 1210 1215

Phe Asp Gln Tyr Ile Thr Asp Gln Asn Gly Asn Ala Tyr Tyr Phe
1220 1225 1230

Asp Asp Ala Gly Val Met Leu Lys Ser Gly Leu Ala Thr Ile Asp

1235 1240 1245

Gly His Gln Gln Tyr Phe Asp Gln Asn Gly Val Gln Val Lys Asp
1250 1255 1260

Lys Phe Val Ile Gly Thr Asp Gly Tyr Lys Tyr Tyr Phe Glu Pro
1265 1270 1275

Gly Ser Gly Asn Leu Ala Ile Leu Arg Tyr Val Gln Asn Ser Lys
1280 1285 1290

Asn Gln Trp Phe Tyr Phe Asp Gly Asn Gly His Ala Val Thr Gly
1295 1300 1305

Phe Gln Thr Ile Asn Gly Lys Lys Gln Tyr Phe Tyr Asn Asp Gly
1310 1315 1320

His Gln Ser Lys Gly Glu Phe Ile Asp Ala Asp Gly Tyr Lys Gly
1325 1330 1335

Glu Leu Glu Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp
1340 1345 1350

Ser Thr Arg Thr Gly His His His His His His
1355 1360

<210> 8
<211> 1165
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Dextransacarasa truncada

<400> 8

Met Gly Ser Asp Lys Ile Ile His Leu Thr Asp Asp Ser Phe Asp Thr
1 5 10 15

Asp Val Leu Lys Ala Asp Gly Ala Ile Leu Val Asp Phe Trp Ala His
20 25 30

Trp Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Ala Pro Ile Leu Asp Glu Ile Ala
35 40 45

Asp Glu Tyr Gln Gly Lys Leu Thr Val Ala Lys Leu Asn Ile Asp His
50 55 60

Asn Pro Gly Thr Ala Pro Lys Tyr Gly Ile Arg Gly Ile Pro Thr Leu
65 70 75 80

Leu Leu Phe Lys Asn Gly Glu Val Ala Ala Thr Lys Val Gly Ala Leu
85 90 95

Ser Lys Gly Gln Leu Lys Glu Phe Leu Asp Ala Asn Leu Ala Gly Ser
100 105 110

Gly Ser Gly Asp Asp Asp Asp Lys Leu Ala Leu Met Thr Gln Gln Val
115 120 125

Ser Gly Lys Tyr Val Glu Lys Asp Gly Ser Trp Tyr Tyr Tyr Phe Asp
130 135 140

Asp Gly Lys Asn Ala Lys Gly Leu Ser Thr Ile Asp Asn Asn Ile Gln
145 150 155 160

Tyr Phe Tyr Glu Ser Gly Lys Gln Ala Lys Gly Gln Tyr Val Thr Ile
165 170 175

Asp Asn Gln Thr Tyr Tyr Phe Asp Lys Gly Ser Gly Asp Glu Leu Thr
180 185 190

Gly Leu Gln Ser Ile Asp Gly Asn Ile Val Ala Phe Asn Asp Glu Gly
195 200 205

Gln Gln Ile Phe Asn Gln Tyr Tyr Gln Ser Glu Asn Gly Thr Thr Tyr
210 215 220

Tyr Phe Asp Asp Lys Gly His Ala Ala Thr Gly Ile Lys Asn Ile Glu
225 230 235 240

Gly Lys Asn Tyr Tyr Phe Asp Asn Leu Gly Gln Leu Lys Lys Gly Phe
245 250 255

Ser Gly Val Ile Asp Gly Gln Ile Met Thr Phe Asp Gln Glu Thr Gly
260 265 270

Gln Glu Val Ser Asn Thr Thr Ser Glu Ile Lys Glu Gly Leu Thr Thr
275 280 285

Gln Asn Thr Asp Tyr Ser Glu His Asn Ala Ala His Gly Thr Asp Ala
290 295 300

Glu Asp Phe Glu Asn Ile Asp Gly Tyr Leu Thr Ala Ser Ser Trp Tyr
305 310 315 320

Arg Pro Thr Gly Ile Leu Arg Asn Gly Thr Asp Trp Glu Pro Ser Thr
325 330 335

Asp Thr Asp Phe Arg Pro Ile Leu Ser Val Trp Trp Pro Asp Lys Asn
340 345 350

Thr Gln Val Asn Tyr Leu Asn Tyr Met Ala Asp Leu Gly Phe Ile Ser
355 360 365

Asn Ala Asp Ser Phe Glu Thr Gly Asp Ser Gln Ser Leu Leu Asn Glu
370 375 380

Ala Ser Asn Tyr Val Gln Lys Ser Ile Glu Met Lys Ile Ser Ala Gln
385 390 395 400

Gln Ser Thr Glu Trp Leu Lys Asp Ala Met Ala Ala Phe Ile Val Ala
405 410 415

Gln Pro Gln Trp Asn Glu Thr Ser Glu Asp Met Ser Asn Asp His Leu
420 425 430

Gln Asn Gly Ala Leu Thr Tyr Val Asn Ser Pro Leu Thr Pro Asp Ala
435 440 445

Asn Ser Asn Phe Arg Leu Leu Asn Arg Thr Pro Thr Asn Gln Thr Gly
450 455 460

Glu Gln Ala Tyr Asn Leu Asp Asn Ser Lys Gly Gly Phe Glu Leu Leu
465 470 475 480

Leu Ala Asn Asp Val Asp Asn Ser Asn Pro Val Val Gln Ala Glu Gln
485 490 495

Leu Asn Trp Leu Tyr Tyr Leu Met Asn Phe Gly Thr Ile Thr Ala Asn
500 505 510

Asp Ala Asp Ala Asn Phe Asp Gly Ile Arg Val Asp Ala Val Asp Asn
515 520 525

Val Asp Ala Asp Leu Leu Gln Ile Ala Ala Asp Tyr Phe Lys Leu Ala
530 535 540

Tyr Gly Val Asp Gln Asn Asp Ala Thr Ala Asn Gln His Leu Ser Ile
545 550 555 560

Leu Glu Asp Trp Ser His Asn Asp Pro Leu Tyr Val Thr Asp Gln Gly
565 570 575

Ser Asn Gln Leu Thr Met Asp Asp Tyr Val His Thr Gln Leu Ile Trp
580 585 590

Ser Leu Thr Lys Ser Ser Asp Ile Arg Gly Thr Met Gln Arg Phe Val
595 600 605

Asp Tyr Tyr Met Val Asp Arg Ser Asn Asp Ser Thr Glu Asn Glu Ala
610 615 620

Ile Pro Asn Tyr Ser Phe Val Arg Ala His Asp Ser Glu Val Gln Thr
625 630 635 640

Val Ile Ala Gln Ile Val Ser Asp Leu Tyr Pro Asp Val Glu Asn Ser
645 650 655

Leu Ala Pro Thr Thr Glu Gln Leu Ala Ala Ala Phe Lys Val Tyr Asn
660 665 670

Glu Asp Glu Lys Leu Ala Asp Lys Lys Tyr Thr Gln Tyr Asn Met Ala
675 680 685

Ser Ala Tyr Ala Met Leu Leu Thr Asn Lys Asp Thr Val Pro Arg Val
690 695 700

Tyr Tyr Gly Asp Leu Tyr Thr Asp Asp Gly Gln Tyr Met Ala Thr Lys
705 710 715 720

Ser Pro Tyr Tyr Asp Ala Ile Asn Thr Leu Leu Lys Ala Arg Val Gln
725 730 735

Tyr Val Ala Gly Gly Gln Ser Met Ser Val Asp Ser Asn Asp Val Leu
740 745 750

Thr Ser Val Arg Tyr Gly Lys Asp Ala Met Thr Ala Ser Asp Thr Gly
755 760 765

Thr Ser Glu Thr Arg Thr Glu Gly Ile Gly Val Ile Val Ser Asn Asn
770 775 780

Ala Glu Leu Gln Leu Glu Asp Gly His Thr Val Thr Leu His Met Gly
785 790 795 800

Ala Ala His Lys Asn Gln Ala Tyr Arg Ala Leu Leu Ser Thr Thr Ala
805 810 815

Asp Gly Leu Ala Tyr Tyr Asp Thr Asp Glu Asn Ala Pro Val Ala Tyr
820 825 830

Thr Asp Ala Asn Gly Asp Leu Ile Phe Thr Asn Glu Ser Ile Tyr Gly
835 840 845

Val Gln Asn Pro Gln Val Ser Gly Tyr Leu Ala Val Trp Val Pro Val
850 855 860

Gly Ala Gln Gln Asp Gln Asp Ala Arg Thr Ala Ser Asp Thr Thr Thr
865 870 875 880

Asn Thr Ser Asp Lys Val Phe His Ser Asn Ala Ala Leu Asp Ser Gln
885 890 895

Val Ile Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Phe Gln Ala Phe Ala Thr Asp Ser
900 905 910

Ser Glu Tyr Thr Asn Val Val Ile Ala Gln Asn Ala Asp Gln Phe Lys
915 920 925

Gln Trp Gly Val Thr Ser Phe Gln Leu Ala Pro Gln Tyr Arg Ser Ser
930 935 940

Thr Asp Thr Ser Phe Leu Asp Ser Ile Ile Gln Asn Gly Tyr Ala Phe
945 950 955 960

Thr Asp Arg Tyr Asp Leu Gly Tyr Gly Thr Pro Thr Lys Tyr Gly Thr
965 970 975

Ala Asp Gln Leu Arg Asp Ala Ile Lys Ala Leu His Ala Ser Gly Ile
980 985 990

Gln Ala Ile Ala Asp Trp Val Pro Asp Gln Ile Tyr Asn Leu Pro Glu
995 1000 1005

Gln Glu Leu Ala Thr Val Thr Arg Thr Asn Ser Phe Gly Asp Asp
1010 1015 1020

Asp Thr Asp Ser Asp Ile Asp Asn Ala Leu Tyr Val Val Gln Ser
1025 1030 1035

Arg Gly Gly Gly Gln Tyr Gln Glu Met Tyr Gly Gly Ala Phe Leu
1040 1045 1050

Glu Glu Leu Gln Ala Leu Tyr Pro Ser Leu Phe Lys Val Asn Gln
1055 1060 1065

Ile Ser Thr Gly Val Pro Ile Asp Gly Ser Val Lys Ile Thr Glu
1070 1075 1080

Trp Ala Ala Lys Tyr Phe Asn Gly Ser Asn Ile Gln Gly Lys Gly
1085 1090 1095

Ala Gly Tyr Val Leu Lys Asp Met Gly Ser Asn Lys Tyr Phe Lys
1100 1105 1110

Val Val Ser Asn Thr Glu Asp Gly Asp Tyr Leu Pro Lys Gln Leu
1115 1120 1125

Thr Asn Asp Leu Ser Glu Thr Gly Tyr Lys Gly Glu Leu Glu Gly
1130 1135 1140

Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr
1145 1150 1155

Gly His His His His His His
1160 1165

<210> 9
<211> 1035
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Dextransacarasa truncada

<400> 9

Met Gly Ser Asp Lys Ile Ile His Leu Thr Asp Asp Ser Phe Asp Thr
1 5 10 15

Asp Val Leu Lys Ala Asp Gly Ala Ile Leu Val Asp Phe Trp Ala His
20 25 30

Trp Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Ala Pro Ile Leu Asp Glu Ile Ala
35 40 45

Asp Glu Tyr Gln Gly Lys Leu Thr Val Ala Lys Leu Asn Ile Asp His
50 55 60

Asn Pro Gly Thr Ala Pro Lys Tyr Gly Ile Arg Gly Ile Pro Thr Leu
65 70 75 80

Leu Leu Phe Lys Asn Gly Glu Val Ala Ala Thr Lys Val Gly Ala Leu
85 90 95

Ser Lys Gly Gln Leu Lys Glu Phe Leu Asp Ala Asn Leu Ala Gly Ser
100 105 110

Gly Ser Gly Asp Asp Asp Asp Lys Leu Ala Leu Met Gly Phe Ser Gly
115 120 125

Val Ile Asp Gly Gln Ile Met Thr Phe Asp Gln Glu Thr Gly Gln Glu
130 135 140

Val Ser Asn Thr Thr Ser Glu Ile Lys Glu Gly Leu Thr Thr Gln Asn
145 150 155 160

Thr Asp Tyr Ser Glu His Asn Ala Ala His Gly Thr Asp Ala Glu Asp
165 170 175

Phe Glu Asn Ile Asp Gly Tyr Leu Thr Ala Ser Ser Trp Tyr Arg Pro
180 185 190

Thr Gly Ile Leu Arg Asn Gly Thr Asp Trp Glu Pro Ser Thr Asp Thr
195 200 205

Asp Phe Arg Pro Ile Leu Ser Val Trp Trp Pro Asp Lys Asn Thr Gln
210 215 220

Val Asn Tyr Leu Asn Tyr Met Ala Asp Leu Gly Phe Ile Ser Asn Ala

225 230 235 240

Asp Ser Phe Glu Thr Gly Asp Ser Gln Ser Leu Leu Asn Glu Ala Ser
245 250 255

Asn Tyr Val Gln Lys Ser Ile Glu Met Lys Ile Ser Ala Gln Gln Ser
260 265 270

Thr Glu Trp Leu Lys Asp Ala Met Ala Ala Phe Ile Val Ala Gln Pro
275 280 285

Gln Trp Asn Glu Thr Ser Glu Asp Met Ser Asn Asp His Leu Gln Asn
290 295 300

Gly Ala Leu Thr Tyr Val Asn Ser Pro Leu Thr Pro Asp Ala Asn Ser
305 310 315 320

Asn Phe Arg Leu Leu Asn Arg Thr Pro Thr Asn Gln Thr Gly Glu Gln
325 330 335

Ala Tyr Asn Leu Asp Asn Ser Lys Gly Gly Phe Glu Leu Leu Leu Ala
340 345 350

Asn Asp Val Asp Asn Ser Asn Pro Val Val Gln Ala Glu Gln Leu Asn
355 360 365

Trp Leu Tyr Tyr Leu Met Asn Phe Gly Thr Ile Thr Ala Asn Asp Ala
370 375 380

Asp Ala Asn Phe Asp Gly Ile Arg Val Asp Ala Val Asp Asn Val Asp
385 390 395 400

Ala Asp Leu Leu Gln Ile Ala Ala Asp Tyr Phe Lys Leu Ala Tyr Gly
405 410 415

Val Asp Gln Asn Asp Ala Thr Ala Asn Gln His Leu Ser Ile Leu Glu
420 425 430

Asp Trp Ser His Asn Asp Pro Leu Tyr Val Thr Asp Gln Gly Ser Asn
435 440 445

Gln Leu Thr Met Asp Asp Tyr Val His Thr Gln Leu Ile Trp Ser Leu
450 455 460

Thr Lys Ser Ser Asp Ile Arg Gly Thr Met Gln Arg Phe Val Asp Tyr
465 470 475 480

Tyr Met Val Asp Arg Ser Asn Asp Ser Thr Glu Asn Glu Ala Ile Pro
485 490 495

Asn Tyr Ser Phe Val Arg Ala His Asp Ser Glu Val Gln Thr Val Ile

500 505 510

Ala Gln Ile Val Ser Asp Leu Tyr Pro Asp Val Glu Asn Ser Leu Ala
515 520 525

Pro Thr Thr Glu Gln Leu Ala Ala Ala Phe Lys Val Tyr Asn Glu Asp
530 535 540

Glu Lys Leu Ala Asp Lys Lys Tyr Thr Gln Tyr Asn Met Ala Ser Ala
545 550 555 560

Tyr Ala Met Leu Leu Thr Asn Lys Asp Thr Val Pro Arg Val Tyr Tyr
565 570 575

Gly Asp Leu Tyr Thr Asp Asp Gly Gln Tyr Met Ala Thr Lys Ser Pro
580 585 590

Tyr Tyr Asp Ala Ile Asn Thr Leu Leu Lys Ala Arg Val Gln Tyr Val
595 600 605

Ala Gly Gly Gln Ser Met Ser Val Asp Ser Asn Asp Val Leu Thr Ser
610 615 620

Val Arg Tyr Gly Lys Asp Ala Met Thr Ala Ser Asp Thr Gly Thr Ser
625 630 635 640

Glu Thr Arg Thr Glu Gly Ile Gly Val Ile Val Ser Asn Asn Ala Glu
645 650 655

Leu Gln Leu Glu Asp Gly His Thr Val Thr Leu His Met Gly Ala Ala
660 665 670

His Lys Asn Gln Ala Tyr Arg Ala Leu Leu Ser Thr Thr Ala Asp Gly
675 680 685

Leu Ala Tyr Tyr Asp Thr Asp Glu Asn Ala Pro Val Ala Tyr Thr Asp
690 695 700

Ala Asn Gly Asp Leu Ile Phe Thr Asn Glu Ser Ile Tyr Gly Val Gln
705 710 715 720

Asn Pro Gln Val Ser Gly Tyr Leu Ala Val Trp Val Pro Val Gly Ala
725 730 735

Gln Gln Asp Gln Asp Ala Arg Thr Ala Ser Asp Thr Thr Thr Asn Thr
740 745 750

Ser Asp Lys Val Phe His Ser Asn Ala Ala Leu Asp Ser Gln Val Ile
755 760 765

Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Phe Gln Ala Phe Ala Thr Asp Ser Ser Glu

770 775 780

Tyr Thr Asn Val Val Ile Ala Gln Asn Ala Asp Gln Phe Lys Gln Trp
785 790 795 800

Gly Val Thr Ser Phe Gln Leu Ala Pro Gln Tyr Arg Ser Ser Thr Asp
805 810 815

Thr Ser Phe Leu Asp Ser Ile Ile Gln Asn Gly Tyr Ala Phe Thr Asp
820 825 830

Arg Tyr Asp Leu Gly Tyr Gly Thr Pro Thr Lys Tyr Gly Thr Ala Asp
835 840 845

Gln Leu Arg Asp Ala Ile Lys Ala Leu His Ala Ser Gly Ile Gln Ala
850 855 860

Ile Ala Asp Trp Val Pro Asp Gln Ile Tyr Asn Leu Pro Glu Gln Glu
865 870 875 880

Leu Ala Thr Val Thr Arg Thr Asn Ser Phe Gly Asp Asp Asp Thr Asp
885 890 895

Ser Asp Ile Asp Asn Ala Leu Tyr Val Val Gln Ser Arg Gly Gly Gly
900 905 910

Gln Tyr Gln Glu Met Tyr Gly Gly Ala Phe Leu Glu Glu Leu Gln Ala
915 920 925

Leu Tyr Pro Ser Leu Phe Lys Val Asn Gln Ile Ser Thr Gly Val Pro
930 935 940

Ile Asp Gly Ser Val Lys Ile Thr Glu Trp Ala Ala Lys Tyr Phe Asn
945 950 955 960

Gly Ser Asn Ile Gln Gly Lys Gly Ala Gly Tyr Val Leu Lys Asp Met
965 970 975

Gly Ser Asn Lys Tyr Phe Lys Val Val Ser Asn Thr Glu Asp Gly Asp
980 985 990

Tyr Leu Pro Lys Gln Leu Thr Asn Asp Leu Ser Glu Thr Gly Tyr Lys
995 1000 1005

Gly Glu Leu Glu Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu
1010 1015 1020

Asp Ser Thr Arg Thr Gly His His His His His His
1025 1030 1035

<210> 10
<211> 1452
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Dextransacarasa truncada

<400> 10

Met Gly Ser Asp Lys Ile Ile His Leu Thr Asp Asp Ser Phe Asp Thr
1 5 10 15

Asp Val Leu Lys Ala Asp Gly Ala Ile Leu Val Asp Phe Trp Ala His
20 25 30

Trp Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Ala Pro Ile Leu Asp Glu Ile Ala
35 40 45

Asp Glu Tyr Gln Gly Lys Leu Thr Val Ala Lys Leu Asn Ile Asp His
50 55 60

Asn Pro Gly Thr Ala Pro Lys Tyr Gly Ile Arg Gly Ile Pro Thr Leu
65 70 75 80

Leu Leu Phe Lys Asn Gly Glu Val Ala Ala Thr Lys Val Gly Ala Leu
85 90 95

Ser Lys Gly Gln Leu Lys Glu Phe Leu Asp Ala Asn Leu Ala Gly Ser
100 105 110

Gly Ser Gly Asp Asp Asp Asp Lys Leu Ala Leu Met Thr Gln Gln Val
115 120 125

Ser Gly Lys Tyr Val Glu Lys Asp Gly Ser Trp Tyr Tyr Tyr Phe Asp
130 135 140

Asp Gly Lys Asn Ala Lys Gly Leu Ser Thr Ile Asp Asn Asn Ile Gln
145 150 155 160

Tyr Phe Tyr Glu Ser Gly Lys Gln Ala Lys Gly Gln Tyr Val Thr Ile
165 170 175

Asp Asn Gln Thr Tyr Tyr Phe Asp Lys Gly Ser Gly Asp Glu Leu Thr
180 185 190

Gly Leu Gln Ser Ile Asp Gly Asn Ile Val Ala Phe Asn Asp Glu Gly
195 200 205

Gln Gln Ile Phe Asn Gln Tyr Tyr Gln Ser Glu Asn Gly Thr Thr Tyr
210 215 220

Tyr Phe Asp Asp Lys Gly His Ala Ala Thr Gly Ile Lys Asn Ile Glu
225 230 235 240

Gly Lys Asn Tyr Tyr Phe Asp Asn Leu Gly Gln Leu Lys Lys Gly Phe
245 250 255

Ser Gly Val Ile Asp Gly Gln Ile Met Thr Phe Asp Gln Glu Thr Gly
260 265 270

Gln Glu Val Ser Asn Thr Thr Ser Glu Ile Lys Glu Gly Leu Thr Thr
275 280 285

Gln Asn Thr Asp Tyr Ser Glu His Asn Ala Ala His Gly Thr Asp Ala
290 295 300

Glu Asp Phe Glu Asn Ile Asp Gly Tyr Leu Thr Ala Ser Ser Trp Tyr
305 310 315 320

Arg Pro Thr Gly Ile Leu Arg Asn Gly Thr Asp Trp Glu Pro Ser Thr
325 330 335

Asp Thr Asp Phe Arg Pro Ile Leu Ser Val Trp Trp Pro Asp Lys Asn
340 345 350

Thr Gln Val Asn Tyr Leu Asn Tyr Met Ala Asp Leu Gly Phe Ile Ser
355 360 365

Asn Ala Asp Ser Phe Glu Thr Gly Asp Ser Gln Ser Leu Leu Asn Glu
370 375 380

Ala Ser Asn Tyr Val Gln Lys Ser Ile Glu Met Lys Ile Ser Ala Gln
385 390 395 400

Gln Ser Thr Glu Trp Leu Lys Asp Ala Met Ala Ala Phe Ile Val Ala
405 410 415

Gln Pro Gln Trp Asn Glu Thr Ser Glu Asp Met Ser Asn Asp His Leu
420 425 430

Gln Asn Gly Ala Leu Thr Tyr Val Asn Ser Pro Leu Thr Pro Asp Ala
435 440 445

Asn Ser Asn Phe Arg Leu Leu Asn Arg Thr Pro Thr Asn Gln Thr Gly
450 455 460

Glu Gln Ala Tyr Asn Leu Asp Asn Ser Lys Gly Gly Phe Glu Leu Leu
465 470 475 480

Leu Ala Asn Asp Val Asp Asn Ser Asn Pro Val Val Gln Ala Glu Gln
485 490 495

Leu Asn Trp Leu Tyr Tyr Leu Met Asn Phe Gly Thr Ile Thr Ala Asn
500 505 510

Asp Ala Asp Ala Asn Phe Asp Gly Ile Arg Val Asp Ala Val Asp Asn
515 520 525

Val Asp Ala Asp Leu Leu Gln Ile Ala Ala Asp Tyr Phe Lys Leu Ala
530 535 540

Tyr Gly Val Asp Gln Asn Asp Ala Thr Ala Asn Gln His Leu Ser Ile
545 550 555 560

Leu Glu Asp Trp Ser His Asn Asp Pro Leu Tyr Val Thr Asp Gln Gly
565 570 575

Ser Asn Gln Leu Thr Met Asp Asp Tyr Val His Thr Gln Leu Ile Trp
580 585 590

Ser Leu Thr Lys Ser Ser Asp Ile Arg Gly Thr Met Gln Arg Phe Val
595 600 605

Asp Tyr Tyr Met Val Asp Arg Ser Asn Asp Ser Thr Glu Asn Glu Ala
610 615 620

Ile Pro Asn Tyr Ser Phe Val Arg Ala His Asp Tyr Asp Ala Gln Thr
625 630 635 640

Val Ile Ala Gln Ile Val Ser Asp Leu Tyr Pro Asp Val Glu Asn Ser
645 650 655

Leu Ala Pro Thr Thr Glu Gln Leu Ala Ala Ala Phe Lys Val Tyr Asn
660 665 670

Glu Asp Glu Lys Leu Ala Asp Lys Lys Tyr Thr Gln Tyr Asn Met Ala
675 680 685

Ser Ala Tyr Ala Met Leu Leu Thr Asn Lys Asp Thr Val Pro Arg Val
690 695 700

Tyr Tyr Gly Asp Leu Tyr Thr Asp Asp Gly Gln Tyr Met Ala Thr Lys
705 710 715 720

Ser Pro Tyr Tyr Asp Ala Ile Asn Thr Leu Leu Lys Ala Arg Val Gln
725 730 735

Tyr Val Ala Gly Gly Gln Ser Met Ser Val Asp Ser Asn Asp Val Leu
740 745 750

Thr Ser Val Arg Tyr Gly Lys Asp Ala Met Thr Ala Ser Asp Thr Gly
755 760 765

Thr Ser Glu Thr Arg Thr Glu Gly Ile Gly Val Ile Val Ser Asn Asn
770 775 780

Ala Glu Leu Gln Leu Glu Asp Gly His Thr Val Thr Leu His Met Gly
785 790 795 800

Ala Ala His Lys Asn Gln Ala Tyr Arg Ala Leu Leu Ser Thr Thr Ala
805 810 815

Asp Gly Leu Ala Tyr Tyr Asp Thr Asp Glu Asn Ala Pro Val Ala Tyr
820 825 830

Thr Asp Ala Asn Gly Asp Leu Ile Phe Thr Asn Glu Ser Ile Tyr Gly
835 840 845

Val Gln Asn Pro Gln Val Ser Gly Tyr Leu Ala Val Trp Val Pro Val
850 855 860

Gly Ala Gln Gln Asp Gln Asp Ala Arg Thr Ala Ser Asp Thr Thr Thr
865 870 875 880

Asn Thr Ser Asp Lys Val Phe His Ser Asn Ala Ala Leu Asp Ser Gln
885 890 895

Val Ile Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Phe Gln Ala Phe Ala Thr Asp Ser
900 905 910

Ser Glu Tyr Thr Asn Val Val Ile Ala Gln Asn Ala Asp Gln Phe Lys
915 920 925

Gln Trp Gly Val Thr Ser Phe Gln Leu Ala Pro Gln Tyr Arg Ser Ser
930 935 940

Thr Asp Thr Ser Phe Leu Asp Ser Ile Ile Gln Asn Gly Tyr Ala Phe
945 950 955 960

Thr Asp Arg Tyr Asp Leu Gly Tyr Gly Thr Pro Thr Lys Tyr Gly Thr
965 970 975

Ala Asp Gln Leu Arg Asp Ala Ile Lys Ala Leu His Ala Ser Gly Ile
980 985 990

Gln Ala Ile Ala Asp Trp Val Pro Asp Gln Ile Tyr Asn Leu Pro Gl
995 1000 1005

Gln Glu Leu Ala Thr Val Thr Arg Thr Asn Ser Phe Gly Asp Asp
1010 1015 1020

Asp Thr Asp Ser Asp Ile Asp Asn Ala Leu Tyr Val Val Gln Ser
1025 1030 1035

Arg Gly Gly Gly Gln Tyr Gln Glu Met Tyr Gly Gly Ala Phe Leu
1040 1045 1050

Glu Glu Leu Gln Ala Leu Tyr Pro Ser Leu Phe Lys Val Asn Gln
1055 1060 1065

Ile Ser Thr Gly Val Pro Ile Asp Gly Ser Val Lys Ile Thr Glu
1070 1075 1080

Trp Ala Ala Lys Tyr Phe Asn Gly Ser Asn Ile Gln Gly Lys Gly
1085 1090 1095

Ala Gly Tyr Val Leu Lys Asp Met Gly Ser Asn Lys Tyr Phe Lys
1100 1105 1110

Val Val Ser Asn Thr Glu Asp Gly Asp Tyr Leu Pro Lys Gln Leu
1115 1120 1125

Thr Asn Asp Leu Ser Glu Thr Gly Phe Thr His Asp Asp Lys Gly
1130 1135 1140

Ile Ile Tyr Tyr Thr Leu Ser Gly Tyr Arg Ala Gln Asn Ala Phe
1145 1150 1155

Ile Gln Asp Asp Asp Asn Asn Tyr Tyr Tyr Phe Asp Lys Thr Gly
1160 1165 1170

His Leu Val Thr Gly Leu Gln Lys Ile Asn Asn His Thr Tyr Phe
1175 1180 1185

Phe Leu Pro Asn Gly Ile Glu Leu Val Lys Ser Phe Leu Gln Asn
1190 1195 1200

Glu Asp Gly Thr Ile Val Tyr Phe Asp Lys Lys Gly His Gln Val
1205 1210 1215

Phe Asp Gln Tyr Ile Thr Asp Gln Asn Gly Asn Ala Tyr Tyr Phe
1220 1225 1230

Asp Asp Ala Gly Val Met Leu Lys Ser Gly Leu Ala Thr Ile Asp
1235 1240 1245

Gly His Gln Gln Tyr Phe Asp Gln Asn Gly Val Gln Val Lys Asp
1250 1255 1260

Lys Phe Val Ile Gly Thr Asp Gly Tyr Lys Tyr Tyr Phe Glu Pro
1265 1270 1275

Gly Ser Gly Asn Leu Ala Ile Leu Arg Tyr Val Gln Asn Ser Lys
1280 1285 1290

Asn Gln Trp Phe Tyr Phe Asp Gly Asn Gly His Ala Val Thr Gly
1295 1300 1305

Phe Gln Thr Ile Asn Gly Lys Lys Gln Tyr Phe Tyr Asn Asp Gly
1310 1315 1320

His Gln Ser Lys Gly Glu Phe Ile Asp Ala Asp Gly Asp Thr Phe
1325 1330 1335

Tyr Thr Ser Ala Thr Asp Gly Arg Leu Val Thr Gly Val Gln Lys
1340 1345 1350

Ile Asn Gly Ile Thr Tyr Ala Phe Asp Asn Thr Gly Asn Leu Ile
1355 1360 1365

Thr Asn Gln Tyr Tyr Gln Leu Ala Asp Gly Lys Tyr Met Leu Leu
1370 1375 1380

Asp Asp Ser Gly Arg Ala Lys Thr Gly Phe Val Leu Gln Asp Gly
1385 1390 1395

Val Leu Arg Tyr Phe Asp Gln Asn Gly Glu Gln Val Lys Asp Ala
1400 1405 1410

Ile Ile Val Asp Pro Asp Thr Asn Leu Ser Tyr Lys Gly Glu Leu
1415 1420 1425

Glu Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr
1430 1435 1440

Arg Thr Gly His His His His His His
1445 1450

<210> 11
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 11

ggcttctctg gtgtgatt 18

<210> 12
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 12

gatctgtcag aaactggc 18

<210> 13
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 13

acacaacaag ttagcggc 18

<210> 14
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 14

ccagatacta acttgagt 18

<210> 15
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 15

ttcattgatg cagacggg 18

<210> 16
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 16

cacgactacg acgcgcaa 18

<210> 17
<211> 3897
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Dextransacarasa truncada

<400> 17

acacaacaag ttagcggcaa gtacgttgaa aaagacggta gttggtatta ttattttgat 60
gatggcaaaa atgctaaagg tttatcaacg atagacaaca atattcaata tttttacgag 120
agtggtaaac aagccaaagg acagtatgtc acaattgata atcaaacata ttattttgat 180
aagggctcag gtgatgagtt aactggtctg caaagcattg atgggaacat agttgctttt 240
aacgatgaag ggcaacaaat ttttaatcaa tattaccaat ctgaaaatgg tacaacatac 300
tactttgatg ataaaggaca cgctgctacc ggtattaaga atatcgaggg caaaaattat 360
tattttgata atcttgggca actaaaaaaa ggcttctctg gtgtgattga tggtcaaata 420

atgacatttg atcaggaaac agggcaagaa gtttctaaca caacttctga aataaaagaa 480
ggtttgacga ctcaaaacac ggattatagc gaacataatg cagcccacgg tacggatgct 540
gaggactttg aaaatattga cggctattta acagctagtt catggtatcg tccaacaggt 600
attttacgta acggaacaga ctgggaacct tctacagata cagatttcag accaatattg 660
tcagtgtggt ggccagataa gaacacccag gtcaattatt taaattacat ggctgattta 720
gggtttatca gtaatgcgga cagttttgaa actggggata gccaaagctt attaaatgaa 780
gcaagtaact atgttcaaaa atcaattgaa atgaaaatta gtgcgcaaca aagtacagag 840
tggttaaagg atgcaatggc ggccttcatt gtcgcgcaac cacagtggaa tgaaactagt 900
gaagatatga gcaatgacca tttacaaaat ggcgcattaa cttatgtcaa cagtccactg 960
acacctgacg ctaattcaaa ctttagacta cttaatcgga caccaacaaa ccagactggt 1020
gaacaagcgt ataatttaga taattcaaaa ggtggttttg aattgttgtt agccaatgac 1080
gttgataatt caaaccctgt agtacaagca gaacaattga attggttata ttatttaatg 1140
aattttggta cgattacggc caacgacgcg gatgctaatt ttgatggtat tcgtgtagat 1200
gcagtcgaca atgtggatgc tgatttgtta caaattgctg ccgattattt caaactagct 1260
tacggtgttg atcaaaatga tgctactgct aatcagcatc tttcaatttt ggaagattgg 1320
agtcacaatg atcctttgta tgtaacagat caaggaagca atcaattaac catggatgat 1380
tatgtgcaca cacaattaat ctggtctcta acaaaatcat ctgacatacg aggtacaatg 1440
cagcgcttcg tggattatta tatggtggat cgatctaatg atagtacaga aaacgaagcc 1500
attcctaatt acagctttgt acgtgcacac gacagcgaag tgcaaacggt tattgcccaa 1560
attgtttccg atttgtatcc tgatgttgaa aatagtttag caccaacaac agaacaattg 1620
gcagctgctt tcaaagtata caatgaagat gaaaaattag cagacaaaaa gtacacacaa 1680
tataatatgg ctagtgctta tgcgatgttg ctaaccaata aggatactgt tcctcgtgtc 1740
tattatggcg atttatatac agatgatggt caatatatgg caacaaagtc accatactat 1800
gatgcgatta acactttgct aaaggctaga gttcagtatg ttgctggtgg ccaatcgatg 1860
tccgttgata gtaatgacgt gttaacaagt gttcgctatg gtaaagatgc catgacagct 1920
tctgacactg gaacatctga gacgcgtact gaaggtattg gagtcatcgt cagcaataac 1980
gcggagctac aattagagga tgggcatact gtcacattgc atatgggggc agctcataag 2040
aaccaagctt atcgtgcttt gttatcaaca actgcagatg gattagctta ttatgatact 2100
gatgaaaatg cacctgtggc gtacacagat gctaacggcg atttgatttt tacgaatgaa 2160
tcaatttatg gtgtacaaaa tccacaagtt tctggttact tggcagtttg ggttccggta 2220
ggtgcgcaac aagatcaaga tgcacgaacg gcctctgata caacaacaaa cacgagtgat 2280
aaagtgttcc attcaaacgc tgctcttgat tctcaagtca tctacgaagg tttctcaaac 2340
ttccaagcat ttgctacaga cagcagtgaa tatacaaacg tagtcatcgc tcagaatgcg 2400
gaccaattta agcaatgggg tgtgacaagc ttccaattgg caccacaata tcgttcaagt 2460

acagatacaa gtttcttgga ttcaattatt caaaacgggt atgcattcac ggatcgttat 2520
gacttaggtt atggcacacc gacaaaatat ggaactgctg atcagttgcg cgatgctatt 2580
aaagccttac atgctagcgg tattcaagcc attgccgatt gggtgccgga ccaaatttat 2640
aatttgccag agcaagaatt agctactgtc acaagaacaa attcatttgg agatgacgat 2700
acagattctg atattgacaa tgccttatat gttgtacaaa gtcgtggggg tggtcaatat 2760
caagagatgt atggtggtgc cttcttagaa gagttacagg cactctatcc atccctattt 2820
aaagtgaatc aaatctcaac tggcgttcca attgatggca gtgtaaagat tactgagtgg 2880
gcggctaagt acttcaatgg ctctaacatc caaggtaaag gtgctggata cgtattgaaa 2940
gatatgggtt ctaataagta ctttaaggtc gtttcgaaca ctgaggatgg tgactactta 3000
ccaaaacagt taactaatga tctgtcagaa actggcttta cacacgatga taaaggaatc 3060
atctattata cattaagtgg ttatcgtgcc caaaatgcat ttattcaaga tgatgataat 3120
aactattact attttgataa aacaggtcat ttagtaacag gtttgcaaaa gattaataac 3180
catacctact tcttcttacc taatggtatc gaactggtca agagcttctt acaaaacgaa 3240
gatggtacaa ttgtttattt cgataagaaa ggtcatcaag tttttgatca atatataact 3300
gatcaaaatg gaaatgcgta ttactttgat gatgctggtg taatgcttaa atcagggctt 3360
gcaacgattg atggacatca acagtatttt gatcaaaatg gtgtgcaggt taaggataag 3420
tttgtgattg gcactgatgg ttataagtat tactttgaac caggtagtgg taacttagct 3480
atcctacgtt atgtgcaaaa tagtaagaat caatggttct attttgatgg taatggccat 3540
gctgtcactg gtttccaaac aattaatggt aaaaaacaat atttctataa tgatggtcat 3600
caaagtaaag gtgaattcat tgatgcagac ggggatactt tctatacgag tgccactgat 3660
ggtcgcctag taactggtgt tcagaagatt aatggtatta cctatgcttt tgataacaca 3720
ggaaatttga tcacaaatca gtattatcaa ttagcagatg gtaaatatat gttgttagat 3780
gatagtggtc gtgcgaaaac agggtttgta ttgcaagatg gtgtactaag atacttcgat 3840
caaaacggtg agcaagtgaa agatgctatc attgtggatc cagatactaa cttgagt 3897

<210> 18
<211> 3633
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Dextransacarasa truncada

<400> 18

acacaacaag ttagcggcaa gtacgttgaa aaagacggta gttggtatta ttattttgat 60
gatggcaaaa atgctaaagg tttatcaacg atagacaaca atattcaata tttttacgag 120
agtggtaaac aagccaaagg acagtatgtc acaattgata atcaaacata ttattttgat 180
aagggctcag gtgatgagtt aactggtctg caaagcattg atgggaacat agttgctttt 240
aacgatgaag ggcaacaaat ttttaatcaa tattaccaat ctgaaaatgg tacaacatac 300

tactttgatg ataaaggaca cgctgctacc ggtattaaga atatcgaggg caaaaattat 360
tattttgata atcttgggca actaaaaaaa ggcttctctg gtgtgattga tggtcaaata 420
atgacatttg atcaggaaac agggcaagaa gtttctaaca caacttctga aataaaagaa 480
ggtttgacga ctcaaaacac ggattatagc gaacataatg cagcccacgg tacggatgct 540
gaggactttg aaaatattga cggctattta acagctagtt catggtatcg tccaacaggt 600
attttacgta acggaacaga ctgggaacct tctacagata cagatttcag accaatattg 660
tcagtgtggt ggccagataa gaacacccag gtcaattatt taaattacat ggctgattta 720
gggtttatca gtaatgcgga cagttttgaa actggggata gccaaagctt attaaatgaa 780
gcaagtaact atgttcaaaa atcaattgaa atgaaaatta gtgcgcaaca aagtacagag 840
tggttaaagg atgcaatggc ggccttcatt gtcgcgcaac cacagtggaa tgaaactagt 900
gaagatatga gcaatgacca tttacaaaat ggcgcattaa cttatgtcaa cagtccactg 960
acacctgacg ctaattcaaa ctttagacta cttaatcgga caccaacaaa ccagactggt 1020
gaacaagcgt ataatttaga taattcaaaa ggtggttttg aattgttgtt agccaatgac 1080
gttgataatt caaaccctgt agtacaagca gaacaattga attggttata ttatttaatg 1140
aattttggta cgattacggc caacgacgcg gatgctaatt ttgatggtat tcgtgtagat 1200
gcagtcgaca atgtggatgc tgatttgtta caaattgctg ccgattattt caaactagct 1260
tacggtgttg atcaaaatga tgctactgct aatcagcatc tttcaatttt ggaagattgg 1320
agtcacaatg atcctttgta tgtaacagat caaggaagca atcaattaac catggatgat 1380
tatgtgcaca cacaattaat ctggtctcta acaaaatcat ctgacatacg aggtacaatg 1440
cagcgcttcg tggattatta tatggtggat cgatctaatg atagtacaga aaacgaagcc 1500
attcctaatt acagctttgt acgtgcacac gacagcgaag tgcaaacggt tattgcccaa 1560
attgtttccg atttgtatcc tgatgttgaa aatagtttag caccaacaac agaacaattg 1620
gcagctgctt tcaaagtata caatgaagat gaaaaattag cagacaaaaa gtacacacaa 1680
tataatatgg ctagtgctta tgcgatgttg ctaaccaata aggatactgt tcctcgtgtc 1740
tattatggcg atttatatac agatgatggt caatatatgg caacaaagtc accatactat 1800
gatgcgatta acactttgct aaaggctaga gttcagtatg ttgctggtgg ccaatcgatg 1860
tccgttgata gtaatgacgt gttaacaagt gttcgctatg gtaaagatgc catgacagct 1920
tctgacactg gaacatctga gacgcgtact gaaggtattg gagtcatcgt cagcaataac 1980
gcggagctac aattagagga tgggcatact gtcacattgc atatgggggc agctcataag 2040
aaccaagctt atcgtgcttt gttatcaaca actgcagatg gattagctta ttatgatact 2100
gatgaaaatg cacctgtggc gtacacagat gctaacggcg atttgatttt tacgaatgaa 2160
tcaatttatg gtgtacaaaa tccacaagtt tctggttact tggcagtttg ggttccggta 2220
ggtgcgcaac aagatcaaga tgcacgaacg gcctctgata caacaacaaa cacgagtgat 2280
aaagtgttcc attcaaacgc tgctcttgat tctcaagtca tctacgaagg tttctcaaac 2340

ttccaagcat ttgctacaga cagcagtgaa tatacaaacg tagtcatcgc tcagaatgcg 2400
gaccaattta agcaatgggg tgtgacaagc ttccaattgg caccacaata tcgttcaagt 2460
acagatacaa gtttcttgga ttcaattatt caaaacgggt atgcattcac ggatcgttat 2520
gacttaggtt atggcacacc gacaaaatat ggaactgctg atcagttgcg cgatgctatt 2580
aaagccttac atgctagcgg tattcaagcc attgccgatt gggtgccgga ccaaatttat 2640
aatttgccag agcaagaatt agctactgtc acaagaacaa attcatttgg agatgacgat 2700
acagattctg atattgacaa tgccttatat gttgtacaaa gtcgtggggg tggtcaatat 2760
caagagatgt atggtggtgc cttcttagaa gagttacagg cactctatcc atccctattt 2820
aaagtgaatc aaatctcaac tggcgttcca attgatggca gtgtaaagat tactgagtgg 2880
gcggctaagt acttcaatgg ctctaacatc caaggtaaag gtgctggata cgtattgaaa 2940
gatatgggtt ctaataagta ctttaaggtc gtttcgaaca ctgaggatgg tgactactta 3000
ccaaaacagt taactaatga tctgtcagaa actggcttta cacacgatga taaaggaatc 3060
atctattata cattaagtgg ttatcgtgcc caaaatgcat ttattcaaga tgatgataat 3120
aactattact attttgataa aacaggtcat ttagtaacag gtttgcaaaa gattaataac 3180
catacctact tcttcttacc taatggtatc gaactggtca agagcttctt acaaaacgaa 3240
gatggtacaa ttgtttattt cgataagaaa ggtcatcaag tttttgatca atatataact 3300
gatcaaaatg gaaatgcgta ttactttgat gatgctggtg taatgcttaa atcagggctt 3360
gcaacgattg atggacatca acagtatttt gatcaaaatg gtgtgcaggt taaggataag 3420
tttgtgattg gcactgatgg ttataagtat tactttgaac caggtagtgg taacttagct 3480
atcctacgtt atgtgcaaaa tagtaagaat caatggttct attttgatgg taatggccat 3540
gctgtcactg gtttccaaac aattaatggt aaaaaacaat atttctataa tgatggtcat 3600
caaagtaaag gtgaattcat tgatgcagac ggg 3633

<210> 19
<211> 3036
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Dextransacarasa truncada

<400> 19

acacaacaag ttagcggcaa gtacgttgaa aaagacggta gttggtatta ttattttgat 60
gatggcaaaa atgctaaagg tttatcaacg atagacaaca atattcaata tttttacgag 120
agtggtaaac aagccaaagg acagtatgtc acaattgata atcaaacata ttattttgat 180
aagggctcag gtgatgagtt aactggtctg caaagcattg atgggaacat agttgctttt 240
aacgatgaag ggcaacaaat ttttaatcaa tattaccaat ctgaaaatgg tacaacatac 300
tactttgatg ataaaggaca cgctgctacc ggtattaaga atatcgaggg caaaaattat 360
tattttgata atcttgggca actaaaaaaa ggcttctctg gtgtgattga tggtcaaata 420

atgacatttg atcaggaaac agggcaagaa gtttctaaca caacttctga aataaaagaa 480
ggtttgacga ctcaaaacac ggattatagc gaacataatg cagcccacgg tacggatgct 540
gaggactttg aaaatattga cggctattta acagctagtt catggtatcg tccaacaggt 600
attttacgta acggaacaga ctgggaacct tctacagata cagatttcag accaatattg 660
tcagtgtggt ggccagataa gaacacccag gtcaattatt taaattacat ggctgattta 720
gggtttatca gtaatgcgga cagttttgaa actggggata gccaaagctt attaaatgaa 780
gcaagtaact atgttcaaaa atcaattgaa atgaaaatta gtgcgcaaca aagtacagag 840
tggttaaagg atgcaatggc ggccttcatt gtcgcgcaac cacagtggaa tgaaactagt 900
gaagatatga gcaatgacca tttacaaaat ggcgcattaa cttatgtcaa cagtccactg 960
acacctgacg ctaattcaaa ctttagacta cttaatcgga caccaacaaa ccagactggt 1020
gaacaagcgt ataatttaga taattcaaaa ggtggttttg aattgttgtt agccaatgac 1080
gttgataatt caaaccctgt agtacaagca gaacaattga attggttata ttatttaatg 1140
aattttggta cgattacggc caacgacgcg gatgctaatt ttgatggtat tcgtgtagat 1200
gcagtcgaca atgtggatgc tgatttgtta caaattgctg ccgattattt caaactagct 1260
tacggtgttg atcaaaatga tgctactgct aatcagcatc tttcaatttt ggaagattgg 1320
agtcacaatg atcctttgta tgtaacagat caaggaagca atcaattaac catggatgat 1380
tatgtgcaca cacaattaat ctggtctcta acaaaatcat ctgacatacg aggtacaatg 1440
cagcgcttcg tggattatta tatggtggat cgatctaatg atagtacaga aaacgaagcc 1500
attcctaatt acagctttgt acgtgcacac gacagcgaag tgcaaacggt tattgcccaa 1560
attgtttccg atttgtatcc tgatgttgaa aatagtttag caccaacaac agaacaattg 1620
gcagctgctt tcaaagtata caatgaagat gaaaaattag cagacaaaaa gtacacacaa 1680
tataatatgg ctagtgctta tgcgatgttg ctaaccaata aggatactgt tcctcgtgtc 1740
tattatggcg atttatatac agatgatggt caatatatgg caacaaagtc accatactat 1800
gatgcgatta acactttgct aaaggctaga gttcagtatg ttgctggtgg ccaatcgatg 1860
tccgttgata gtaatgacgt gttaacaagt gttcgctatg gtaaagatgc catgacagct 1920
tctgacactg gaacatctga gacgcgtact gaaggtattg gagtcatcgt cagcaataac 1980
gcggagctac aattagagga tgggcatact gtcacattgc atatgggggc agctcataag 2040
aaccaagctt atcgtgcttt gttatcaaca actgcagatg gattagctta ttatgatact 2100
gatgaaaatg cacctgtggc gtacacagat gctaacggcg atttgatttt tacgaatgaa 2160
tcaatttatg gtgtacaaaa tccacaagtt tctggttact tggcagtttg ggttccggta 2220
ggtgcgcaac aagatcaaga tgcacgaacg gcctctgata caacaacaaa cacgagtgat 2280
aaagtgttcc attcaaacgc tgctcttgat tctcaagtca tctacgaagg tttctcaaac 2340
ttccaagcat ttgctacaga cagcagtgaa tatacaaacg tagtcatcgc tcagaatgcg 2400
gaccaattta agcaatgggg tgtgacaagc ttccaattgg caccacaata tcgttcaagt 2460

acagatacaa gtttcttgga ttcaattatt caaaacgggt atgcattcac ggatcgttat 2520
gacttaggtt atggcacacc gacaaaatat ggaactgctg atcagttgcg cgatgctatt 2580
aaagccttac atgctagcgg tattcaagcc attgccgatt gggtgccgga ccaaatttat 2640
aatttgccag agcaagaatt agctactgtc acaagaacaa attcatttgg agatgacgat 2700
acagattctg atattgacaa tgccttatat gttgtacaaa gtcgtggggg tggtcaatat 2760
caagagatgt atggtggtgc cttcttagaa gagttacagg cactctatcc atccctattt 2820
aaagtgaatc aaatctcaac tggcgttcca attgatggca gtgtaaagat tactgagtgg 2880
gcggctaagt acttcaatgg ctctaacatc caaggtaaag gtgctggata cgtattgaaa 2940
gatatgggtt ctaataagta ctttaaggtc gtttcgaaca ctgaggatgg tgactactta 3000
ccaaaacagt taactaatga tctgtcagaa actggc 3036

<210> 20
<211> 2646
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Dextransacarasa truncada

<400> 20

ggcttctctg gtgtgattga tggtcaaata atgacatttg atcaggaaac agggcaagaa 60
gtttctaaca caacttctga aataaaagaa ggtttgacga ctcaaaacac ggattatagc 120
gaacataatg cagcccacgg tacggatgct gaggactttg aaaatattga cggctattta 180
acagctagtt catggtatcg tccaacaggt attttacgta acggaacaga ctgggaacct 240
tctacagata cagatttcag accaatattg tcagtgtggt ggccagataa gaacacccag 300
gtcaattatt taaattacat ggctgattta gggtttatca gtaatgcgga cagttttgaa 360
actggggata gccaaagctt attaaatgaa gcaagtaact atgttcaaaa atcaattgaa 420
atgaaaatta gtgcgcaaca aagtacagag tggttaaagg atgcaatggc ggccttcatt 480
gtcgcgcaac cacagtggaa tgaaactagt gaagatatga gcaatgacca tttacaaaat 540
ggcgcattaa cttatgtcaa cagtccactg acacctgacg ctaattcaaa ctttagacta 600
cttaatcgga caccaacaaa ccagactggt gaacaagcgt ataatttaga taattcaaaa 660
ggtggttttg aattgttgtt agccaatgac gttgataatt caaaccctgt agtacaagca 720
gaacaattga attggttata ttatttaatg aattttggta cgattacggc caacgacgcg 780
gatgctaatt ttgatggtat tcgtgtagat gcagtcgaca atgtggatgc tgatttgtta 840
caaattgctg ccgattattt caaactagct tacggtgttg atcaaaatga tgctactgct 900
aatcagcatc tttcaatttt ggaagattgg agtcacaatg atcctttgta tgtaacagat 960
caaggaagca atcaattaac catggatgat tatgtgcaca cacaattaat ctggtctcta 1020
acaaaatcat ctgacatacg aggtacaatg cagcgcttcg tggattatta tatggtggat 1080
cgatctaatg atagtacaga aaacgaagcc attcctaatt acagctttgt acgtgcacac 1140

gacagcgaag tgcaaacggt tattgcccaa attgtttccg atttgtatcc tgatgttgaa 1200
aatagtttag caccaacaac agaacaattg gcagctgctt tcaaagtata caatgaagat 1260
gaaaaattag cagacaaaaa gtacacacaa tataatatgg ctagtgctta tgcgatgttg 1320
ctaaccaata aggatactgt tcctcgtgtc tattatggcg atttatatac agatgatggt 1380
caatatatgg caacaaagtc accatactat gatgcgatta acactttgct aaaggctaga 1440
gttcagtatg ttgctggtgg ccaatcgatg tccgttgata gtaatgacgt gttaacaagt 1500
gttcgctatg gtaaagatgc catgacagct tctgacactg gaacatctga gacgcgtact 1560
gaaggtattg gagtcatcgt cagcaataac gcggagctac aattagagga tgggcatact 1620
gtcacattgc atatgggggc agctcataag aaccaagctt atcgtgcttt gttatcaaca 1680
actgcagatg gattagctta ttatgatact gatgaaaatg cacctgtggc gtacacagat 1740
gctaacggcg atttgatttt tacgaatgaa tcaatttatg gtgtacaaaa tccacaagtt 1800
tctggttact tggcagtttg ggttccggta ggtgcgcaac aagatcaaga tgcacgaacg 1860
gcctctgata caacaacaaa cacgagtgat aaagtgttcc attcaaacgc tgctcttgat 1920
tctcaagtca tctacgaagg tttctcaaac ttccaagcat ttgctacaga cagcagtgaa 1980
tatacaaacg tagtcatcgc tcagaatgcg gaccaattta agcaatgggg tgtgacaagc 2040
ttccaattgg caccacaata tcgttcaagt acagatacaa gtttcttgga ttcaattatt 2100
caaaacgggt atgcattcac ggatcgttat gacttaggtt atggcacacc gacaaaatat 2160
ggaactgctg atcagttgcg cgatgctatt aaagccttac atgctagcgg tattcaagcc 2220
attgccgatt gggtgccgga ccaaatttat aatttgccag agcaagaatt agctactgtc 2280
acaagaacaa attcatttgg agatgacgat acagattctg atattgacaa tgccttatat 2340
gttgtacaaa gtcgtggggg tggtcaatat caagagatgt atggtggtgc cttcttagaa 2400
gagttacagg cactctatcc atccctattt aaagtgaatc aaatctcaac tggcgttcca 2460
attgatggca gtgtaaagat tactgagtgg gcggctaagt acttcaatgg ctctaacatc 2520
caaggtaaag gtgctggata cgtattgaaa gatatgggtt ctaataagta ctttaaggtc 2580
gtttcgaaca ctgaggatgg tgactactta ccaaaacagt taactaatga tctgtcagaa 2640
actggc 2646

<210> 21
<211> 3897
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Mutado / truncado

<400> 21

acacaacaag ttagcggcaa gtacgttgaa aaagacggta gttggtatta ttattttgat 60
gatggcaaaa atgctaaagg tttatcaacg atagacaaca atattcaata tttttacgag 120
agtggtaaac aagccaaagg acagtatgtc acaattgata atcaaacata ttattttgat 180

aagggctcag gtgatgagtt aactggtctg caaagcattg atgggaacat agttgctttt 240
aacgatgaag ggcaacaaat ttttaatcaa tattaccaat ctgaaaatgg tacaacatac 300
tactttgatg ataaaggaca cgctgctacc ggtattaaga atatcgaggg caaaaattat 360
tattttgata atcttgggca actaaaaaaa ggcttctctg gtgtgattga tggtcaaata 420
atgacatttg atcaggaaac agggcaagaa gtttctaaca caacttctga aataaaagaa 480
ggtttgacga ctcaaaacac ggattatagc gaacataatg cagcccacgg tacggatgct 540
gaggactttg aaaatattga cggctattta acagctagtt catggtatcg tccaacaggt 600
attttacgta acggaacaga ctgggaacct tctacagata cagatttcag accaatattg 660
tcagtgtggt ggccagataa gaacacccag gtcaattatt taaattacat ggctgattta 720
gggtttatca gtaatgcgga cagttttgaa actggggata gccaaagctt attaaatgaa 780
gcaagtaact atgttcaaaa atcaattgaa atgaaaatta gtgcgcaaca aagtacagag 840
tggttaaagg atgcaatggc ggccttcatt gtcgcgcaac cacagtggaa tgaaactagt 900
gaagatatga gcaatgacca tttacaaaat ggcgcattaa cttatgtcaa cagtccactg 960
acacctgacg ctaattcaaa ctttagacta cttaatcgga caccaacaaa ccagactggt 1020
gaacaagcgt ataatttaga taattcaaaa ggtggttttg aattgttgtt agccaatgac 1080
gttgataatt caaaccctgt agtacaagca gaacaattga attggttata ttatttaatg 1140
aattttggta cgattacggc caacgacgcg gatgctaatt ttgatggtat tcgtgtagat 1200
gcagtcgaca atgtggatgc tgatttgtta caaattgctg ccgattattt caaactagct 1260
tacggtgttg atcaaaatga tgctactgct aatcagcatc tttcaatttt ggaagattgg 1320
agtcacaatg atcctttgta tgtaacagat caaggaagca atcaattaac catggatgat 1380
tatgtgcaca cacaattaat ctggtctcta acaaaatcat ctgacatacg aggtacaatg 1440
cagcgcttcg tggattatta tatggtggat cgatctaatg atagtacaga aaacgaagcc 1500
attcctaatt acagctttgt acgagctcac gactacgacg cgcaaacggt tattgcccaa 1560
attgtttccg atttgtatcc tgatgttgaa aatagtttag caccaacaac agaacaattg 1620
gcagctgctt tcaaagtata caatgaagat gaaaaattag cagacaaaaa gtacacacaa 1680
tataatatgg ctagtgctta tgcgatgttg ctaaccaata aggatactgt tcctcgtgtc 1740
tattatggcg atttatatac agatgatggt caatatatgg caacaaagtc accatactat 1800
gatgcgatta acactttgct aaaggctaga gttcagtatg ttgctggtgg ccaatcgatg 1860
tccgttgata gtaatgacgt gttaacaagt gttcgctatg gtaaagatgc catgacagct 1920
tctgacactg gaacatctga gacgcgtact gaaggtattg gagtcatcgt cagcaataac 1980
gcggagctac aattagagga tgggcatact gtcacattgc atatgggggc agctcataag 2040
aaccaagctt atcgtgcttt gttatcaaca actgcagatg gattagctta ttatgatact 2100
gatgaaaatg cacctgtggc gtacacagat gctaacggcg atttgatttt tacgaatgaa 2160
tcaatttatg gtgtacaaaa tccacaagtt tctggttact tggcagtttg ggttccggta 2220

ggtgcgcaac aagatcaaga tgcacgaacg gcctctgata caacaacaaa cacgagtgat 2280
aaagtgttcc attcaaacgc tgctcttgat tctcaagtca tctacgaagg tttctcaaac 2340
ttccaagcat ttgctacaga cagcagtgaa tatacaaacg tagtcatcgc tcagaatgcg 2400
gaccaattta agcaatgggg tgtgacaagc ttccaattgg caccacaata tcgttcaagt 2460
acagatacaa gtttcttgga ttcaattatt caaaacgggt atgcattcac ggatcgttat 2520
gacttaggtt atggcacacc gacaaaatat ggaactgctg atcagttgcg cgatgctatt 2580
aaagccttac atgctagcgg tattcaagcc attgccgatt gggtgccgga ccaaatttat 2640
aatttgccag agcaagaatt agctactgtc acaagaacaa attcatttgg agatgacgat 2700
acagattctg atattgacaa tgccttatat gttgtacaaa gtcgtggggg tggtcaatat 2760
caagagatgt atggtggtgc cttcttagaa gagttacagg cactctatcc atccctattt 2820
aaagtgaatc aaatctcaac tggcgttcca attgatggca gtgtaaagat tactgagtgg 2880
gcggctaagt acttcaatgg ctctaacatc caaggtaaag gtgctggata cgtattgaaa 2940
gatatgggtt ctaataagta ctttaaggtc gtttcgaaca ctgaggatgg tgactactta 3000
ccaaaacagt taactaatga tctgtcagaa actggcttta cacacgatga taaaggaatc 3060
atctattata cattaagtgg ttatcgtgcc caaaatgcat ttattcaaga tgatgataat 3120
aactattact attttgataa aacaggtcat ttagtaacag gtttgcaaaa gattaataac 3180
catacctact tcttcttacc taatggtatc gaactggtca agagcttctt acaaaacgaa 3240
gatggtacaa ttgtttattt cgataagaaa ggtcatcaag tttttgatca atatataact 3300
gatcaaaatg gaaatgcgta ttactttgat gatgctggtg taatgcttaa atcagggctt 3360
gcaacgattg atggacatca acagtatttt gatcaaaatg gtgtgcaggt taaggataag 3420
tttgtgattg gcactgatgg ttataagtat tactttgaac caggtagtgg taacttagct 3480
atcctacgtt atgtgcaaaa tagtaagaat caatggttct attttgatgg taatggccat 3540
gctgtcactg gtttccaaac aattaatggt aaaaaacaat atttctataa tgatggtcat 3600
caaagtaaag gtgaattcat tgatgcagac ggggatactt tctatacgag tgccactgat 3660
ggtcgcctag taactggtgt tcagaagatt aatggtatta cctatgcttt tgataacaca 3720
ggaaatttga tcacaaatca gtattatcaa ttagcagatg gtaaatatat gttgttagat 3780
gatagtggtc gtgcgaaaac agggtttgta ttgcaagatg gtgtactaag atacttcgat 3840
caaaacggtg agcaagtgaa agatgctatc attgtggatc cagatactaa cttgagt 3897

<210> 22
<211> 1299
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Dextransacarasa truncada

<400> 22

Thr Gln Gln Val Ser Gly Lys Tyr Val Glu Lys Asp Gly Ser Trp Tyr

1 5 10 15

Tyr Tyr Phe Asp Asp Gly Lys Asn Ala Lys Gly Leu Ser Thr Ile Asp
20 25 30

Asn Asn Ile Gln Tyr Phe Tyr Glu Ser Gly Lys Gln Ala Lys Gly Gln
35 40 45

Tyr Val Thr Ile Asp Asn Gln Thr Tyr Tyr Phe Asp Lys Gly Ser Gly
50 55 60

Asp Glu Leu Thr Gly Leu Gln Ser Ile Asp Gly Asn Ile Val Ala Phe
65 70 75 80

Asn Asp Glu Gly Gln Gln Ile Phe Asn Gln Tyr Tyr Gln Ser Glu Asn
85 90 95

Gly Thr Thr Tyr Tyr Phe Asp Asp Lys Gly His Ala Ala Thr Gly Ile
100 105 110

Lys Asn Ile Glu Gly Lys Asn Tyr Tyr Phe Asp Asn Leu Gly Gln Leu
115 120 125

Lys Lys Gly Phe Ser Gly Val Ile Asp Gly Gln Ile Met Thr Phe Asp
130 135 140

Gln Glu Thr Gly Gln Glu Val Ser Asn Thr Thr Ser Glu Ile Lys Glu
145 150 155 160

Gly Leu Thr Thr Gln Asn Thr Asp Tyr Ser Glu His Asn Ala Ala His
165 170 175

Gly Thr Asp Ala Glu Asp Phe Glu Asn Ile Asp Gly Tyr Leu Thr Ala
180 185 190

Ser Ser Trp Tyr Arg Pro Thr Gly Ile Leu Arg Asn Gly Thr Asp Trp
195 200 205

Glu Pro Ser Thr Asp Thr Asp Phe Arg Pro Ile Leu Ser Val Trp Trp
210 215 220

Pro Asp Lys Asn Thr Gln Val Asn Tyr Leu Asn Tyr Met Ala Asp Leu
225 230 235 240

Gly Phe Ile Ser Asn Ala Asp Ser Phe Glu Thr Gly Asp Ser Gln Ser
245 250 255

Leu Leu Asn Glu Ala Ser Asn Tyr Val Gln Lys Ser Ile Glu Met Lys
260 265 270

Ile Ser Ala Gln Gln Ser Thr Glu Trp Leu Lys Asp Ala Met Ala Ala

275 280 285

Phe Ile Val Ala Gln Pro Gln Trp Asn Glu Thr Ser Glu Asp Met Ser
290 295 300

Asn Asp His Leu Gln Asn Gly Ala Leu Thr Tyr Val Asn Ser Pro Leu
305 310 315 320

Thr Pro Asp Ala Asn Ser Asn Phe Arg Leu Leu Asn Arg Thr Pro Thr
325 330 335

Asn Gln Thr Gly Glu Gln Ala Tyr Asn Leu Asp Asn Ser Lys Gly Gly
340 345 350

Phe Glu Leu Leu Leu Ala Asn Asp Val Asp Asn Ser Asn Pro Val Val
355 360 365

Gln Ala Glu Gln Leu Asn Trp Leu Tyr Tyr Leu Met Asn Phe Gly Thr
370 375 380

Ile Thr Ala Asn Asp Ala Asp Ala Asn Phe Asp Gly Ile Arg Val Asp
385 390 395 400

Ala Val Asp Asn Val Asp Ala Asp Leu Leu Gln Ile Ala Ala Asp Tyr
405 410 415

Phe Lys Leu Ala Tyr Gly Val Asp Gln Asn Asp Ala Thr Ala Asn Gln
420 425 430

His Leu Ser Ile Leu Glu Asp Trp Ser His Asn Asp Pro Leu Tyr Val
435 440 445

Thr Asp Gln Gly Ser Asn Gln Leu Thr Met Asp Asp Tyr Val His Thr
450 455 460

Gln Leu Ile Trp Ser Leu Thr Lys Ser Ser Asp Ile Arg Gly Thr Met
465 470 475 480

Gln Arg Phe Val Asp Tyr Tyr Met Val Asp Arg Ser Asn Asp Ser Thr
485 490 495

Glu Asn Glu Ala Ile Pro Asn Tyr Ser Phe Val Arg Ala His Asp Ser
500 505 510

Glu Val Gln Thr Val Ile Ala Gln Ile Val Ser Asp Leu Tyr Pro Asp
515 520 525

Val Glu Asn Ser Leu Ala Pro Thr Thr Glu Gln Leu Ala Ala Ala Phe
530 535 540

Lys Val Tyr Asn Glu Asp Glu Lys Leu Ala Asp Lys Lys Tyr Thr Gln

545 550 555 560

Tyr Asn Met Ala Ser Ala Tyr Ala Met Leu Leu Thr Asn Lys Asp Thr
565 570 575

Val Pro Arg Val Tyr Tyr Gly Asp Leu Tyr Thr Asp Asp Gly Gln Tyr
580 585 590

Met Ala Thr Lys Ser Pro Tyr Tyr Asp Ala Ile Asn Thr Leu Leu Lys
595 600 605

Ala Arg Val Gln Tyr Val Ala Gly Gly Gln Ser Met Ser Val Asp Ser
610 615 620

Asn Asp Val Leu Thr Ser Val Arg Tyr Gly Lys Asp Ala Met Thr Ala
625 630 635 640

Ser Asp Thr Gly Thr Ser Glu Thr Arg Thr Glu Gly Ile Gly Val Ile
645 650 655

Val Ser Asn Asn Ala Glu Leu Gln Leu Glu Asp Gly His Thr Val Thr
660 665 670

Leu His Met Gly Ala Ala His Lys Asn Gln Ala Tyr Arg Ala Leu Leu
675 680 685

Ser Thr Thr Ala Asp Gly Leu Ala Tyr Tyr Asp Thr Asp Glu Asn Ala
690 695 700

Pro Val Ala Tyr Thr Asp Ala Asn Gly Asp Leu Ile Phe Thr Asn Glu
705 710 715 720

Ser Ile Tyr Gly Val Gln Asn Pro Gln Val Ser Gly Tyr Leu Ala Val
725 730 735

Trp Val Pro Val Gly Ala Gln Gln Asp Gln Asp Ala Arg Thr Ala Ser
740 745 750

Asp Thr Thr Thr Asn Thr Ser Asp Lys Val Phe His Ser Asn Ala Ala
755 760 765

Leu Asp Ser Gln Val Ile Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Phe Gln Ala Phe
770 775 780

Ala Thr Asp Ser Ser Glu Tyr Thr Asn Val Val Ile Ala Gln Asn Ala
785 790 795 800

Asp Gln Phe Lys Gln Trp Gly Val Thr Ser Phe Gln Leu Ala Pro Gln
805 810 815

Tyr Arg Ser Ser Thr Asp Thr Ser Phe Leu Asp Ser Ile Ile Gln Asn

820 825 830

Gly Tyr Ala Phe Thr Asp Arg Tyr Asp Leu Gly Tyr Gly Thr Pro Thr
835 840 845

Lys Tyr Gly Thr Ala Asp Gln Leu Arg Asp Ala Ile Lys Ala Leu His
850 855 860

Ala Ser Gly Ile Gln Ala Ile Ala Asp Trp Val Pro Asp Gln Ile Tyr
865 870 875 880

Asn Leu Pro Glu Gln Glu Leu Ala Thr Val Thr Arg Thr Asn Ser Phe
885 890 895

Gly Asp Asp Asp Thr Asp Ser Asp Ile Asp Asn Ala Leu Tyr Val Val
900 905 910

Gln Ser Arg Gly Gly Gly Gln Tyr Gln Glu Met Tyr Gly Gly Ala Phe
915 920 925

Leu Glu Glu Leu Gln Ala Leu Tyr Pro Ser Leu Phe Lys Val Asn Gln
930 935 940

Ile Ser Thr Gly Val Pro Ile Asp Gly Ser Val Lys Ile Thr Glu Trp
945 950 955 960

Ala Ala Lys Tyr Phe Asn Gly Ser Asn Ile Gln Gly Lys Gly Ala Gly
965 970 975

Tyr Val Leu Lys Asp Met Gly Ser Asn Lys Tyr Phe Lys Val Val Ser
980 985 990

Asn Thr Glu Asp Gly Asp Tyr Leu Pro Lys Gln Leu Thr Asn Asp Leu
995 1000 1005

Ser Glu Thr Gly Phe Thr His Asp Asp Lys Gly Ile Ile Tyr Tyr
1010 1015 1020

Thr Leu Ser Gly Tyr Arg Ala Gln Asn Ala Phe Ile Gln Asp Asp
1025 1030 1035

Asp Asn Asn Tyr Tyr Tyr Phe Asp Lys Thr Gly His Leu Val Thr
1040 1045 1050

Gly Leu Gln Lys Ile Asn Asn His Thr Tyr Phe Phe Leu Pro Asn
1055 1060 1065

Gly Ile Glu Leu Val Lys Ser Phe Leu Gln Asn Glu Asp Gly Thr
1070 1075 1080

Ile Val Tyr Phe Asp Lys Lys Gly His Gln Val Phe Asp Gln Tyr

1085 1090 1095

Ile Thr Asp Gln Asn Gly Asn Ala Tyr Tyr Phe Asp Asp Ala Gly
1100 1105 1110

Val Met Leu Lys Ser Gly Leu Ala Thr Ile Asp Gly His Gln Gln
1115 1120 1125

Tyr Phe Asp Gln Asn Gly Val Gln Val Lys Asp Lys Phe Val Ile
1130 1135 1140

Gly Thr Asp Gly Tyr Lys Tyr Tyr Phe Glu Pro Gly Ser Gly Asn
1145 1150 1155

Leu Ala Ile Leu Arg Tyr Val Gln Asn Ser Lys Asn Gln Trp Phe
1160 1165 1170

Tyr Phe Asp Gly Asn Gly His Ala Val Thr Gly Phe Gln Thr Ile
1175 1180 1185

Asn Gly Lys Lys Gln Tyr Phe Tyr Asn Asp Gly His Gln Ser Lys
1190 1195 1200

Gly Glu Phe Ile Asp Ala Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Thr Ser Ala
1205 1210 1215

Thr Asp Gly Arg Leu Val Thr Gly Val Gln Lys Ile Asn Gly Ile
1220 1225 1230

Thr Tyr Ala Phe Asp Asn Thr Gly Asn Leu Ile Thr Asn Gln Tyr
1235 1240 1245

Tyr Gln Leu Ala Asp Gly Lys Tyr Met Leu Leu Asp Asp Ser Gly
1250 1255 1260

Arg Ala Lys Thr Gly Phe Val Leu Gln Asp Gly Val Leu Arg Tyr
1265 1270 1275

Phe Asp Gln Asn Gly Glu Gln Val Lys Asp Ala Ile Ile Val Asp
1280 1285 1290

Pro Asp Thr Asn Leu Ser
1295

<210> 23
<211> 1211
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Dextransacarasa truncada

<400> 23

Thr Gln Gln Val Ser Gly Lys Tyr Val Glu Lys Asp Gly Ser Trp Tyr
1 5 10 15

Tyr Tyr Phe Asp Asp Gly Lys Asn Ala Lys Gly Leu Ser Thr Ile Asp
20 25 30

Asn Asn Ile Gln Tyr Phe Tyr Glu Ser Gly Lys Gln Ala Lys Gly Gln
35 40 45

Tyr Val Thr Ile Asp Asn Gln Thr Tyr Tyr Phe Asp Lys Gly Ser Gly
50 55 60

Asp Glu Leu Thr Gly Leu Gln Ser Ile Asp Gly Asn Ile Val Ala Phe
65 70 75 80

Asn Asp Glu Gly Gln Gln Ile Phe Asn Gln Tyr Tyr Gln Ser Glu Asn
85 90 95

Gly Thr Thr Tyr Tyr Phe Asp Asp Lys Gly His Ala Ala Thr Gly Ile
100 105 110

Lys Asn Ile Glu Gly Lys Asn Tyr Tyr Phe Asp Asn Leu Gly Gln Leu
115 120 125

Lys Lys Gly Phe Ser Gly Val Ile Asp Gly Gln Ile Met Thr Phe Asp
130 135 140

Gln Glu Thr Gly Gln Glu Val Ser Asn Thr Thr Ser Glu Ile Lys Glu
145 150 155 160

Gly Leu Thr Thr Gln Asn Thr Asp Tyr Ser Glu His Asn Ala Ala His
165 170 175

Gly Thr Asp Ala Glu Asp Phe Glu Asn Ile Asp Gly Tyr Leu Thr Ala
180 185 190

Ser Ser Trp Tyr Arg Pro Thr Gly Ile Leu Arg Asn Gly Thr Asp Trp
195 200 205

Glu Pro Ser Thr Asp Thr Asp Phe Arg Pro Ile Leu Ser Val Trp Trp
210 215 220

Pro Asp Lys Asn Thr Gln Val Asn Tyr Leu Asn Tyr Met Ala Asp Leu
225 230 235 240

Gly Phe Ile Ser Asn Ala Asp Ser Phe Glu Thr Gly Asp Ser Gln Ser
245 250 255

Leu Leu Asn Glu Ala Ser Asn Tyr Val Gln Lys Ser Ile Glu Met Lys
260 265 270

Ile Ser Ala Gln Gln Ser Thr Glu Trp Leu Lys Asp Ala Met Ala Ala
275 280 285

Phe Ile Val Ala Gln Pro Gln Trp Asn Glu Thr Ser Glu Asp Met Ser
290 295 300

Asn Asp His Leu Gln Asn Gly Ala Leu Thr Tyr Val Asn Ser Pro Leu
305 310 315 320

Thr Pro Asp Ala Asn Ser Asn Phe Arg Leu Leu Asn Arg Thr Pro Thr
325 330 335

Asn Gln Thr Gly Glu Gln Ala Tyr Asn Leu Asp Asn Ser Lys Gly Gly
340 345 350

Phe Glu Leu Leu Leu Ala Asn Asp Val Asp Asn Ser Asn Pro Val Val
355 360 365

Gln Ala Glu Gln Leu Asn Trp Leu Tyr Tyr Leu Met Asn Phe Gly Thr
370 375 380

Ile Thr Ala Asn Asp Ala Asp Ala Asn Phe Asp Gly Ile Arg Val Asp
385 390 395 400

Ala Val Asp Asn Val Asp Ala Asp Leu Leu Gln Ile Ala Ala Asp Tyr
405 410 415

Phe Lys Leu Ala Tyr Gly Val Asp Gln Asn Asp Ala Thr Ala Asn Gln
420 425 430

His Leu Ser Ile Leu Glu Asp Trp Ser His Asn Asp Pro Leu Tyr Val
435 440 445

Thr Asp Gln Gly Ser Asn Gln Leu Thr Met Asp Asp Tyr Val His Thr
450 455 460

Gln Leu Ile Trp Ser Leu Thr Lys Ser Ser Asp Ile Arg Gly Thr Met
465 470 475 480

Gln Arg Phe Val Asp Tyr Tyr Met Val Asp Arg Ser Asn Asp Ser Thr
485 490 495

Glu Asn Glu Ala Ile Pro Asn Tyr Ser Phe Val Arg Ala His Asp Ser
500 505 510

Glu Val Gln Thr Val Ile Ala Gln Ile Val Ser Asp Leu Tyr Pro Asp
515 520 525

Val Glu Asn Ser Leu Ala Pro Thr Thr Glu Gln Leu Ala Ala Ala Phe
530 535 540

Lys Val Tyr Asn Glu Asp Glu Lys Leu Ala Asp Lys Lys Tyr Thr Gln
545 550 555 560

Tyr Asn Met Ala Ser Ala Tyr Ala Met Leu Leu Thr Asn Lys Asp Thr
565 570 575

Val Pro Arg Val Tyr Tyr Gly Asp Leu Tyr Thr Asp Asp Gly Gln Tyr
580 585 590

Met Ala Thr Lys Ser Pro Tyr Tyr Asp Ala Ile Asn Thr Leu Leu Lys
595 600 605

Ala Arg Val Gln Tyr Val Ala Gly Gly Gln Ser Met Ser Val Asp Ser
610 615 620

Asn Asp Val Leu Thr Ser Val Arg Tyr Gly Lys Asp Ala Met Thr Ala
625 630 635 640

Ser Asp Thr Gly Thr Ser Glu Thr Arg Thr Glu Gly Ile Gly Val Ile
645 650 655

Val Ser Asn Asn Ala Glu Leu Gln Leu Glu Asp Gly His Thr Val Thr
660 665 670

Leu His Met Gly Ala Ala His Lys Asn Gln Ala Tyr Arg Ala Leu Leu
675 680 685

Ser Thr Thr Ala Asp Gly Leu Ala Tyr Tyr Asp Thr Asp Glu Asn Ala
690 695 700

Pro Val Ala Tyr Thr Asp Ala Asn Gly Asp Leu Ile Phe Thr Asn Glu
705 710 715 720

Ser Ile Tyr Gly Val Gln Asn Pro Gln Val Ser Gly Tyr Leu Ala Val
725 730 735

Trp Val Pro Val Gly Ala Gln Gln Asp Gln Asp Ala Arg Thr Ala Ser
740 745 750

Asp Thr Thr Thr Asn Thr Ser Asp Lys Val Phe His Ser Asn Ala Ala
755 760 765

Leu Asp Ser Gln Val Ile Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Phe Gln Ala Phe
770 775 780

Ala Thr Asp Ser Ser Glu Tyr Thr Asn Val Val Ile Ala Gln Asn Ala
785 790 795 800

Asp Gln Phe Lys Gln Trp Gly Val Thr Ser Phe Gln Leu Ala Pro Gln
805 810 815

Tyr Arg Ser Ser Thr Asp Thr Ser Phe Leu Asp Ser Ile Ile Gln Asn
820 825 830

Gly Tyr Ala Phe Thr Asp Arg Tyr Asp Leu Gly Tyr Gly Thr Pro Thr
835 840 845

Lys Tyr Gly Thr Ala Asp Gln Leu Arg Asp Ala Ile Lys Ala Leu His
850 855 860

Ala Ser Gly Ile Gln Ala Ile Ala Asp Trp Val Pro Asp Gln Ile Tyr
865 870 875 880

Asn Leu Pro Glu Gln Glu Leu Ala Thr Val Thr Arg Thr Asn Ser Phe
885 890 895

Gly Asp Asp Asp Thr Asp Ser Asp Ile Asp Asn Ala Leu Tyr Val Val
900 905 910

Gln Ser Arg Gly Gly Gly Gln Tyr Gln Glu Met Tyr Gly Gly Ala Phe
915 920 925

Leu Glu Glu Leu Gln Ala Leu Tyr Pro Ser Leu Phe Lys Val Asn Gln
930 935 940

Ile Ser Thr Gly Val Pro Ile Asp Gly Ser Val Lys Ile Thr Glu Trp
945 950 955 960

Ala Ala Lys Tyr Phe Asn Gly Ser Asn Ile Gln Gly Lys Gly Ala Gly
965 970 975

Tyr Val Leu Lys Asp Met Gly Ser Asn Lys Tyr Phe Lys Val Val Ser
980 985 990

Asn Thr Glu Asp Gly Asp Tyr Leu Pro Lys Gln Leu Thr Asn Asp Leu
995 1000 1005

Ser Glu Thr Gly Phe Thr His Asp Asp Lys Gly Ile Ile Tyr Tyr
1010 1015 1020

Thr Leu Ser Gly Tyr Arg Ala Gln Asn Ala Phe Ile Gln Asp Asp
1025 1030 1035

Asp Asn Asn Tyr Tyr Tyr Phe Asp Lys Thr Gly His Leu Val Thr
1040 1045 1050

Gly Leu Gln Lys Ile Asn Asn His Thr Tyr Phe Phe Leu Pro Asn
1055 1060 1065

Gly Ile Glu Leu Val Lys Ser Phe Leu Gln Asn Glu Asp Gly Thr
1070 1075 1080

Ile Val Tyr Phe Asp Lys Lys Gly His Gln Val Phe Asp Gln Tyr
1085 1090 1095

Ile Thr Asp Gln Asn Gly Asn Ala Tyr Tyr Phe Asp Asp Ala Gly
1100 1105 1110

Val Met Leu Lys Ser Gly Leu Ala Thr Ile Asp Gly His Gln Gln
1115 1120 1125

Tyr Phe Asp Gln Asn Gly Val Gln Val Lys Asp Lys Phe Val Ile
1130 1135 1140

Gly Thr Asp Gly Tyr Lys Tyr Tyr Phe Glu Pro Gly Ser Gly Asn
1145 1150 1155

Leu Ala Ile Leu Arg Tyr Val Gln Asn Ser Lys Asn Gln Trp Phe
1160 1165 1170

Tyr Phe Asp Gly Asn Gly His Ala Val Thr Gly Phe Gln Thr Ile
1175 1180 1185

Asn Gly Lys Lys Gln Tyr Phe Tyr Asn Asp Gly His Gln Ser Lys
1190 1195 1200

Gly Glu Phe Ile Asp Ala Asp Gly
1205 1210

<210> 24
<211> 1012
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Dextransacarasa truncada

<400> 24

Thr Gln Gln Val Ser Gly Lys Tyr Val Glu Lys Asp Gly Ser Trp Tyr
1 5 10 15

Tyr Tyr Phe Asp Asp Gly Lys Asn Ala Lys Gly Leu Ser Thr Ile Asp
20 25 30

Asn Asn Ile Gln Tyr Phe Tyr Glu Ser Gly Lys Gln Ala Lys Gly Gln
35 40 45

Tyr Val Thr Ile Asp Asn Gln Thr Tyr Tyr Phe Asp Lys Gly Ser Gly
50 55 60

Asp Glu Leu Thr Gly Leu Gln Ser Ile Asp Gly Asn Ile Val Ala Phe
65 70 75 80

Asn Asp Glu Gly Gln Gln Ile Phe Asn Gln Tyr Tyr Gln Ser Glu Asn

85 90 95

Gly Thr Thr Tyr Tyr Phe Asp Asp Lys Gly His Ala Ala Thr Gly Ile
100 105 110

Lys Asn Ile Glu Gly Lys Asn Tyr Tyr Phe Asp Asn Leu Gly Gln Leu
115 120 125

Lys Lys Gly Phe Ser Gly Val Ile Asp Gly Gln Ile Met Thr Phe Asp
130 135 140

Gln Glu Thr Gly Gln Glu Val Ser Asn Thr Thr Ser Glu Ile Lys Glu
145 150 155 160

Gly Leu Thr Thr Gln Asn Thr Asp Tyr Ser Glu His Asn Ala Ala His
165 170 175

Gly Thr Asp Ala Glu Asp Phe Glu Asn Ile Asp Gly Tyr Leu Thr Ala
180 185 190

Ser Ser Trp Tyr Arg Pro Thr Gly Ile Leu Arg Asn Gly Thr Asp Trp
195 200 205

Glu Pro Ser Thr Asp Thr Asp Phe Arg Pro Ile Leu Ser Val Trp Trp
210 215 220

Pro Asp Lys Asn Thr Gln Val Asn Tyr Leu Asn Tyr Met Ala Asp Leu
225 230 235 240

Gly Phe Ile Ser Asn Ala Asp Ser Phe Glu Thr Gly Asp Ser Gln Ser
245 250 255

Leu Leu Asn Glu Ala Ser Asn Tyr Val Gln Lys Ser Ile Glu Met Lys
260 265 270

Ile Ser Ala Gln Gln Ser Thr Glu Trp Leu Lys Asp Ala Met Ala Ala
275 280 285

Phe Ile Val Ala Gln Pro Gln Trp Asn Glu Thr Ser Glu Asp Met Ser
290 295 300

Asn Asp His Leu Gln Asn Gly Ala Leu Thr Tyr Val Asn Ser Pro Leu
305 310 315 320

Thr Pro Asp Ala Asn Ser Asn Phe Arg Leu Leu Asn Arg Thr Pro Thr
325 330 335

Asn Gln Thr Gly Glu Gln Ala Tyr Asn Leu Asp Asn Ser Lys Gly Gly
340 345 350

Phe Glu Leu Leu Leu Ala Asn Asp Val Asp Asn Ser Asn Pro Val Val

355 360 365

Gln Ala Glu Gln Leu Asn Trp Leu Tyr Tyr Leu Met Asn Phe Gly Thr
370 375 380

Ile Thr Ala Asn Asp Ala Asp Ala Asn Phe Asp Gly Ile Arg Val Asp
385 390 395 400

Ala Val Asp Asn Val Asp Ala Asp Leu Leu Gln Ile Ala Ala Asp Tyr
405 410 415

Phe Lys Leu Ala Tyr Gly Val Asp Gln Asn Asp Ala Thr Ala Asn Gln
420 425 430

His Leu Ser Ile Leu Glu Asp Trp Ser His Asn Asp Pro Leu Tyr Val
435 440 445

Thr Asp Gln Gly Ser Asn Gln Leu Thr Met Asp Asp Tyr Val His Thr
450 455 460

Gln Leu Ile Trp Ser Leu Thr Lys Ser Ser Asp Ile Arg Gly Thr Met
465 470 475 480

Gln Arg Phe Val Asp Tyr Tyr Met Val Asp Arg Ser Asn Asp Ser Thr
485 490 495

Glu Asn Glu Ala Ile Pro Asn Tyr Ser Phe Val Arg Ala His Asp Ser
500 505 510

Glu Val Gln Thr Val Ile Ala Gln Ile Val Ser Asp Leu Tyr Pro Asp
515 520 525

Val Glu Asn Ser Leu Ala Pro Thr Thr Glu Gln Leu Ala Ala Ala Phe
530 535 540

Lys Val Tyr Asn Glu Asp Glu Lys Leu Ala Asp Lys Lys Tyr Thr Gln
545 550 555 560

Tyr Asn Met Ala Ser Ala Tyr Ala Met Leu Leu Thr Asn Lys Asp Thr
565 570 575

Val Pro Arg Val Tyr Tyr Gly Asp Leu Tyr Thr Asp Asp Gly Gln Tyr
580 585 590

Met Ala Thr Lys Ser Pro Tyr Tyr Asp Ala Ile Asn Thr Leu Leu Lys
595 600 605

Ala Arg Val Gln Tyr Val Ala Gly Gly Gln Ser Met Ser Val Asp Ser
610 615 620

Asn Asp Val Leu Thr Ser Val Arg Tyr Gly Lys Asp Ala Met Thr Ala

625 630 635 640

Ser Asp Thr Gly Thr Ser Glu Thr Arg Thr Glu Gly Ile Gly Val Ile
645 650 655

Val Ser Asn Asn Ala Glu Leu Gln Leu Glu Asp Gly His Thr Val Thr
660 665 670

Leu His Met Gly Ala Ala His Lys Asn Gln Ala Tyr Arg Ala Leu Leu
675 680 685

Ser Thr Thr Ala Asp Gly Leu Ala Tyr Tyr Asp Thr Asp Glu Asn Ala
690 695 700

Pro Val Ala Tyr Thr Asp Ala Asn Gly Asp Leu Ile Phe Thr Asn Glu
705 710 715 720

Ser Ile Tyr Gly Val Gln Asn Pro Gln Val Ser Gly Tyr Leu Ala Val
725 730 735

Trp Val Pro Val Gly Ala Gln Gln Asp Gln Asp Ala Arg Thr Ala Ser
740 745 750

Asp Thr Thr Thr Asn Thr Ser Asp Lys Val Phe His Ser Asn Ala Ala
755 760 765

Leu Asp Ser Gln Val Ile Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Phe Gln Ala Phe
770 775 780

Ala Thr Asp Ser Ser Glu Tyr Thr Asn Val Val Ile Ala Gln Asn Ala
785 790 795 800

Asp Gln Phe Lys Gln Trp Gly Val Thr Ser Phe Gln Leu Ala Pro Gln
805 810 815

Tyr Arg Ser Ser Thr Asp Thr Ser Phe Leu Asp Ser Ile Ile Gln Asn
820 825 830

Gly Tyr Ala Phe Thr Asp Arg Tyr Asp Leu Gly Tyr Gly Thr Pro Thr
835 840 845

Lys Tyr Gly Thr Ala Asp Gln Leu Arg Asp Ala Ile Lys Ala Leu His
850 855 860

Ala Ser Gly Ile Gln Ala Ile Ala Asp Trp Val Pro Asp Gln Ile Tyr
865 870 875 880

Asn Leu Pro Glu Gln Glu Leu Ala Thr Val Thr Arg Thr Asn Ser Phe
885 890 895

Gly Asp Asp Asp Thr Asp Ser Asp Ile Asp Asn Ala Leu Tyr Val Val

900 905 910

Gln Ser Arg Gly Gly Gly Gln Tyr Gln Glu Met Tyr Gly Gly Ala Phe
915 920 925

Leu Glu Glu Leu Gln Ala Leu Tyr Pro Ser Leu Phe Lys Val Asn Gln
930 935 940

Ile Ser Thr Gly Val Pro Ile Asp Gly Ser Val Lys Ile Thr Glu Trp
945 950 955 960

Ala Ala Lys Tyr Phe Asn Gly Ser Asn Ile Gln Gly Lys Gly Ala Gly
965 970 975

Tyr Val Leu Lys Asp Met Gly Ser Asn Lys Tyr Phe Lys Val Val Ser
980 985 990

Asn Thr Glu Asp Gly Asp Tyr Leu Pro Lys Gln Leu Thr Asn Asp Leu
995 1000 1005

Ser Glu Thr Gly
1010

<210> 25
<211> 882
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Dextransacarasa truncada

<400> 25

Gly Phe Ser Gly Val Ile Asp Gly Gln Ile Met Thr Phe Asp Gln Glu
1 5 10 15

Thr Gly Gln Glu Val Ser Asn Thr Thr Ser Glu Ile Lys Glu Gly Leu
20 25 30

Thr Thr Gln Asn Thr Asp Tyr Ser Glu His Asn Ala Ala His Gly Thr
35 40 45

Asp Ala Glu Asp Phe Glu Asn Ile Asp Gly Tyr Leu Thr Ala Ser Ser
50 55 60

Trp Tyr Arg Pro Thr Gly Ile Leu Arg Asn Gly Thr Asp Trp Glu Pro
65 70 75 80

Ser Thr Asp Thr Asp Phe Arg Pro Ile Leu Ser Val Trp Trp Pro Asp
85 90 95

Lys Asn Thr Gln Val Asn Tyr Leu Asn Tyr Met Ala Asp Leu Gly Phe
100 105 110

Ile Ser Asn Ala Asp Ser Phe Glu Thr Gly Asp Ser Gln Ser Leu Leu
115 120 125

Asn Glu Ala Ser Asn Tyr Val Gln Lys Ser Ile Glu Met Lys Ile Ser
130 135 140

Ala Gln Gln Ser Thr Glu Trp Leu Lys Asp Ala Met Ala Ala Phe Ile
145 150 155 160

Val Ala Gln Pro Gln Trp Asn Glu Thr Ser Glu Asp Met Ser Asn Asp
165 170 175

His Leu Gln Asn Gly Ala Leu Thr Tyr Val Asn Ser Pro Leu Thr Pro
180 185 190

Asp Ala Asn Ser Asn Phe Arg Leu Leu Asn Arg Thr Pro Thr Asn Gln
195 200 205

Thr Gly Glu Gln Ala Tyr Asn Leu Asp Asn Ser Lys Gly Gly Phe Glu
210 215 220

Leu Leu Leu Ala Asn Asp Val Asp Asn Ser Asn Pro Val Val Gln Ala
225 230 235 240

Glu Gln Leu Asn Trp Leu Tyr Tyr Leu Met Asn Phe Gly Thr Ile Thr
245 250 255

Ala Asn Asp Ala Asp Ala Asn Phe Asp Gly Ile Arg Val Asp Ala Val
260 265 270

Asp Asn Val Asp Ala Asp Leu Leu Gln Ile Ala Ala Asp Tyr Phe Lys
275 280 285

Leu Ala Tyr Gly Val Asp Gln Asn Asp Ala Thr Ala Asn Gln His Leu
290 295 300

Ser Ile Leu Glu Asp Trp Ser His Asn Asp Pro Leu Tyr Val Thr Asp
305 310 315 320

Gln Gly Ser Asn Gln Leu Thr Met Asp Asp Tyr Val His Thr Gln Leu
325 330 335

Ile Trp Ser Leu Thr Lys Ser Ser Asp Ile Arg Gly Thr Met Gln Arg
340 345 350

Phe Val Asp Tyr Tyr Met Val Asp Arg Ser Asn Asp Ser Thr Glu Asn
355 360 365

Glu Ala Ile Pro Asn Tyr Ser Phe Val Arg Ala His Asp Ser Glu Val
370 375 380

Gln Thr Val Ile Ala Gln Ile Val Ser Asp Leu Tyr Pro Asp Val Glu
385 390 395 400

Asn Ser Leu Ala Pro Thr Thr Glu Gln Leu Ala Ala Ala Phe Lys Val
405 410 415

Tyr Asn Glu Asp Glu Lys Leu Ala Asp Lys Lys Tyr Thr Gln Tyr Asn
420 425 430

Met Ala Ser Ala Tyr Ala Met Leu Leu Thr Asn Lys Asp Thr Val Pro
435 440 445

Arg Val Tyr Tyr Gly Asp Leu Tyr Thr Asp Asp Gly Gln Tyr Met Ala
450 455 460

Thr Lys Ser Pro Tyr Tyr Asp Ala Ile Asn Thr Leu Leu Lys Ala Arg
465 470 475 480

Val Gln Tyr Val Ala Gly Gly Gln Ser Met Ser Val Asp Ser Asn Asp
485 490 495

Val Leu Thr Ser Val Arg Tyr Gly Lys Asp Ala Met Thr Ala Ser Asp
500 505 510

Thr Gly Thr Ser Glu Thr Arg Thr Glu Gly Ile Gly Val Ile Val Ser
515 520 525

Asn Asn Ala Glu Leu Gln Leu Glu Asp Gly His Thr Val Thr Leu His
530 535 540

Met Gly Ala Ala His Lys Asn Gln Ala Tyr Arg Ala Leu Leu Ser Thr
545 550 555 560

Thr Ala Asp Gly Leu Ala Tyr Tyr Asp Thr Asp Glu Asn Ala Pro Val
565 570 575

Ala Tyr Thr Asp Ala Asn Gly Asp Leu Ile Phe Thr Asn Glu Ser Ile
580 585 590

Tyr Gly Val Gln Asn Pro Gln Val Ser Gly Tyr Leu Ala Val Trp Val
595 600 605

Pro Val Gly Ala Gln Gln Asp Gln Asp Ala Arg Thr Ala Ser Asp Thr
610 615 620

Thr Thr Asn Thr Ser Asp Lys Val Phe His Ser Asn Ala Ala Leu Asp
625 630 635 640

Ser Gln Val Ile Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Phe Gln Ala Phe Ala Thr
645 650 655

Asp Ser Ser Glu Tyr Thr Asn Val Val Ile Ala Gln Asn Ala Asp Gln
660 665 670

Phe Lys Gln Trp Gly Val Thr Ser Phe Gln Leu Ala Pro Gln Tyr Arg
675 680 685

Ser Ser Thr Asp Thr Ser Phe Leu Asp Ser Ile Ile Gln Asn Gly Tyr
690 695 700

Ala Phe Thr Asp Arg Tyr Asp Leu Gly Tyr Gly Thr Pro Thr Lys Tyr
705 710 715 720

Gly Thr Ala Asp Gln Leu Arg Asp Ala Ile Lys Ala Leu His Ala Ser
725 730 735

Gly Ile Gln Ala Ile Ala Asp Trp Val Pro Asp Gln Ile Tyr Asn Leu
740 745 750

Pro Glu Gln Glu Leu Ala Thr Val Thr Arg Thr Asn Ser Phe Gly Asp
755 760 765

Asp Asp Thr Asp Ser Asp Ile Asp Asn Ala Leu Tyr Val Val Gln Ser
770 775 780

Arg Gly Gly Gly Gln Tyr Gln Glu Met Tyr Gly Gly Ala Phe Leu Glu
785 790 795 800

Glu Leu Gln Ala Leu Tyr Pro Ser Leu Phe Lys Val Asn Gln Ile Ser
805 810 815

Thr Gly Val Pro Ile Asp Gly Ser Val Lys Ile Thr Glu Trp Ala Ala
820 825 830

Lys Tyr Phe Asn Gly Ser Asn Ile Gln Gly Lys Gly Ala Gly Tyr Val
835 840 845

Leu Lys Asp Met Gly Ser Asn Lys Tyr Phe Lys Val Val Ser Asn Thr
850 855 860

Glu Asp Gly Asp Tyr Leu Pro Lys Gln Leu Thr Asn Asp Leu Ser Glu
865 870 875 880

Thr Gly

<210> 26
<211> 1299
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Mutado / truncado

<400> 26

Thr Gln Gln Val Ser Gly Lys Tyr Val Glu Lys Asp Gly Ser Trp Tyr
1 5 10 15

Tyr Tyr Phe Asp Asp Gly Lys Asn Ala Lys Gly Leu Ser Thr Ile Asp
20 25 30

Asn Asn Ile Gln Tyr Phe Tyr Glu Ser Gly Lys Gln Ala Lys Gly Gln
35 40 45

Tyr Val Thr Ile Asp Asn Gln Thr Tyr Tyr Phe Asp Lys Gly Ser Gly
50 55 60

Asp Glu Leu Thr Gly Leu Gln Ser Ile Asp Gly Asn Ile Val Ala Phe
65 70 75 80

Asn Asp Glu Gly Gln Gln Ile Phe Asn Gln Tyr Tyr Gln Ser Glu Asn
85 90 95

Gly Thr Thr Tyr Tyr Phe Asp Asp Lys Gly His Ala Ala Thr Gly Ile
100 105 110

Lys Asn Ile Glu Gly Lys Asn Tyr Tyr Phe Asp Asn Leu Gly Gln Leu
115 120 125

Lys Lys Gly Phe Ser Gly Val Ile Asp Gly Gln Ile Met Thr Phe Asp
130 135 140

Gln Glu Thr Gly Gln Glu Val Ser Asn Thr Thr Ser Glu Ile Lys Glu
145 150 155 160

Gly Leu Thr Thr Gln Asn Thr Asp Tyr Ser Glu His Asn Ala Ala His
165 170 175

Gly Thr Asp Ala Glu Asp Phe Glu Asn Ile Asp Gly Tyr Leu Thr Ala
180 185 190

Ser Ser Trp Tyr Arg Pro Thr Gly Ile Leu Arg Asn Gly Thr Asp Trp
195 200 205

Glu Pro Ser Thr Asp Thr Asp Phe Arg Pro Ile Leu Ser Val Trp Trp
210 215 220

Pro Asp Lys Asn Thr Gln Val Asn Tyr Leu Asn Tyr Met Ala Asp Leu
225 230 235 240

Gly Phe Ile Ser Asn Ala Asp Ser Phe Glu Thr Gly Asp Ser Gln Ser
245 250 255

Leu Leu Asn Glu Ala Ser Asn Tyr Val Gln Lys Ser Ile Glu Met Lys

260 265 270

Ile Ser Ala Gln Gln Ser Thr Glu Trp Leu Lys Asp Ala Met Ala Ala
275 280 285

Phe Ile Val Ala Gln Pro Gln Trp Asn Glu Thr Ser Glu Asp Met Ser
290 295 300

Asn Asp His Leu Gln Asn Gly Ala Leu Thr Tyr Val Asn Ser Pro Leu
305 310 315 320

Thr Pro Asp Ala Asn Ser Asn Phe Arg Leu Leu Asn Arg Thr Pro Thr
325 330 335

Asn Gln Thr Gly Glu Gln Ala Tyr Asn Leu Asp Asn Ser Lys Gly Gly
340 345 350

Phe Glu Leu Leu Leu Ala Asn Asp Val Asp Asn Ser Asn Pro Val Val
355 360 365

Gln Ala Glu Gln Leu Asn Trp Leu Tyr Tyr Leu Met Asn Phe Gly Thr
370 375 380

Ile Thr Ala Asn Asp Ala Asp Ala Asn Phe Asp Gly Ile Arg Val Asp
385 390 395 400

Ala Val Asp Asn Val Asp Ala Asp Leu Leu Gln Ile Ala Ala Asp Tyr
405 410 415

Phe Lys Leu Ala Tyr Gly Val Asp Gln Asn Asp Ala Thr Ala Asn Gln
420 425 430

His Leu Ser Ile Leu Glu Asp Trp Ser His Asn Asp Pro Leu Tyr Val
435 440 445

Thr Asp Gln Gly Ser Asn Gln Leu Thr Met Asp Asp Tyr Val His Thr
450 455 460

Gln Leu Ile Trp Ser Leu Thr Lys Ser Ser Asp Ile Arg Gly Thr Met
465 470 475 480

Gln Arg Phe Val Asp Tyr Tyr Met Val Asp Arg Ser Asn Asp Ser Thr
485 490 495

Glu Asn Glu Ala Ile Pro Asn Tyr Ser Phe Val Arg Ala His Asp Tyr
500 505 510

Asp Ala Gln Thr Val Ile Ala Gln Ile Val Ser Asp Leu Tyr Pro Asp
515 520 525

Val Glu Asn Ser Leu Ala Pro Thr Thr Glu Gln Leu Ala Ala Ala Phe

530 535 540

Lys Val Tyr Asn Glu Asp Glu Lys Leu Ala Asp Lys Lys Tyr Thr Gln
545 550 555 560

Tyr Asn Met Ala Ser Ala Tyr Ala Met Leu Leu Thr Asn Lys Asp Thr
565 570 575

Val Pro Arg Val Tyr Tyr Gly Asp Leu Tyr Thr Asp Asp Gly Gln Tyr
580 585 590

Met Ala Thr Lys Ser Pro Tyr Tyr Asp Ala Ile Asn Thr Leu Leu Lys
595 600 605

Ala Arg Val Gln Tyr Val Ala Gly Gly Gln Ser Met Ser Val Asp Ser
610 615 620

Asn Asp Val Leu Thr Ser Val Arg Tyr Gly Lys Asp Ala Met Thr Ala
625 630 635 640

Ser Asp Thr Gly Thr Ser Glu Thr Arg Thr Glu Gly Ile Gly Val Ile
645 650 655

Val Ser Asn Asn Ala Glu Leu Gln Leu Glu Asp Gly His Thr Val Thr
660 665 670

Leu His Met Gly Ala Ala His Lys Asn Gln Ala Tyr Arg Ala Leu Leu
675 680 685

Ser Thr Thr Ala Asp Gly Leu Ala Tyr Tyr Asp Thr Asp Glu Asn Ala
690 695 700

Pro Val Ala Tyr Thr Asp Ala Asn Gly Asp Leu Ile Phe Thr Asn Glu
705 710 715 720

Ser Ile Tyr Gly Val Gln Asn Pro Gln Val Ser Gly Tyr Leu Ala Val
725 730 735

Trp Val Pro Val Gly Ala Gln Gln Asp Gln Asp Ala Arg Thr Ala Ser
740 745 750

Asp Thr Thr Thr Asn Thr Ser Asp Lys Val Phe His Ser Asn Ala Ala
755 760 765

Leu Asp Ser Gln Val Ile Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Phe Gln Ala Phe
770 775 780

Ala Thr Asp Ser Ser Glu Tyr Thr Asn Val Val Ile Ala Gln Asn Ala
785 790 795 800

Asp Gln Phe Lys Gln Trp Gly Val Thr Ser Phe Gln Leu Ala Pro Gln

805 810 815

Tyr Arg Ser Ser Thr Asp Thr Ser Phe Leu Asp Ser Ile Ile Gln Asn
820 825 830

Gly Tyr Ala Phe Thr Asp Arg Tyr Asp Leu Gly Tyr Gly Thr Pro Thr
835 840 845

Lys Tyr Gly Thr Ala Asp Gln Leu Arg Asp Ala Ile Lys Ala Leu His
850 855 860

Ala Ser Gly Ile Gln Ala Ile Ala Asp Trp Val Pro Asp Gln Ile Tyr
865 870 875 880

Asn Leu Pro Glu Gln Glu Leu Ala Thr Val Thr Arg Thr Asn Ser Phe
885 890 895

Gly Asp Asp Asp Thr Asp Ser Asp Ile Asp Asn Ala Leu Tyr Val Val
900 905 910

Gln Ser Arg Gly Gly Gly Gln Tyr Gln Glu Met Tyr Gly Gly Ala Phe
915 920 925

Leu Glu Glu Leu Gln Ala Leu Tyr Pro Ser Leu Phe Lys Val Asn Gln
930 935 940

Ile Ser Thr Gly Val Pro Ile Asp Gly Ser Val Lys Ile Thr Glu Trp
945 950 955 960

Ala Ala Lys Tyr Phe Asn Gly Ser Asn Ile Gln Gly Lys Gly Ala Gly
965 970 975

Tyr Val Leu Lys Asp Met Gly Ser Asn Lys Tyr Phe Lys Val Val Ser
980 985 990

Asn Thr Glu Asp Gly Asp Tyr Leu Pro Lys Gln Leu Thr Asn Asp Le
995 1000 1005

Ser Glu Thr Gly Phe Thr His Asp Asp Lys Gly Ile Ile Tyr Tyr
1010 1015 1020

Thr Leu Ser Gly Tyr Arg Ala Gln Asn Ala Phe Ile Gln Asp Asp
1025 1030 1035

Asp Asn Asn Tyr Tyr Tyr Phe Asp Lys Thr Gly His Leu Val Thr
1040 1045 1050

Gly Leu Gln Lys Ile Asn Asn His Thr Tyr Phe Phe Leu Pro Asn
1055 1060 1065

Gly Ile Glu Leu Val Lys Ser Phe Leu Gln Asn Glu Asp Gly Thr

1070 1075 1080

Ile Val Tyr Phe Asp Lys Lys Gly His Gln Val Phe Asp Gln Tyr
1085 1090 1095

Ile Thr Asp Gln Asn Gly Asn Ala Tyr Tyr Phe Asp Asp Ala Gly
1100 1105 1110

Val Met Leu Lys Ser Gly Leu Ala Thr Ile Asp Gly His Gln Gln
1115 1120 1125

Tyr Phe Asp Gln Asn Gly Val Gln Val Lys Asp Lys Phe Val Ile
1130 1135 1140

Gly Thr Asp Gly Tyr Lys Tyr Tyr Phe Glu Pro Gly Ser Gly Asn
1145 1150 1155

Leu Ala Ile Leu Arg Tyr Val Gln Asn Ser Lys Asn Gln Trp Phe
1160 1165 1170

Tyr Phe Asp Gly Asn Gly His Ala Val Thr Gly Phe Gln Thr Ile
1175 1180 1185

Asn Gly Lys Lys Gln Tyr Phe Tyr Asn Asp Gly His Gln Ser Lys
1190 1195 1200

Gly Glu Phe Ile Asp Ala Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Thr Ser Ala
1205 1210 1215

Thr Asp Gly Arg Leu Val Thr Gly Val Gln Lys Ile Asn Gly Ile
1220 1225 1230

Thr Tyr Ala Phe Asp Asn Thr Gly Asn Leu Ile Thr Asn Gln Tyr
1235 1240 1245

Tyr Gln Leu Ala Asp Gly Lys Tyr Met Leu Leu Asp Asp Ser Gly
1250 1255 1260

Arg Ala Lys Thr Gly Phe Val Leu Gln Asp Gly Val Leu Arg Tyr
1265 1270 1275

Phe Asp Gln Asn Gly Glu Gln Val Lys Asp Ala Ile Ile Val Asp
1280 1285 1290

Pro Asp Thr Asn Leu Ser
1295

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de nucleótidos que consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada del fragmento de la posición 373 a la posición 4269 de SEQ ID Nº: 1 y como se definió en SEQ ID Nº: 17 o una secuencia de longitud completa complementaria a ella, el fragmento de la posición 373 a la posición 4005 de SEQ ID Nº: 2 y como se definió en SEQ ID Nº: 18 o una secuencia de longitud completa complementaria a ella, el fragmento de la posición 373 a la posición 3408 de SEQ ID Nº: 3 y como se definió en SEQ ID Nº: 19 o una secuencia de longitud completa complementaria a ella, el fragmento de la posición 373 a la posición 3018 de SEQ ID Nº: 4 y como se definió en SEQ ID Nº: 20 o una secuencia de longitud completa complementaria a ella, y el fragmento de la posición 373 a la posición 4269 de SEQ ID Nº: 5 y como se definió en SEQ ID Nº: 21 o una secuencia de longitud completa complementaria a ella.

2. Un vector que contiene una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1.

3. El vector según la reivindicación 2, que se selecciona del grupo de un plásmido, un cósmido, un virus y un bacteriófago.

4. El vector según la reivindicación 3, que es un plásmido.

5. Las células hospedadoras transformadas mediante un vector según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.

6. Una proteína codificada por una secuencia de nucleótidos, según la reivindicación 1.

7. Una dextransacarasa que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del fragmento del aminoácido de la posición 125 al aminoácido de la posición 1423 de SEQ ID Nº: 6 y como se definió en SEQ ID Nº:22, el fragmento del aminoácido de la posición 125 al aminoácido de la posición 1335 de SEQ ID Nº: 7 y como se definió en SEQ ID Nº: 23, el fragmento del aminoácido de la posición 125 al aminoácido de la posición 1136 de SEQ ID Nº: 8 y como se definió en SEQ ID Nº: 24, el fragmento del aminoácido de la posición 125 al aminoácido de la posición 1006 de SEQ ID Nº: 9 y como se definió en SEQ ID Nº: 25, y el fragmento del aminoácido de la posición 125 al aminoácido de la posición 1423 de SEQ ID Nº: 10 y como se definió en SEQ ID Nº: 26.

8. Una proteína de fusión que comprende, en la posición N-terminal y/o C-terminal, un marcador proteico seleccionado del grupo de un marcador de poli-His, un marcador de epítopo c-myc, un marcador HA, un marcador T7, un marcador S, un marcador de trpE, un marcador de avidina/estreptavidina, un marcador estafilocócico A, un marcador de proteína G, un marcador de dihidrofolato reductasa, marcadores de dominios de unión a celulosa, un marcador de policisteína, un marcador de fenilalanina, un marcador de GST bacteriana, un marcador de proteína de unión a maltosa, un marcador de tiorredoxina, un marcador de β-galactosidasa y un marcador de proteína VSV para las secuencias de aminoácidos seleccionadas de SEQ ID Nº: 22, SEQ ID Nº: 23, SEQ ID Nº: 24, SEQ ID Nº: 25, y SEQ ID Nº: 26.

9. La proteína de fusión según la reivindicación 8, en el que un marcador de tiorredoxina está fusionado a la secuencia de ácido nucleico N-terminal y un marcador de 6X His está fusionado al extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico.

10. Un método para preparar una dextransacarasa mutada y/o truncada, que comprende las etapas siguientes:

(a) cultivar células hospedadoras según la reivindicación 6 en condiciones que permiten la expresión de una dextransacarasa;

(b) aislar dicha dextransacarasa del medio de cultivo; y

(c) opcionalmente purificar la dextransacarasa aislada.

11. Un método para producir dextranos y/o isomalto-oligosacáridos con una masa molar controlada, que comprende hacer reaccionar una dextransacarasa truncada y/o mutada que consiste en una secuencia seleccionada de SEQ ID Nº: 22, SEQ ID Nº: 23, SEQ ID Nº: 24, SEQ ID Nº: 25, y SEQ ID Nº: 26 con al menos sacarosa y opcionalmente con al menos un aceptor.

12. Una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que consiste en las secuencias de aminoácidos consecutivos de longitud completa de cualquiera de SEQ ID Nºs 22 a 26.

Secuencia de DSR-S vardel Δ4N

M G : marcador de tiorredoxina
H H : marcador de 6xHis
T Q : proteína de interés

```
M  G  S  D  K  I  I  H  L  T  D  D  S  F  D  T  D  V      18
ATG GGA TCT GAT AAA ATT ATT CAT CTG ACT GAT GAT TCT TTT GAT ACT GAT GTA   54

L  K  A  D  G  A  I  L  V  D  F  W  A  H  W  C  G  P      36
CTT AAG GCA GAT GGT GCA ATC CTG GTT GAT TTC TGG GCA CAC TGG TGC GGT CCG  108

C  K  M  I  A  P  I  L  D  E  I  A  D  E  Y  Q  G  K      54
TGC AAA ATG ATC GCT CCG ATT CTG GAT GAA ATC GCT GAC GAA TAT CAG GGC AAA  162

L  T  V  A  K  L  N  I  D  H  N  P  G  T  A  P  K  Y      72
CTG ACC GTT GCA AAA CTG AAC ATC GAT CAC AAC CCG GGC ACT GCG CCG AAA TAT  216

G  I  R  G  I  P  T  L  L  L  F  K  N  G  E  V  A  A      90
GGC ATC CGT GGT ATC CCG ACT CTG CTG CTG TTC AAA AAC GGT GAA GTG GCG GCA  270

T  K  V  G  A  L  S  K  G  Q  L  K  E  F  L  D  A  N     108
ACC AAA GTG GGT GCA CTG TCT AAA GGT CAG TTG AAA GAG TTC CTC GAC GCT AAC  324

L  A  G  S  G  S  G  D  D  D  D  K  L  A  L  M  T  Q     126
CTG GCC GGC TCT GGA TCC GGT GAT GAC GAT GAC AAG CTC GCC CTT ATG ACA CAA  378

Q  V  S  G  K  Y  V  E  K  D  G  S  W  Y  Y  Y  F  D     144
CAA GTT AGC GGC AAG TAC GTT GAA AAA GAC GGT AGT TGG TAT TAT TAT TTT GAT  432

D  G  K  N  A  K  G  L  S  T  I  D  N  N  I  Q  Y  F     162
GAT GGC AAA AAT GCT AAA GGT TTA TCA ACG ATA GAC AAC AAT ATT CAA TAT TTT  486

Y  E  S  G  E  Q  A  K  G  Q  Y  V  T  I  D  N  Q  T     180
TAC GAG AGT GGT AAA CAA GCC AAA GGA CAG TAT GTC ACA ATT GAT AAT CAA ACA  540

Y  Y  F  D  K  G  S  G  D  E  L  T  G  L  Q  S  I  D     198
TAT TAT TTT GAT AAG GGC TCA GGT GAT GAG TTA ACT GGT CTG CAA AGC ATT GAT  594

G  N  I  V  A  F  N  D  E  G  Q  Q  I  F  N  Q  Y  Y     216
GGG AAC ATA GTT GCT TTT AAC GAT GAA GGG CAA CAA ATT TTT AAT CAA TAT TAC  648

Q  S  E  N  G  T  T  Y  Y  F  D  D  K  G  H  A  A  T     234
CAA TCT GAA AAT GGT ACA ACA TAC TAC TTT GAT GAT AAA GGA CAC GCT GCT ACC  702

G  I  K  N  I  E  G  K  N  Y  Y  F  D  N  L  G  Q  L     252
GGT ATT AAG AAT ATC GAG GGC AAA AAT TAT TAT TTT GAT AAT CTT GGG CAA CTA  756

K  K  G  F  S  G  V  I  D  G  Q  I  M  T  F  D  Q  E     270
AAA AAA GGC TTC TCT GGT GTG ATT GAT GGT CAA ATA ATG ACA TTT GAT CAG GAA  810

T  G  Q  E  V  S  N  T  T  S  E  I  K  E  G  L  T  T     288
ACA GGG CAA GAA GTT TCT AAC ACA ACT TCT GAA ATA AAA GAA GGT TTG ACG ACT  864

Q  N  T  D  Y  S  E  H  N  A  A  H  G  T  D  A  E  D     306
CAA AAC ACG GAT TAT AGC GAA CAT AAT GCA GCC CAC GGT ACG GAT GCT GAG GAC  918

F  E  N  I  D  G  Y  L  T  A  S  S  W  Y  R  P  T  G     324
TTT GAA AAT ATT GAC GGC TAT TTA ACA GCT AGT TCA TGG TAT CGT CCA ACA GGT  972

I  L  R  N  G  T  D  W  E  P  S  T  D  T  D  F  R  P     342
ATT TTA CGT AAC GGA ACA GAC TGG GAA CCT TCT ACA GAT ACA GAT TTC AGA CCA 1026

I  L  S  V  W  W  P  D  K  N  T  Q  V  N  Y  L  N  Y     360
ATA TTG TCA GTG TGG TGG CCA GAT AAG AAC ACC CAG GTC AAT TAT TTA AAT TAC 1080

M  A  D  L  G  F  I  S  N  A  D  S  F  E  T  G  D  S     378
ATG GCT GAT TTA GGG TTT ATC AGT AAT GCG GAC AGT TTT GAA ACT GGG GAT AGC 1134
```

FIGURA 1

```
Q  S  L  L  N  E  A  S  N  Y  V  Q  K  S  I  E  N  K    396
CAA AGC TTA TTA AAT GAA GCA AGT AAC TAT GTT CAA AAA TCA ATT GAA ATG AAA   1188

I  S  A  Q  Q  S  T  E  W  L  K  D  A  M  A  A  F  I    414
ATT AGT GCG CAA CAA AGT ACA GAG TGG TTA AAG GAT GCA ATG GCG GCC TTC ATT   1242

V  A  Q  P  Q  W  N  E  T  S  E  D  M  S  N  D  E  L    432
GTC GCG CAA CCA CAG TGG AAT GAA ACT AGT GAA GAT ATG AGC AAT GAC GAT TTA   1296

Q  N  G  A  L  T  Y  V  N  S  F  L  T  P  D  A  N  S    450
CAA AAT GGC GCA TTA ACT TAT GTC AAC AGT CCA CTG ACA CCT GAC GCT AAT TCA   1350

N  F  R  L  L  N  R  T  P  T  N  Q  T  G  E  Q  A  Y    468
AAC TTT AGA CTA CTT AAT CGG ACA CCA ACA AAC CAG ACT GGT GAA CAA GCG TAT   1404

N  L  D  W  S  K  G  G  F  E  L  L  L  A  N  D  V  D    486
AAT TTA GAT AAT TCA AAA GGT GGT TTT GAA TTG TTG TTA GCC AAT GAC GTT GAT   1458

N  S  N  P  V  V  Q  A  E  Q  L  W  W  L  Y  Y  L  M    504
AAT TCA AAC CCT GTA GTA CAA GCA GAA CAA TTG AAT TGG TTA TAT TAT TTA ATG   1512

N  F  G  T  I  T  A  N  D  A  D  A  N  F  D  G  I  R    522
AAT TTT GGT ACG ATT ACG GCC AAC GAC GCG GAT GCT AAT TTT GAT GGT ATT CGT   1566

V  D  A  V  D  N  V  D  A  D  L  L  Q  I  A  A  D  Y    540
GTA GAT GCA GTC GAC AAT GTG GAT GCT GAT TTG TTA CAA ATT GCT GCC GAT TAT   1620

F  K  L  A  Y  G  V  D  Q  N  D  A  T  A  N  Q  H  L    558
TTC AAA CTA GCT TAC GGT GTT GAT CAA AAT GAT GCT ACT GCT AAT CAG CAT CTT   1674

S  I  L  E  D  W  S  H  N  D  P  L  Y  V  T  D  Q  G    576
TCA ATT TTG GAA GAT TGG AGT CAC AAT GAT CCT TTG TAT GTA ACA GAT CAA GGA   1728

S  N  Q  L  T  M  D  D  Y  V  H  T  Q  L  I  W  S  L    594
AGC AAT CAA TTA ACC ATG GAT GAT TAT GTG CAC ACA CAA TTA ATC TGG TCT CTA   1782

T  K  S  S  D  I  R  G  T  M  Q  R  F  V  D  Y  Y  M    612
ACA AAA TCA TCT GAC ATA CGA GGT ACA ATG CAG CGC TTC GTG GAT TAT TAT ATG   1836

V  D  R  S  N  D  S  T  E  N  E  A  I  F  N  Y  S  F    630
GTG GAT CGA TCT AAT GAT AGT ACA GAA AAC GAA GCC ATT CCT AAT TAC AGC TTT   1890

V  R  A  H  D  S  E  V  Q  T  V  I  A  Q  I  V  S  D    648
GTA CGT GCA CAC GAC AGC GAA GTG CAA ACG GTT ATT GCC CAA ATT GTT TCC GAT   1944

L  Y  P  D  V  E  N  S  L  A  P  T  T  E  Q  L  A  A    666
TTG TAT CCT GAT GTT GAA AAT AGT TTA GCA CCA ACA ACA GAA CAA TTG GCA GCT   1998

A  F  K  V  Y  N  E  D  E  K  L  A  D  K  K  Y  T  Q    684
GCT TTC AAA GTA TAC AAT GAA GAT GAA AAA TTA GCA GAC AAA AAG TAC ACA CAA   2052

Y  N  M  A  S  A  Y  A  M  L  L  T  N  K  D  T  V  P    702
TAT AAT ATG GCT AGT GCT TAT GCG ATG TTG CTA ACC AAT AAG GAT ACT GTT CCT   2106

R  V  Y  Y  G  D  L  Y  T  D  D  G  Q  Y  M  A  T  K    720
CGT GTC TAT TAT GGC GAT TTA TAT ACA GAT GAT GGT CAA TAT ATG GCA ACA AAG   2160

S  P  Y  Y  D  A  I  N  T  L  L  K  A  R  V  Q  Y  V    738
TCA CCA TAC TAT GAT GCG ATT AAC ACT TTG CTA AAG GCT AGA GTT CAG TAT GTT   2214

A  G  G  Q  S  M  S  V  D  S  N  D  V  L  T  S  V  R    756
GCT GGT GGC CAA TCG ATG TCC GTT GAT AGT AAT GAC GTG TTA ACA AGT GTT CGC   2268

Y  G  K  D  A  M  T  A  S  D  T  G  T  S  E  T  R  T    774
TAT GGT AAA GAT GCC ATG ACA GCT TCT GAC ACT GGA ACA TCT GAG ACG CGT ACT   2322

E  G  I  G  V  I  V  S  N  N  A  E  L  Q  L  E  D  G    792
GAA GGT ATT GGA GTC ATC GTC AGC AAT AAC GCG GAG CTA CAA TTA GAG GAT GGG   2376

H  T  V  T  L  K  M  G  A  A  H  K  N  Q  A  Y  R  A    810
CAT ACT GTC ACA TTG CAT ATG GGG GCA GCT CAT AAG AAC CAA GCT TAT CGT GCT   2430
```

FIGURA 1 (continuación)

```
L   L   S   T   T   A   D   G   L   A   Y   Y   D   T   D   E   N   A     828
TTG TTA TCA ACA ACT GCA GAT GGA TTA GCT TAT TAT GAT ACT GAT GAA AAT GCA   2484

F   V   A   Y   T   D   A   N   G   D   L   I   F   T   N   E   S   I     846
CCT GTG GCG TAC ACA GAT GCT AAC GGC GAT TTG ATT TTT ACG AAT GAA TCA ATT   2538

Y   G   V   Q   N   P   Q   V   S   G   Y   L   A   V   W   V   P   V     864
TAT GGT GTA CAA AAT CCA CAA GTT TCT GGT TAC TTG GCA GTT TGG GTT CCG GTA   2592

G   A   Q   Q   D   Q   D   A   R   T   A   S   D   T   T   T   N   T     882
GGT GCG CAA CAA GAT CAA GAT GCA CGA ACG GCC TCT GAT ACA ACA ACA AAC ACG   2646

S   D   K   V   F   E   S   N   A   A   L   D   S   Q   V   I   Y   E     900
AGT GAT AAA GTG TTC GAT TCA AAC GCT GCT CTT GAT TCT CAA GTC ATC TAC GAA   2700

G   F   S   N   F   Q   A   F   A   T   D   S   S   E   Y   T   N   V     918
GGT TTC TCA AAC TTC CAA GCA TTT GCT ACA GAC AGC AGT GAA TAT ACA AAC GTA   2754

V   I   R   Q   N   A   D   Q   F   K   Q   W   G   V   T   S   F   Q     936
GTC ATC GCT CAG AAT GCG GAC CAA TTT AAG CAA TGG GGT GTG ACA AGC TTC CAA   2808

L   A   P   Q   Y   R   S   S   T   D   T   S   F   L   D   S   I   I     954
TTG GCA CCA CAA TAT CGT TCA AGT ACA GAT ACA AGT TTC TTG GAT TCA ATT ATT   2862

Q   N   G   Y   A   F   T   D   R   Y   D   L   G   Y   G   T   P   T     972
CAA AAC GGG TAT GCA TTC ACG GAT CGT TAT GAC TTA GGT TAT GGC ACA CCG ACA   2916

K   Y   G   T   A   D   Q   L   R   D   A   I   K   A   L   H   A   S     990
AAA TAT GGA ACT GCT GAT CAG TTG CGC GAT GCT ATT AAA GCC TTA CAT GCT AGC   2970

G   I   Q   A   I   A   D   N   V   P   D   Q   I   Y   N   L   P   E     1008
GGT ATT CAA GCC ATT GCC GAT TGG GTG CCG GAC CAA ATT TAT AAT TTG CCA GAG   3024

Q   E   L   A   T   V   T   R   T   N   S   F   G   D   D   D   T   D     1026
CAA GAA TTA GCT ACT GTC ACA AGA ACA AAT TCA TTT GGA GAT GAC GAT ACA GAT   3078

S   D   I   D   N   A   L   Y   V   V   Q   S   R   G   G   G   Q   Y     1044
TCT GAT ATT GAC AAT GCC TTA TAT GTT GTA CAA AGT CGT GGG GGT GGT CAA TAT   3132

Q   E   M   Y   G   G   A   F   L   H   H   L   Q   A   L   Y   P   S     1062
CAA GAG ATG TAT GGT GGT GCC TTC TTA GAA GAG TTA CAG GCA CTC TAT CCA TCC   3186

L   F   K   V   N   Q   I   S   T   G   V   P   I   D   Q   S   V   K     1080
CTA TTT AAA GTG AAT CAA ATC TCA ACT GGC GTT CCA ATT GAT GGC AGT GTA AAG   3240

I   T   E   W   A   A   K   Y   F   N   G   S   N   I   Q   G   K   G     1098
ATT ACT GAG TGG GCG GCT AAG TAC TTC AAT GGC TCT AAC ATC CAA GGT AAA GGT   3294

A   G   Y   V   L   K   D   M   G   S   N   K   Y   F   K   V   V   S     1116
GCT GGA TAC GTA TTG AAA GAT ATG GGT TCT AAT AAG TAC TTT AAG GTC GTT TCG   3348

N   T   E   D   G   D   Y   L   P   K   Q   L   T   N   D   L   S   E     1134
AAC ACT GAG GAT GGT GAC TAC TTA CCA AAA CAG TTA ACT AAT GAT CTG TCA GAA   3402

T   G   F   T   H   D   D   K   G   I   I   Y   Y   T   L   S   G   Y     1152
ACT GGC TTT ACA CAC GAT GAT AAA GGA ATC ATC TAT TAT ACA TTA AGT GGT TAT   3456

R   A   Q   N   A   F   I   Q   D   D   D   N   N   Y   Y   Y   F   D     1170
CGT GCC CAA AAT GCA TTT ATT CAA GAT GAT GAT AAT AAC TAT TAC TAT TTT GAT   3510

K   T   G   H   L   V   T   G   L   Q   K   I   N   N   H   T   Y   F     1188
AAA ACA GGT CAT TTA GTA ACA GGT TTG CAA AAG ATT AAT AAC CAT ACC TAC TTC   3564

F   L   P   N   G   I   E   L   V   K   S   F   L   Q   N   K   D   G     1206
TTC TTA CCT AAT GGT ATC GAA CTG GTC AAG AGC TTC TTA CAA AAC GAA GAT GGT   3618

T   I   V   Y   F   D   K   K   G   H   Q   V   F   D   Q   Y   I   T     1224
ACA ATT GTT TAT TTC GAT AAG AAA GGT CAT CAA GTT TTT GAT CAA TAT ATA ACT   3672
```

FIGURA 1 (continuación)

```
D   Q   N   G   N   A   Y   Y   F   D   D   A   G   V   M   L   K   S     1242
GAT CAA AAT GGA AAT GCG TAT TAC TTT GAT GAT GCT GGT GTA ATG CTT AAA TCA   3726

G   L   A   T   I   D   G   H   Q   Q   Y   F   D   Q   N   G   V   Q     1260
GGG CTT GCA ACG ATT GAT GGA CAT CAA CAG TAT TTT GAT CAA AAT GGT GTG CAG   3780

V   K   D   K   F   V   I   G   T   D   G   Y   K   Y   Y   F   E   P     1278
GTT AAG GAT AAG TTT GTG ATT GGC ACT GAT GGT TAT AAG TAT TAC TTT GAA CCA   3834

G   S   G   N   L   A   I   L   R   Y   V   Q   N   S   K   N   Q   W     1296
GGT AGT GGT AAC TTA GCT ATC CTA CGT TAT GTG CAA AAT AGT AAG AAT CAA TGG   3888

F   Y   F   D   G   N   G   H   A   V   T   G   F   Q   T   I   N   G     1314
TTC TAT TTT GAT GGT AAT GGC CAT GCT GTC ACT GGT TTC CAA ACA ATT AAT GGT   3942

K   K   Q   Y   F   Y   N   D   G   H   Q   S   K   G   E   F   I   D     1332
AAA AAA CAA TAT TTC TAT AAT GAT GGT CAT CAA AGT AAA GGT GAA TTC ATT GAT   3996

A   D   G   D   T   F   Y   T   S   A   T   D   G   R   L   V   T   G     1350
GCA GAC GGG GAT ACT TTC TAT ACG AGT GCC ACT GAT GGT CGC CTA GTA ACT GGT   4050

V   Q   K   I   N   G   I   T   Y   A   F   D   E   T   G   N   L   I     1368
GTT CAG AAG ATT AAT GGT ATT ACC TAT GCT TTT GAT AAC ACA GGA AAT TTG ATC   4104

T   N   Q   Y   Y   Q   L   A   D   G   K   Y   M   L   L   D   D   S     1386
ACA AAT CAG TAT TAT CAA TTA GCA GAT GGT AAA TAT ATG TTG TTA GAT GAT AGT   4158

G   R   A   E   T   G   F   V   L   Q   D   G   V   L   R   Y   F   D     1404
GGT CGT GCG AAA ACA GGG TTT GTA TTG CAA GAT GGT GTA CTA AGA TAC TTC GAT   4212

Q   N   G   E   Q   V   K   D   A   I   I   V   D   P   D   T   N   L     1422
CAA AAC GGT GAG CAA GTG AAA GAT GCT ATC ATT GTG GAT CCA GAT ACT AAC TTG   4266

S   Y   K   G   E   L   E   G   K   P   I   P   N   P   L   L   G   L     1440
AGT TAC AAG GGC GAG CTT GAA GGT AAG CCT ATC CCT AAC CCT CTC CTC GGT CTC   4320

D   S   T   R   T   G   H   H   H   H   H   H                             1452
GAT TCT ACG CGT ACC GGT CAT CAT CAC CAT CAC CAT                           4356
```

FIGURA 1 (final)

Secuencia de DSR-S vardel Δ3

M G : marcador de tiorredoxina
H H : marcador de 6xHis
T Q : proteína de interés

```
M  G  S  D  K  I  I  H  L  T  D  D  S  F  D  T  D  V      18
ATG GGA TCT GAT AAA ATT ATT CAT CTG ACT GAT GAT TCT TTT GAT ACT GAT GTA   54

L  K  A  D  G  A  I  L  V  D  F  W  A  H  W  C  G  P      36
CTT AAG GCA GAT GGT GCA ATC CTG GTT GAT TTC TGG GCA CAC TGG TGC GGT CCG  108

C  K  M  I  A  P  I  L  D  E  I  A  D  E  Y  Q  G  K      54
TGC AAA ATG ATC GCT CCG ATT CTG GAT GAA ATC GCT GAC GAA TAT CAG GGC AAA  162

L  T  V  A  K  L  N  I  D  H  N  P  G  T  A  P  K  Y      72
CTG ACC GTT GCA AAA CTG AAC ATC GAT CAC AAC CCG GGC ACT GCG CCG AAA TAT  216

G  I  R  G  I  P  T  L  L  L  F  K  N  G  E  V  A  A      90
GGC ATC CGT GGT ATC CCG ACT CTG CTG CTG TTC AAA AAC GGT GAA GTG GCG GCA  270

T  K  V  G  A  L  S  K  G  Q  L  K  E  F  L  D  A  N     108
ACC AAA GTG GGT GCA CTG TCT AAA GGT CAG TTG AAA GAG TTC CTC GAC GCT AAC  324

L  A  G  S  G  S  G  D  D  D  D  K  L  A  L  M  T  Q     126
CTG GCC GGC TCT GGA TCC GGT GAT GAC GAT GAC AAG CTC GCC CTT ATG ACA CAA  378

Q  V  S  G  K  Y  V  E  K  D  G  S  W  Y  Y  Y  F  D     144
CAA GTT AGC GGC AAG TAC GTT GAA AAA GAC GGT AGT TGG TAT TAT TAT TTT GAT  432

D  G  K  N  A  K  G  L  S  T  I  D  N  N  I  Q  Y  F     162
GAT GGC AAA AAT GCT AAA GGT TTA TCA ACG ATA GAC AAC AAT ATT CAA TAT TTT  486

Y  E  S  G  K  Q  A  K  G  Q  Y  V  T  I  D  N  Q  T     180
TAC GAG AGT GGT AAA CAA GCC AAA GGA CAG TAT GTC ACA ATT GAT AAT CAA ACA  540

Y  Y  F  D  K  G  S  G  D  E  L  T  G  L  Q  S  I  D     198
TAT TAT TTT GAT AAG GGC TCA GGT GAT GAG TTA ACT GGT CTG CAA AGC ATT GAT  594

G  N  I  Y  A  F  N  D  E  G  Q  Q  I  F  N  Q  Y  Y     216
GGG AAC ATA GTT GCT TTT AAC GAT GAA GGG CAA CAA ATT TTT AAT CAA TAT TAC  648

Q  S  E  N  G  T  T  Y  Y  F  D  D  K  G  H  A  A  T     234
CAA TCT GAA AAT GGT ACA ACA TAC TAC TTT GAT GAT AAA GGA CAC GCT GCT ACC  702

G  I  K  N  I  E  G  K  N  Y  Y  F  D  N  L  G  Q  L     252
GGT ATT AAG AAT ATC GAG GGC AAA AAT TAT TAT TTT GAT AAT CTT GGG CAA CTA  756

K  K  G  F  S  G  V  I  D  G  Q  I  M  T  F  D  Q  E     270
AAA AAA GGC TTC TCT GGT GTG ATT GAT GGT CAA ATA ATG ACA TTT GAT CAG GAA  810

T  G  Q  E  V  S  N  T  T  S  E  I  K  E  G  L  T  T     288
ACA GGG CAA GAA GTT TCT AAC ACA ACT TCT GAA ATA AAA GAA GGT TTG ACG ACT  864

Q  N  T  D  Y  S  E  H  N  A  A  H  G  T  D  A  E  D     306
CAA AAC ACG GAT TAT AGC GAA CAT AAT GCA GCC CAC GGT ACG GAT GCT GAG GAC  918

F  E  N  I  D  G  Y  L  T  A  S  S  W  Y  R  P  T  G     324
TTT GAA AAT ATT GAC GGC TAT TTA ACA GCT AGT TCA TGG TAT CGT CCA ACA GGT  972

I  L  R  N  G  T  D  W  E  P  S  T  D  T  D  F  R  P     342
ATT TTA CGT AAC GGA ACA GAC TGG GAA CCT TCT ACA GAT ACA GAT TTC AGA CCA 1026

I  L  S  V  W  W  P  D  K  N  T  Q  V  N  Y  L  N  Y     360
ATA TTG TCA GTG TGG CGG CCA GAT AAG AAC ACC CAG GTC AAT TAT TTA AAT TAC 1080
```

FIGURA 2

```
M   A   D   L   G   F   I   S   N   A   D   S   F   E   T   G   D   S     378
ATG GCT GAT TTA GGG TTT ATC AGT AAT GCG GAC AGT TTT GAA ACT GGG GAT AGC   1134

Q   S   L   L   N   E   A   S   N   Y   V   Q   K   S   I   E   N   K     396
CAA AGC TTA TTA AAT GAA GCA AGT AAC TAT GTT CAA AAA TCA ATT GAA ATG AAA   1188

I   S   A   Q   Q   S   T   E   N   L   K   D   A   M   A   A   F   I     414
ATT AGT GCG CAA CAA AGT ACA GAG TGG TTA AAG GAT GCA ATG GCG GCC TTC ATT   1242

V   A   Q   P   Q   W   N   E   T   S   E   D   K   S   N   D   H   L     432
GTC GCG CAA CCA CAG TGG AAT GAA ACT AGT GAA GAT ATG AGC AAT GAC CAT TTA   1296

Q   N   G   A   L   T   Y   V   N   S   P   L   T   P   D   A   N   S     450
CAA AAT GGC GCA TTA ACT TAT GTC AAC AGT CCA CTG ACA CCT GAC GCT AAT TCA   1350

N   F   R   L   L   N   R   T   P   T   W   Q   T   G   E   Q   A   Y     468
AAC TTT AGA CTA CTT AAT CGG ACA CCA ACA AAC CAG ACT GGT GAA CAA GCG TAT   1404

N   L   D   N   S   K   G   G   F   S   L   L   L   A   N   D   V   D     486
AAT TTA GAT AAT TCA AAA GGT GGT TTT GAA TTG TTG TTA GCC AAT GAC GTT GAT   1458

N   S   N   P   V   V   Q   A   E   Q   L   N   W   L   Y   Y   L   M     504
AAT TCA AAC CCT GTA GTA CAA GCA GAA CAA TTG AAT TGG TTA TAT TAT TTA ATG   1512

N   F   G   T   I   T   A   N   D   A   D   A   N   F   D   G   I   R     522
AAT TTT GGT ACG ATT ACG GCC AAC GAC GCG GAT GCT AAT TTT GAT GGT ATT CGT   1566

V   D   A   V   D   N   V   D   A   D   L   L   Q   I   A   A   D   Y     540
GTA GAT GCA GTC GAC AAT GTG GAT GCT GAT TTG TTA CAA ATT GCT GCC GAT TAT   1620

F   K   L   A   Y   G   V   D   Q   N   D   A   T   A   N   Q   H   L     558
TTC AAA CTA GCT TAC GGT GTT GAT CAA AAT GAT GCT ACT GCT AAT CAG CAT CTT   1674

S   I   L   E   D   W   S   H   N   D   P   L   Y   V   T   D   Q   G     576
TCA ATT TTG GAA GAT TGG AGT CAC AAT GAT CCT TTG TAT GTA ACA GAT CAA GGA   1728

S   N   Q   L   T   M   D   D   Y   V   H   T   Q   L   I   W   S   L     594
AGC AAT CAA TTA ACC ATG GAT GAT TAT GTG CAC ACA CAA TTA ATC TGG TCT CTA   1782

T   K   S   S   D   I   R   G   T   M   Q   R   F   V   D   Y   Y   M     612
ACA AAA TCA TCT GAC ATA CGA GGT ACA ATG CAG CGC TTC GTG GAT TAT TAT ATG   1836

V   D   R   S   N   D   S   T   E   N   E   A   I   P   M   Y   S   F     630
GTG GAT CGA TCT AAT GAT AGT ACA GAA AAC GAA GCC ATT CCT ATT TAC AGC TTT   1890

V   R   A   H   D   S   E   V   Q   T   V   I   A   Q   I   V   S   D     648
GTA CGT GCA CAC GAC AGC GAA GTG CAA ACG GTT ATT GCC CAA ATT GTT TCC GAT   1944

L   Y   P   D   V   E   N   S   L   A   F   T   T   E   Q   L   A   A     666
TTG TAT CCT GAT GTT GAA AAT AGT TTA GCA CCA ACA ACA GAA CAA TTG GCA GCT   1998

A   F   K   V   Y   N   E   D   E   K   L   A   D   K   K   Y   T   Q     684
GCT TTC AAA GTA TAC AAT GAA GAT GAA AAA TTA GCA GAC AAA AAG TAC ACA CAA   2052

Y   N   M   A   S   A   Y   A   M   L   L   T   N   K   D   T   V   P     702
TAT AAT ATG GCT AGT GCT TAT GCG ATG TTG CTA ACC AAT AAG GAT ACT GTT CCT   2106

R   V   Y   Y   G   D   L   Y   T   D   D   G   Q   Y   M   A   T   K     720
CGT GTC TAT TAT GGC GAT TTA TAT ACA GAT GAT GGT CAA TAT ATG GCA ACA AAG   2160

S   P   Y   Y   D   A   I   N   T   L   L   K   A   R   V   Q   Y   V     738
TCA CCA TAC TAT GAT GCG ATT AAC ACT TTG CTA AAG GCT AGA GTT CAG TAT GTT   2214

A   G   G   Q   S   M   S   V   D   S   N   D   V   L   T   S   V   R     756
GCT GGT GGC CAA TCG ATG TCC GTT GAT AGT AAT GAC GTG TTA ACA AGT GTT CGC   2268

Y   G   K   D   A   M   T   A   S   D   T   G   T   S   E   T   R   T     774
TAT GGT AAA GAT GCC ATG ACA GCT TCT GAC ACT GGA ACA TCT GAG ACG CGT ACT   2322

E   G   I   G   V   I   V   S   N   N   A   E   L   Q   L   E   D   G     792
GAA GGT ATT GGA GTC ATC GTC AGC AAT AAC GCG GAG CTA CAA TTA GAG GAT GGG   2376
```

FIGURA 2 (continuación)

```
 H   T   V   T   L   H   M   G   A   A   E   K   N   Q   A   Y   R   A     810
CAT ACT GTC ACA TTG CAT ATG GGG GCA GCT CAT AAG AAC CAA GCT TAT CGT GCT   2430

 L   L   S   T   T   A   D   G   L   A   Y   Y   D   T   D   E   N   A     828
TTG TTA TCA ACA ACT GCA GAT GGA TTA GCT TAT TAT GAT ACT GAT GAA AAT GCA   2484

 P   V   A   Y   T   D   A   N   G   D   L   I   F   T   N   E   S   I     846
CCT GTG GCG TAC ACA GAT GCT AAC GGC GAT TTG ATT TTT ACG AAT GAA TCA ATT   2538

 Y   G   V   Q   N   P   Q   V   S   G   Y   L   A   V   W   V   F   V     864
TAT GGT GTA CAA AAT CCA CAA GTT TCT GGT TAC TTG GCA GTT TGG GTT CCG GTA   2592

 G   A   Q   Q   D   Q   D   A   R   T   A   S   D   T   T   T   N   T     882
GGT GCG CAA CAA GAT CAA GAT GCA CGA ACG GCC TCT GAT ACA ACA ACA AAC ACG   2646

 S   D   K   V   F   H   S   N   A   A   L   D   S   Q   V   I   Y   E     900
AGT GAT AAA GTG TTC CAT TCA AAC GCT GCT CTT GAT TCT CAA GTC ATC TAC GAA   2700

 G   F   S   M   F   Q   A   F   A   T   D   S   S   E   Y   T   N   V     918
GGT TTC TCA AAC TTC CAA GCA TTT GCT ACA GAC AGC AGT GAA TAT ACA AAC GTA   2754

 V   I   A   Q   N   A   D   Q   F   K   Q   W   G   V   I   S   F   Q     936
GTC ATC GCT CAG AAT GCG GAC CAA TTT AAG CAA TGG GGT GTG ACA AGC TTC CAA   2808

 L   A   P   Q   Y   R   S   S   T   D   T   S   F   L   D   S   I   I     954
TTG GCA CCA CAA TAT CGT TCA AGT ACA GAT ACA AGT TTC TTG GAT TCA ATT ATT   2862

 Q   N   G   Y   A   F   T   D   R   Y   D   L   G   Y   G   T   P   T     972
CAA AAC GGG TAT GCA TTC ACG GAT CGT TAT GAC TTA GGT TAT GGC ACA CCG ACA   2916

 K   Y   G   T   A   D   Q   L   R   D   A   I   K   A   L   H   A   S     990
AAA TAT GGA ACT GCT GAT CAG TTG CGC GAT GCT ATT AAA GCC TTA CAT GCT AGC   2970

 G   I   Q   A   I   A   D   W   V   F   D   Q   I   Y   N   L   P   E    1008
GGT ATT CAA GCC ATT GCC GAT TGG GTG CCG GAC CAA ATT TAT AAT TTG CCA GAG   3024

 Q   E   L   A   T   V   T   R   T   N   S   F   G   D   D   D   T   D    1026
CAA GAA TTA GCT ACT GTC ACA AGA ACA AAT TCA TTT GGA GAT GAC GAT ACA GAT   3078

 S   D   I   D   N   A   L   Y   V   V   Q   S   R   G   G   G   Q   Y    1044
TCT GAT ATT GAC AAT GCC TTA TAT GTT GTA CAA AGT CGT GGG GGT GGT CAA TAT   3132

 Q   E   M   Y   G   G   A   F   L   K   E   L   Q   A   L   Y   P   S    1062
CAA GAG ATG TAT GGT GGT GCC TTC TTA GAA GAG TTA CAG GCA CTC TAT CCA TCC   3186

 L   F   K   V   N   Q   I   S   T   G   V   P   I   D   G   S   V   K    1080
CTA TTT AAA GTG AAT CAA ATC TCA ACT GGC GTT CCA ATT GAT GGC AGT GTA AAG   3240

 I   T   E   W   A   A   K   Y   F   N   G   S   N   I   Q   G   K   G    1098
ATT ACT GAG TGG GCG GCT AAG TAC TTC AAT GGC TCT AAC ATC CAA GGT AAA GGT   3294

 A   G   Y   V   L   K   D   M   G   S   N   K   Y   F   K   V   V   S    1116
GCT GGA TAC GTA TTG AAA GAT ATG GGT TCT AAT AAG TAC TTT AAG GTC GTT TCG   3348

 N   T   E   D   G   D   Y   L   P   K   Q   L   T   N   D   L   S   E    1134
AAC ACT GAG GAT GGT GAC TAC TTA CCA AAA CAG TTA ACT AAT GAT CTG TCA GAA   3402

 T   G   F   T   H   D   D   K   G   I   I   Y   Y   T   L   S   G   Y    1152
ACT GGC TTT ACA CAC GAT GAT AAA GGA ATC ATC TAT TAT ACA TTA AGT GGT TAT   3456

 R   A   Q   N   A   F   I   Q   D   D   D   N   N   Y   Y   Y   F   D    1170
CGT GCC CAA AAT GCA TTT ATT CAA GAT GAT GAT AAT AAC TAT TAC TAT TTT GAT   3510

 K   T   G   H   L   V   T   G   L   Q   K   I   N   N   H   T   Y   F    1188
AAA ACA GGT CAT TTA GTA ACA GGT TTG CAA AAG ATT AAT AAC CAT ACC TAC TTC   3564

 F   L   P   N   G   I   E   L   V   K   S   F   L   Q   N   E   D   G    1206
TTC TTA CCT AAT GGT ATC GAA CTG GTC AAG AGC TTC TTA CAA AAC GAA GAT GGT   3618

 T   I   V   Y   F   D   K   K   G   H   Q   V   F   D   Q   Y   I   T    1224
ACA ATT GTT TAT TTC GAT AAG AAA GGT CAT CAA GTT TTT GAT CAA TAT ATA ACT   3672
```

FIGURA 2 (continuación)

```
 D   Q   N   G   N   A   Y   Y   F   D   D   A   G   V   M   L   K   S     1242
GAT CAA AAT GGA AAT GCG TAT TAC TTT GAT GAT GCT GGT GTA ATG CTT AAA TCA    3726

 G   L   A   T   I   D   G   H   Q   Q   Y   F   D   Q   N   G   V   Q     1260
GGG CTT GCA ACG ATT GAT GGA CAT CAA CAG TAT TTT GAT CAA AAT GGT GTG CAG    3780

 V   K   D   K   F   V   I   G   T   D   G   Y   K   Y   Y   F   E   P     1278
GTT AAG GAT AAG TTT GTG ATT GGC ACT GAT GGT TAT AAG TAT TAC TTT GAA CCA    3834

 G   S   G   N   L   A   I   L   R   Y   V   Q   N   S   K   N   Q   W     1296
GGT AGT GGT AAC TTA GCT ATC CTA CGT TAT GTG CAA AAT AGT AAG AAT CAA TGG    3888

 F   Y   F   D   G   N   G   H   A   V   T   G   F   Q   T   I   N   G     1314
TTC TAT TTT GAT GGT AAT GGC CAT GCT GTC ACT GGT TTC CAA ACA ATT AAT GGT    3942

 K   K   Q   Y   F   Y   N   D   G   H   Q   S   K   G   E   F   I   D     1332
AAA AAA CAA TAT TTC TAT AAT GAT GGT CAT CAA AGT AAA GGT GAA TTC ATT GAT    3996

 A   D   G   Y   K   G   E   L   E   G   K   P   I   P   N   P   L   L     1350
GCA GAC GGG TAC AAG GGC GAG CTT GAA GGT AAG CCT ATC CCT AAC CCT CTC CTC    4050

 G   L   D   S   T   R   T   G   H   H   H   H   H   H                     1364
GGT CTC GAT TCT ACG CGT ACC GGT CAT CAT CAC CAT CAC CAT                     4092
```

FIGURA 2 (final)

Secuencia de DSR-S vardel Core

M G : marcador de tiorredoxina
H H : marcador de 6xHis
T Q : proteína de interés

```
M  G  S  D  K  I  I  H  L  T  D  D  S  F  D  T  D  V     18
ATG GGA TCT GAT AAA ATT ATT CAT CTG ACT GAT GAT TCT TTT GAT ACT GAT GTA   54

L  K  A  D  G  A  I  L  V  D  F  W  A  H  W  C  G  P     36
CTT AAG GCA GAT GGT GCA ATC CTG GTT GAT TTC TGG GCA CAC TGG TGC GGT CCG  108

C  K  M  I  A  P  I  L  D  E  I  A  D  E  Y  Q  G  K     54
TGC AAA ATG ATC GCT CCG ATT CTG GAT GAA ATC GCT GAC GAA TAT CAG GGC AAA  162

L  T  V  A  K  L  N  I  D  H  N  P  G  T  A  P  K  Y     72
CTG ACC GTT GCA AAA CTG AAC ATC GAT CAC AAC CCG GGC ACT GCG CCG AAA TAT  216

G  I  R  G  I  P  T  L  L  L  F  K  N  G  E  V  A  A     90
GGC ATC CGT GGT ATC CCG ACT CTG CTG CTG TTC AAA AAC GGT GAA GTG GCG GCA  270

T  K  V  G  A  L  S  K  G  Q  L  K  E  F  L  D  A  N    108
ACC AAA GTG GGT GCA CTG TCT AAA GGT CAG TTG AAA GAG TTC CTC GAC GCT AAC  324

L  A  G  S  G  S  G  D  D  D  D  K  L  A  L  M  T  Q    126
CTG GCC GGC TCT GGA TCC GGT GAT GAC GAT GAC AAG CTC GCC CTT ATG ACA CAA  378

Q  V  S  G  K  Y  V  E  K  D  G  S  W  Y  Y  Y  F  D    144
CAA GTT AGC GGC AAG TAC GTT GAA AAA GAC GGT AGT TGG TAT TAT TAT TTT GAT  432

D  G  K  N  A  K  G  L  S  T  I  D  N  N  I  Q  Y  F    162
GAT GGC AAA AAT GCT AAA GGT TTA TCA ACG ATA GAC AAC AAT ATT CAA TAT TTT  486

Y  E  S  G  K  Q  A  K  G  Q  Y  V  T  I  D  N  Q  F    180
TAC GAG AGT GGT AAA CAA GCC AAA GGA CAG TAT GTC ACA ATT GAT AAT CAA ACA  540

Y  Y  F  D  K  G  S  G  D  E  L  T  G  L  Q  S  I  D    198
TAT TAT TTT GAT AAG GGC TCA GGT GAT GAG TTA ACT GGT CTG CAA AGC ATT GAT  594

G  N  I  V  A  F  N  D  E  G  Q  Q  I  F  N  Q  Y  Y    216
GGG AAC ATA GTT GCT TTT AAC GAT GAA GGG CAA CAA ATT TTT AAT CAA TAT TAC  648

Q  S  E  N  G  T  T  Y  Y  F  D  D  K  G  H  A  A  T    234
CAA TCT GAA AAT GGT ACA ACA TAC TAC TTT GAT GAT AAA GGA CAC GCT GCT ACC  702

G  I  K  N  I  E  G  K  N  Y  Y  F  D  N  L  G  Q  L    252
GGT ATT AAG AAT ATC GAG GGC AAA AAT TAT TAT TTT GAT AAT CTT GGG CAA CTA  756

K  K  G  F  S  G  V  I  D  G  Q  I  M  T  F  D  Q  E    270
AAA AAA GGC TTC TCT GGT GTG ATT GAT GGT CAA ATA ATG ACA TTT GAT CAG GAA  810

T  G  Q  E  V  S  N  T  T  S  K  I  K  E  G  L  T  T    288
ACA GGG CAA GAA GTT TCT AAC ACA ACT TCT GAA ATA AAA GAA GGT TTG ACG ACT  864

Q  N  T  D  Y  S  E  H  N  A  A  H  G  T  D  A  E  D    306
CAA AAC ACG GAT TAT AGC GAA CAT AAT GCA GCC CAC GGT ACG GAT GCT GAG GAC  918

F  E  N  I  D  G  Y  L  T  A  S  S  W  Y  R  P  T  G    324
TTT GAA AAT ATT GAC GGC TAT TTA ACA GCT AGT TCA TGG TAT CGT CCA ACA GGT  972

I  L  R  N  G  T  D  W  E  P  S  T  D  T  D  F  R  P    342
ATT TTA CGT AAC GGA ACA GAC TGG GAA CCT TCT ACA GAT ACA GAT TTC AGA CCA 1026

I  L  S  V  W  W  P  D  K  N  T  Q  V  N  Y  L  N  Y    360
ATA TTG TCA GTG TGG TGG CCA GAT AAG AAC ACC CAG GTC AAT TAT TTA AAT TAC 1080

M  A  D  L  G  F  I  S  N  A  D  S  F  E  T  G  D  S    378
ATG GCT GAT TTA GGG TTT ATC AGT AAT GCG GAC AGT TTT GAA ACT GGG GAT AGC 1134
```

FIGURA 3

```
 Q   S   L   L   N   E   A   S   N   Y   V   Q   K   S   I   E   K   K     396
CAA AGC TTA TTA AAT GAA GCA AGT AAC TAT GTT CAA AAA TCA ATT GAA ATG AAA   1188

 I   S   A   Q   Q   S   T   E   W   L   K   D   A   M   A   A   F   I     414
ATT AGT GCG CAA CAA AGT ACA GAG TGG TTA AAG GAT GCA ATG GCG GCC TTC ATT   1242

 V   A   Q   P   Q   W   N   E   T   S   E   D   M   S   N   D   H   L     432
GTC GCG CAA CCA CAG TGG AAT GAA ACT AGT GAA GAT ATG AGC AAT GAC CAT TTA   1296

 Q   N   G   A   L   T   Y   V   N   S   P   L   T   P   D   A   N   S     450
CAA AAT GGC GCA TTA ACT TAT GTC AAC AGT CCA CTG ACA CCT GAC GCT AAT TCA   1350

 N   F   R   L   L   N   R   T   P   T   N   Q   T   G   E   Q   A   Y     468
AAC TTT AGA CTA CTT AAT CGG ACA CCA ACA AAC CAG ACT GGT GAA CAA GCG TAT   1404

 N   L   D   N   S   K   G   G   F   E   L   L   L   A   N   D   V   D     486
AAT TTA GAT AAT TCA AAA GGT GGT TTT GAA TTG TTG TTA GCC AAT GAC GTT GAT   1458

 N   S   N   P   V   V   Q   A   E   Q   L   N   W   L   Y   Y   L   M     504
AAT TCA AAC CCT GTA GTA CAA GCA GAA CAA TTG AAT TGG TTA TAT TAT TTA ATG   1512

 N   F   G   T   I   T   A   N   D   A   D   A   N   F   D   G   I   R     522
AAT TTT GGT ACG ATT ACG GCC AAC GAC GCG GAT GCT AAT TTT GAT GGT ATT CGT   1566

 V   D   A   V   D   N   V   D   A   D   L   L   Q   I   A   A   D   Y     540
GTA GAT GCA GTC GAC AAT GTG GAT GCT GAT TTG TTA CAA ATT GCT GCC GAT TAT   1620

 F   I   L   A   Y   G   V   D   Q   N   D   A   T   A   N   Q   E   L     558
TTC AAA CTA GCT TAC GGT GTT GAT CAA AAT GAT GCT ACT GCT AAT CAG CAT CTT   1674

 S   I   L   E   D   W   S   H   N   D   P   L   Y   V   T   D   Q   G     576
TCA ATT TTG GAA GAT TGG AGT CAC AAT GAT CCT TTG TAT GTA ACA GAT CAA GGA   1728

 S   N   Q   L   T   M   D   D   Y   V   H   T   Q   L   I   W   S   L     594
AGC AAT CAA TTA ACC ATG GAT GAT TAT GTG CAC ACA CAA TTA ATC TGG TCT CTA   1782

 T   K   S   S   D   I   R   G   T   M   Q   R   F   V   D   Y   Y   M     612
ACA AAA TCA TCT GAC ATA CGA GGT ACA ATG CAG CGC TTC GTG GAT TAT TAT ATG   1836

 V   D   R   S   N   D   S   T   E   N   E   A   I   P   N   Y   S   F     630
GTG GAT CGA TCT AAT GAT AGT ACA GAA AAC GAA GCC ATT CCT AAT TAC AGC TTT   1890

 V   R   A   H   D   S   E   V   Q   T   V   I   A   Q   I   V   S   D     648
GTA CGT GCA CAC GAC AGC GAA GTG CAA ACG GTT ATT GCC CAA ATT GTT TCC GAT   1944

 L   Y   P   D   V   E   N   S   L   A   P   T   T   E   Q   L   A   A     666
TTG TAT CCT GAT GTT GAA AAT AGT TTA GCA CCA ACA ACA GAA CAA TTG GCA GCT   1998

 A   F   K   V   Y   N   E   D   E   K   L   A   D   K   K   Y   T   Q     684
GCT TTC AAA GTA TAC AAT GAA GAT GAA AAA TTA GCA GAC AAA AAG TAC ACA CAA   2052

 Y   N   M   A   S   A   Y   A   M   L   L   T   N   K   D   T   V   P     702
TAT AAT ATG GCT AGT GCT TAT GCG ATG TTG CTA ACC AAT AAG GAT ACT GTT CCT   2106

 R   V   Y   Y   G   D   L   Y   T   D   D   G   Q   Y   M   A   T   K     720
CGT GTC TAT TAT GGC GAT TTA TAT ACA GAT GAT GGT CAA TAT ATG GCA ACA AAG   2160

 S   P   Y   Y   D   A   I   N   T   L   L   K   A   R   V   Q   Y   V     738
TCA CCA TAC TAT GAT GCG ATT AAC ACT TTG CTA AAG GCT AGA GTT CAG TAT GTT   2214

 A   G   G   Q   S   M   S   V   D   S   N   D   V   L   T   S   V   R     756
GCT GGT GGC CAA TCG ATG TCC GTT GAT AGT AAT GAC GTG TTA ACA AGT GTT CGC   2268

 Y   G   K   D   A   M   T   A   S   D   T   G   T   S   E   T   R   T     774
TAT GGT AAA GAT GCC ATG ACA GCT TCT GAC ACT GGA ACA TCT GAG ACG CGT ACT   2322

 E   G   I   G   V   I   V   S   N   N   A   E   L   Q   L   E   D   G     792
GAA GGT ATT GGA GTC ATC GTC AGC AAT AAC GCG GAG CTA CAA TTA GAG GAT GGG   2376

 H   T   V   T   L   H   M   G   A   A   H   K   N   Q   A   Y   R   A     810
CAT ACT GTC ACA TTG CAT ATG GGG GCA GCT CAT AAG AAC CAA GCT TAT CGT GCT   2430
```

FIGURA 3 (continuación)

```
 L   L   S   T   T   A   D   G   L   A   Y   Y   D   T   D   E   N   A     828
TTG TTA TCA ACA ACT GCA GAT GGA TTA GCT TAT TAT GAT ACT GAT GAA AAT GCA    2484

 P   V   A   Y   T   D   A   N   G   D   L   I   F   T   N   E   S   I     846
CCT GTG GCG TAC ACA GAT GCT AAC GGC GAT TTG ATT TTT ACG AAT GAA TCA ATT    2538

 Y   G   V   Q   N   P   Q   V   S   G   Y   L   A   V   W   V   P   V     864
TAT GGT GTA CAA AAT CCA CAA GTT TCT GGT TAC TTG GCA GTT TGG GTT CCG GTA    2592

 G   A   Q   Q   D   Q   D   A   R   T   A   S   D   Y   T   T   N   T     882
GGT GCG CAA CAA GAT CAA GAT GCA CGA ACG GCC TCT GAT ACA ACA ACA AAC ACG    2646

 S   D   K   V   F   H   S   N   A   A   L   D   S   Q   V   I   Y   E     900
AGT GAT AAA GTG TTC CAT TCA AAC GCT GCT CTT GAT TCT CAA GTC ATC TAC GAA    2700

 G   F   S   N   F   Q   A   F   A   T   D   S   S   E   Y   T   N   V     918
GGT TTC TCA AAC TTC CAA GCA TTT GCT ACA GAC AGC AGT GAA TAT ACA AAC GTA    2754

 V   I   A   Q   N   A   D   Q   F   K   Q   W   G   V   T   S   F   Q     936
GTC ATC GCT CAG AAT GCG GAC CAA TTT AAG CAA TGG GGT GTG ACA AGC TTC CAA    2808

 L   A   P   Q   Y   R   S   S   T   D   T   S   F   L   D   S   I   I     954
TTG GCA CCA CAA TAT CGT TCA AGT ACA GAT ACA AGT TTC TTG GAT TCA ATT ATT    2862

 Q   N   G   Y   A   F   T   D   R   Y   D   L   G   Y   G   T   P   T     972
CAA AAC GGG TAT GCA TTC ACG GAT CGT TAT GAC TTA GGT TAT GGC ACA CCG ACA    2916

 K   Y   G   T   A   D   Q   L   R   D   A   I   K   A   L   H   A   S     990
AAA TAT GGA ACT GCT GAT CAG TTG CGC GAT GCT ATT AAA GCC TTA CAT GCT AGC    2970

 G   I   Q   A   I   A   D   W   V   P   D   Q   I   Y   N   L   P   E    1008
GGT ATT CAA GCC ATT GCC GAT TGG GTG CCG GAC CAA ATT TAT AAT TTG CCA GAG    3024

 Q   E   L   A   Y   V   T   R   T   N   S   F   G   D   D   D   T   D    1026
CAA GAA TTA GCT ACT GTC ACA AGA ACA AAT TCA TTT GGA GAT GAC GAT ACA GAT    3078

 S   D   I   D   N   A   L   Y   V   V   Q   S   R   G   G   G   Q   Y    1044
TCT GAT ATT GAC AAT GCC TTA TAT GTT GTA CAA AGT CGT GGG GGT GGT CAA TAT    3132

 Q   E   N   Y   G   G   A   F   L   E   E   L   Q   A   L   Y   P   S    1062
CAA GAG ATG TAT GGT GGT GCC TTC TTA GAA GAG TTA CAG GCA CTC TAT CCA TCC    3186

 L   F   K   V   N   Q   I   S   T   G   V   P   I   D   G   S   V   K    1080
CTA TTT AAA GTG AAT CAA ATC TCA ACT GGC GTT CCA ATT GAT GGC AGT GTA AAG    3240

 I   T   E   W   A   A   K   Y   F   N   G   S   N   I   Q   G   K   G    1098
ATT ACT GAG TGG GCG GCT AAG TAC TTC AAT GGC TCT AAC ATC CAA GGT AAA GGT    3294

 A   G   Y   V   L   K   D   M   G   S   N   K   Y   F   K   V   V   S    1116
GCT GGA TAC GTA TTG AAA GAT ATG GGT TCT AAT AAG TAC TTT AAG GTC GTT TCG    3348

 N   T   E   D   G   D   Y   L   P   K   Q   L   T   N   D   L   S   E    1134
AAC ACT GAG GAT GGT GAC TAC TTA CCA AAA CAG TTA ACT AAT GAT CTG TCA GAA    3402

 T   G   Y   K   G   E   L   E   G   K   P   I   P   N   P   L   L   G    1152
ACT GGC TAC AAG GGC GAG CTT GAA GGT AAG CCT ATC CCT AAC CCT CTC CTC GGT    3456

 L   D   S   T   R   T   G   H   H   H   H   H   H                        1165
CTC GAT TCT ACG CGT ACC GGT CAT CAT CAC CAT CAC CAT                        3495
```

FIGURA 3 (final)

Secuencia de DSR-S Core ΔA

M G : marcador de tiorredoxina
H H : marcador de 6xHis
T Q : proteína de interés

```
M  G  S  D  K  I  I  H  L  T  D  D  S  F  D  T  D  V     18
ATG GGA TCT GAT AAA ATT ATT CAT CTG ACT GAT GAT TCT TTT GAT ACT GAT GTA   54

L  K  A  D  G  A  I  L  V  D  F  W  A  H  N  C  G  P     36
CTT AAG GCA GAT GGT GCA ATC CTG GTT GAT TTC TGG GCA CAC TGG TGC GGT CCG  108

C  K  M  I  A  P  I  L  D  E  I  A  D  E  Y  Q  G  K     54
TGC AAA ATG ATC GCT CCG ATT CTG GAT GAA ATC GCT GAC GAA TAT CAG GGC AAA  162

L  T  V  A  K  L  N  I  D  K  N  P  G  T  A  P  K  Y     72
CTG ACC GTT GCA AAA CTG AAC ATC GAT CAC AAC CCG GGC ACT GCG CCG AAA TAT  216

G  I  R  G  I  P  T  L  L  L  F  K  N  G  E  V  A  A     90
GGC ATC CGT GGT ATC CCG ACT CTG CTG CTG TTC AAA AAC GGT GAA GTG GCG GCA  270

T  K  V  G  A  L  S  K  G  Q  L  K  E  F  L  D  A  N    108
ACC AAA GTG GGT GCA CTG TCT AAA GGT CAG TTG AAA GAG TTC CTC GAC GCT AAC  324

L  A  G  S  G  S  G  D  D  D  D  K  L  A  L  M  G  F    126
CTG GCC GGC TCT GGA TCC GGT GAT GAC GAT GAC AAG CTC GCC CTT ATG GGC TTC  378

S  G  V  I  D  G  Q  I  M  T  F  D  Q  E  T  G  Q  E    144
TCT GGT GTG ATT GAT GGT CAA ATA ATG ACA TTT GAT CAG GAA ACA GGG CAA GAA  432

V  S  N  T  T  S  E  I  K  E  G  L  T  T  Q  N  T  D    162
GTT TCT AAC ACA ACT TCT GAA ATA AAA GAA GGT TTG ACG ACT CAA AAC ACG GAT  486

Y  S  E  H  N  A  A  H  G  T  D  A  E  D  F  E  N  I    180
TAT AGC GAA CAT AAT GCA GCC CAC GGT ACG GAT GCT GAG GAC TTT GAA AAT ATT  540

D  G  Y  L  T  A  S  S  W  Y  R  P  T  G  I  L  R  N    198
GAC GGC TAT TTA ACA GCT AGT TCA TGG TAT CGT CCA ACA GGT ATT TTA CGT AAC  594

G  T  D  W  E  P  S  T  D  T  D  F  R  P  I  L  S  V    216
GGA ACA GAC TGG GAA CCT TCT ACA GAT ACA GAT TTC AGA CCA ATA TTG TCA GTG  648

W  W  P  D  K  N  T  Q  V  N  Y  L  N  Y  M  A  D  L    234
TGG TGG CCA GAT AAG AAC ACC CAG GTC AAT TAT TTA AAT TAC ATG GCT GAT TTA  702

G  F  I  S  N  A  D  S  F  E  T  G  D  S  Q  S  L  L    252
GGG TTT ATC AGT AAT GCG GAC AGT TTT GAA ACT GGG GAT AGC CAA AGC TTA TTA  756

N  E  A  S  N  Y  V  Q  K  S  I  E  M  K  I  S  A  Q    270
AAT GAA GCA AGT AAC TAT GTT CAA AAA TCA ATT GAA ATG AAA ATT AGT GCG CAA  810

Q  S  T  E  W  L  K  D  A  N  A  A  F  I  V  A  Q  P    288
CAA AGT ACA GAG TGG TTA AAG GAT GCA ATG GCG GCC TTC ATT GTC GCG CAA CCA  864

Q  N  N  E  T  S  E  D  M  S  N  D  H  L  Q  N  G  A    306
CAG TGG AAT GAA ACT AGT GAA GAT ATG AGC AAT GAC CAT TTA CAA AAT GGC GCA  918

L  T  Y  V  N  S  P  L  T  P  D  A  N  S  N  F  R  L    324
TTA ACT TAT GTC AAC AGT CCA CTG ACA CCT GAC GCT AAT TCA AAC TTT AGA CTA  972

L  K  R  T  P  T  M  Q  T  G  E  Q  A  Y  N  L  D  N    342
CTT AAT CGG ACA CCA ACA AAC CAG ACT GGT GAA CAA GCG TAT AAT TTA GAT AAT 1026

S  K  G  G  F  E  L  L  L  A  N  D  V  D  N  S  N  P    360
TCA AAA GGT GGT TTT GAA TTG TTG TTA GCC AAT GAC GTT GAT AAT TCA AAC CCT 1080
```

FIGURA 4

```
 V   V   Q   A   E   Q   L   M   W   L   Y   Y   L   M   N   F   G   T     378
GTA GTA CAA GCA GAA CAA TTG AAT TGG TTA TAT TAT TTA ATG AAT TTT GGT ACG   1134

 I   T   A   N   D   A   D   A   N   F   D   G   I   R   V   D   A   V     396
ATT ACG GCC AAC GAC GCG GAT GCT AAT TTT GAT GGT ATT CGT GTA GAT GCA GTC   1188

 D   N   V   D   A   D   L   L   Q   I   A   A   D   Y   F   K   L   A     414
GAC AAT GTG GAT GCT GAT TTG TTA CAA ATT GCT GCC GAT TAT TTC AAA CTA GCT   1242

 Y   G   V   D   Q   N   D   A   T   A   N   Q   H   L   S   I   L   E     432
TAC GGT GTT GAT CAA AAT GAT GCT ACT GCT AAT CAG CAT CTT TCA ATT TTG GAA   1296

 D   W   S   H   H   D   P   L   Y   V   T   D   Q   G   S   M   Q   L     450
GAT TGG AGT CAC AAT GAT CCT TTG TAT GTA ACA GAT CAA GGA AGC AAT CAA TTA   1350

 T   M   D   D   Y   V   H   T   Q   L   I   W   S   L   T   E   S   S     468
ACC ATG GAT GAT TAT GTG CAC ACA CAA TTA ATC TGG TCT CTA ACA AAA TCA TCT   1404

 D   I   E   G   T   M   Q   R   F   V   D   Y   Y   M   V   D   R   S     486
GAC ATA CGA GGT ACA ATG CAG CGC TTC GTG GAT TAT TAT ATG GTG GAT CGA TCT   1458

 N   D   S   T   E   N   E   A   I   P   N   Y   S   F   V   R   A   E     504
AAT GAT AGT ACA GAA AAC GAA GCC ATT CCT AAT TAC AGC TTT GTA CGT GCA CAC   1512

 D   S   E   V   Q   T   V   I   A   Q   I   V   S   D   L   Y   P   D     522
GAC AGC GAA GTG CAA ACG GTT ATT GCC CAA ATT GTT TCC GAT TTG TAT CCT GAT   1566

 V   E   N   S   L   A   P   T   T   E   Q   L   A   A   A   F   K   V     540
GTT GAA AAT AGT TTA GCA CCA ACA ACA GAA CAA TTG GCA GCT GCT TTC AAA GTA   1620

 Y   N   E   D   E   K   L   A   D   K   K   T   T   Q   Y   N   M   A     558
TAC AAT GAA GAT GAA AAA TTA GCA GAC AAA AAG TAC ACA CAA TAT AAT ATG GCT   1674

 S   A   Y   A   N   L   L   T   W   K   D   T   V   P   E   V   Y   Y     576
AGT GCT TAT GCG ATG TTG CTA ACC AAT AAG GAT ACT GTT CCT CGT GTC TAT TAT   1728

 G   D   L   Y   T   D   D   G   Q   Y   N   A   T   K   S   P   Y   Y     594
GGC GAT TTA TAT ACA GAT GAT GGT CAA TAT ATG GCA ACA AAG TCA CCA TAC TAT   1782

 D   A   I   N   T   L   L   K   A   R   V   Q   Y   V   A   G   G   Q     612
GAT GCG ATT AAC ACT TTG CTA AAG GCT AGA GTT CAG TAT GTT GCT GGT GGC CAA   1836

 S   N   S   V   D   S   N   D   V   L   T   S   V   R   Y   G   K   D     630
TCG ATG TCC GTT GAT AGT AAT GAC GTG TTA ACA AGT GTT CGC TAT GGT AAA GAT   1890

 A   M   T   A   S   D   T   G   T   S   E   T   R   T   E   G   I   G     648
GCC ATG ACA GCT TCT GAC ACT GGA ACA TCT GAG ACG CGT ACT GAA GGT ATT GGA   1944

 V   I   V   S   N   N   A   E   L   Q   L   E   D   G   H   T   V   T     666
GTC ATC GTC AGC AAT AAC GCG GAG CTA CAA TTA GAG GAT GGG CAT ACT GTC ACA   1998

 L   H   M   G   A   A   H   K   N   Q   A   Y   R   A   L   L   S   T     684
TTG CAT ATG GGG GCA GCT CAT AAG AAC CAA GCT TAT CGT GCT TTG TTA TCA ACA   2052

 T   A   D   G   L   A   Y   Y   D   T   D   E   N   A   P   V   A   Y     702
ACT GCA GAT GGA TTA GCT TAT TAT GAT ACT GAT GAA AAT GCA CCT GTG GCG TAC   2106

 T   D   A   N   G   D   L   I   F   T   N   E   S   I   Y   G   V   Q     720
ACA GAT GCT AAC GGC GAT TTG ATT TTT ACG AAT GAA TCA ATT TAT GGT GTA CAA   2160

 N   P   Q   V   S   G   Y   L   A   V   W   V   P   V   G   A   Q   Q     738
AAT CCA CAA GTT TCT GGT TAC TTG GCA GTT TGG GTT CCG GTA GGT GCG CAA CAA   2214

 D   Q   D   A   E   T   A   S   D   T   T   T   N   T   S   D   K   V     756
GAT CAA GAT GCA GGA ACG GCC TCT GAT ACA ACA ACA AAC ACG AGT GAT AAA GTG   2268

 F   H   S   N   A   A   L   D   S   Q   V   I   Y   E   G   F   S   N     774
TTC CAT TCA AAC GCT GCT CTT GAT TCT CAA GTC ATC TAC GAA GGT TTC TCA AAC   2322

 F   Q   A   F   A   T   D   S   S   E   Y   T   N   V   V   I   A   Q     792
TTC CAA GCA TTT GCT ACA GAC AGC AGT GAA TAT ACA AAC GTA GTC ATC GCT CAG   2376
```

FIGURA 4 (continuación)

```
 N  A  D  Q  F  K  Q  W  G  V  T  S  F  Q  L  A  P  Q     810
AAT GCG GAC CAA TTT AAG CAA TGG GGT GTG ACA AGC TTC CAA TTG GCA CCA CAA   2430

 Y  R  S  S  T  D  T  S  F  L  D  S  I  I  Q  N  G  Y     828
TAT CGT TCA AGT ACA GAT ACA AGT TTC TTG GAT TCA ATT ATT CAA AAC GGG TAT   2484

 A  F  T  D  R  Y  D  L  G  Y  G  T  P  T  K  Y  G  T     846
GCA TTC ACG GAT CGT TAT GAC TTA GGT TAT GGC ACA CCG ACA AAA TAT GGA ACT   2538

 A  D  Q  L  R  D  A  I  K  A  L  H  A  S  G  I  Q  A     864
GCT GAT CAG TTG CGC GAT GCT ATT AAA GCC TTA CAT GCT AGC GGT ATT CAA GCC   2592

 I  A  D  W  V  P  D  Q  I  Y  N  L  P  E  Q  E  L  A     882
ATT GCC GAT TGG GTG CCG GAC CAA ATT TAT AAT TTG CCA GAG CAA GAA TTA GCT   2646

 T  V  T  R  T  W  S  F  G  D  D  D  T  D  S  D  I  D     900
ACT GTC ACA AGA ACA AAT TCA TTT GGA GAT GAC GAT ACA GAT TCT GAT ATT GAC   2700

 N  A  L  Y  V  V  Q  S  R  G  G  G  Q  Y  Q  E  M  Y     918
AAT GCC TTA TAT GTT GTA CAA AGT CGT GGG GGT GGT CAA TAT CAA GAG ATG TAT   2754

 G  G  A  F  L  E  H  L  Q  A  L  Y  P  S  L  F  K  V     936
GGT GGT GCC TTC TTA GAA CAC TTA CAG GCA CTC TAT CCA TCC CTA TTT AAA GTG   2808

 N  Q  I  S  T  G  V  P  I  D  G  S  V  K  I  T  E  W     954
AAT CAA ATC TCA ACT GGC GTT CCA ATT GAT GGC AGT GTA AAG ATT ACT GAG TGG   2862

 A  A  K  Y  F  N  G  S  N  I  Q  G  K  G  A  G  Y  V     972
GCG GCT AAG TAC TTC AAT GGC TCT AAC ATC CAA GGT AAA GGT GCT GGA TAC GTA   2916

 L  K  D  M  G  S  N  K  Y  F  K  V  V  S  N  T  E  D     990
TTG AAA GAT ATG GGT TCT AAT AAG TAC TTT AAG GTC GTT TCG AAC ACT GAG GAT   2970

 G  D  Y  L  P  K  Q  L  T  N  D  L  S  E  T  G  Y  K    1008
GGT GAC TAC CTA CCA AAA CAG TTA ACT AAT GAT CTG TCA GAA ACT GGC TAC AAG   3024

 G  E  L  E  G  K  P  I  P  N  P  L  L  G  L  D  S  T    1026
GGC GAG CTT GAA GGT AAG CCT ATC CCT AAC CCT CTC CTC GGT CTC GAT TCT ACG   3078

 R  T  G  H  H  H  H  H  H                               1035
CGT ACC GGT CAT CAT CAC CAT CAC CAT                        3105
```

FIGURA 4 (final)

Secuencia de DSR-S vardel 4ΔN mutante SEV663YDA

M	G : marcador de tiorredoxina	
H	H : marcador de 6xHis	H H H
T	Q : proteína de interés	
D	: aminoácido catalítico	D
E		E
YDA	: aminoácidos modificados	YDA
		- - - -
TC	: bases modificadas	TC

```
 M   G   S   D   K   I   I   H   L   T   D   D   S   F   D   T   D   V      18
ATG GGA TCT GAT AAA ATT ATT CAT CTG ACT GAT GAT TCT TTT GAT ACT GAT GTA     54

 L   K   A   D   G   A   I   L   V   D   F   W   A   H   W   C   G   P      36
CTT AAG GCA GAT GGT GCA ATC CTG GTT GAT TTC TGG GCA CAC TGG TGC GGT CCG    108

 C   K   M   I   A   P   I   L   D   E   I   A   D   E   Y   Q   G   K      54
TGC AAA ATG ATC GCT CCG ATT CTG GAT GAA ATC GCT GAC GAA TAT CAG GGC AAA    162

 L   T   V   A   K   L   N   I   D   H   N   P   G   T   A   P   K   Y      72
CTG ACC GTT GCA AAA CTG AAC ATC GAT CAC AAC CCG GGC ACT GCG CCG AAA TAT    216

 G   I   R   G   I   P   T   L   L   L   F   K   N   G   S   V   A   A      90
GGC ATC CGT GGT ATC CCG ACT CTG CTG CTG TTC AAA AAC GGT GAA GTG GCG GCA    270

 T   K   V   G   A   L   S   K   G   Q   L   K   E   F   L   D   A   N     108
ACC AAA GTG GGT GCA CTG TCT AAA GGT CAG TTG AAA GAG TTC CTC GAC GCT AAC    324

 L   A   G   S   G   S   G   D   D   D   D   K   L   A   L   M   T   Q     126
CTG GCC GGC TCT GGA TCC GGT GAT GAC GAT GAC AAG CTC GCC CTT ATG ACA CAA    378

 Q   V   S   G   K   Y   V   E   K   D   G   S   W   Y   Y   Y   F   D     144
CAA GTT AGC GGC AAG TAC GTT GAA AAA GAC GGT AGT TGG TAT TAT TAT TTT GAT    432

 D   G   K   N   A   K   G   L   S   T   I   D   N   N   I   Q   Y   F     162
GAT GGC AAA AAT GCT AAA GGT TTA TCA ACG ATA GAC AAC AAT ATT CAA TAT TTT    486

 Y   E   S   G   K   Q   A   K   G   Q   Y   V   T   I   D   N   Q   T     180
TAC GAG AGT GGT AAA CAA GCC AAA GGA CAG TAT GTC ACA ATT GAT AAT CAA ACA    540

 Y   Y   F   D   K   G   S   G   D   E   L   T   G   L   Q   S   I   D     198
TAT TAT TTT GAT AAG GGC TCA GGT GAT GAG TTA ACT GGT CTG CAA AGC ATT GAT    594

 G   N   I   V   A   F   N   D   E   G   Q   Q   I   F   N   Q   Y   Y     216
GGG AAC ATA GTT GCT TTT AAC GAT GAA GGG CAA CAA ATT TTT AAT CAA TAT TAC    648

 Q   S   E   N   G   T   T   Y   Y   F   D   D   K   G   H   A   A   T     234
CAA TCT GAA AAT GGT ACA ACA TAC TAC TTT GAT GAT AAA GGA CAC GCT GCT ACC    702

 G   I   K   N   I   E   G   K   N   Y   Y   F   D   N   L   G   Q   L     252
GGT ATT AAG AAT ATC GAG GGC AAA AAT TAT TAT TTT GAT AAT CTT GGG CAA CTA    756

 K   K   G   F   S   G   V   I   D   G   Q   I   M   T   F   D   Q   E     270
AAA AAA GGC TTC TCT GGT GTG ATT GAT GGT CAA ATA ATG ACA TTT GAT CAG GAA    810

 T   G   Q   E   V   S   N   T   T   S   E   I   K   E   G   L   T   T     288
ACA GGG CAA GAA GTT TCT AAC ACA ACT TCT GAA ATA AAA GAA GGT TTG ACG ACT    864

 Q   N   T   D   Y   S   E   H   N   A   A   H   G   T   D   A   E   D     306
CAA AAC ACG GAT TAT AGC GAA CAT AAT GCA GCC CAC GGT ACG GAT GCT GAG GAC    918

 F   E   N   I   D   G   Y   L   T   A   S   S   W   Y   R   F   T   G     324
TTT GAA AAT ATT GAC GGC TAT TTA ACA GCT AGT TCA TGG TAT CGT CCA ACA GGT    972

 I   L   R   N   G   T   D   W   E   P   S   T   D   T   D   F   R   P     342
ATT TTA CGT AAC GGA ACA GAC TGG GAA CCT TCT ACA GAT ACA GAT TTC AGA CCA   1026
```

FIGURA 5

```
I   L   S   V   W   W   P   D   K   N   T   Q   V   N   Y   L   N   Y     360
ATA TTG TCA GTG TGG TGG CCA GAT AAG AAC ACC CAG GTC AAT TAT TTA AAT TAC   1080

M   A   D   L   G   F   I   S   N   A   D   S   F   E   T   G   D   S     378
ATG GCT GAT TTA GGG TTT ATC AGT AAT GCG GAC AGT TTT GAA ACT GGG GAT AGC   1134

Q   S   L   L   N   E   A   S   N   Y   V   Q   K   S   I   E   N   K     396
CAA AGC TTA TTA AAT GAA GCA AGT AAC TAT GTT CAA AAA TCA ATT GAA ATG AAA   1188

I   S   A   Q   Q   S   T   E   N   L   K   D   A   M   A   A   F   I     414
ATT AGT GCG CAA CAA AGT ACA GAG TGG TTA AAG GAT GCA ATG GCG GCC TTC ATT   1242

V   A   Q   P   Q   N   N   E   T   S   E   D   M   S   N   D   H   L     432
GTC GCG CAA CCA CAG TGG AAT GAA ACT AGT GAA GAT ATG AGC AAT GAC CAT TTA   1296

Q   N   G   A   L   T   Y   V   N   S   P   L   T   P   D   A   N   S     450
CAA AAT GGC GCA TTA ACT TAT GTC AAC AGT CCA CTG ACA CCT GAC GCT AAT TCA   1350

N   F   R   L   L   N   R   T   P   T   N   Q   T   G   E   Q   A   Y     468
AAC TTT AGA CTA CTT AAT CGG ACA CCA ACA AAC CAG ACT GGT GAA CAA GCG TAT   1404

N   L   D   N   S   K   G   G   F   E   L   L   L   A   N   D   V   D     486
AAT TTA GAT AAT TCA AAA GGT GGT TTT GAA TTG TTG TTA GCC AAT GAC GTT GAT   1458

N   S   N   P   V   V   Q   A   E   Q   L   W   W   L   Y   Y   L   M     504
AAT TCA AAC CCT GTA GTA CAA GCA GAA CAA TTG AAT TGG TTA TAT TAT TTA ATG   1512

N   F   G   T   I   T   A   M   D   A   D   A   N   F   D   G   I   R     522
AAT TTT GGT ACG ATT ACG GCC AAC GAC GCG GAT GCT AAT TTT GAT GGT ATT CGT   1566

V   D   A   V   D   N   V   D   A   D   L   L   Q   I   A   A   D   Y     540
GTA GAT GCA GTC GAC AAT GTG GAT GCT GAT TTG TTA CAA ATT GCT GCC GAT TAT   1620

F   K   L   A   Y   G   V   D   Q   N   D   A   T   A   N   Q   H   L     558
TTC AAA CTA GCT TAC GGT GTT GAT CAA AAT GAT GCT ACT GCT AAT CAG CAT CTT   1674

S   I   L   E   D   N   S   N   N   D   P   L   Y   V   T   D   Q   G     576
TCA ATT TTG GAA GAT TGG AGT CAC AAT GAT CCT TTG TAT GTA ACA GAT CAA GGA   1728

S   N   Q   L   T   M   D   D   Y   V   H   T   Q   L   I   W   S   L     594
AGC AAT CAA TTA ACC ATG GAT GAT TAT GTG CAC ACA CAA TTA ATC TGG TCT CTA   1782

T   K   S   S   D   I   R   G   T   M   Q   R   F   V   D   Y   Y   M     612
ACA AAA TCA TCT GAC ATA CGA GGT ACA ATG CAG CGC TTC GTG GAT TAT TAT ATG   1836

V   D   R   S   N   D   S   T   E   N   E   A   I   P   M   Y   S   F     630
GTG GAT CGA TCT AAT GAT AGT ACA GAA AAC GAA GCC ATT CCT AAT TAC AGC TTT   1890

V   R   A   S   D   Y   D   A   Q   T   V   I   A   Q   I   V   S   D     648
GTA CGA GCT CAC GAC TAC GAC GCG CAA ACG GTT ATT GCC CAA ATT GTT TCC GAT   1944

L   Y   P   D   V   E   N   S   L   A   F   T   T   E   Q   L   A   A     666
TTG TAT CCT GAT GTT GAA AAT AGT TTA GCA CCA ACA ACA GAA CAA TTG GCA GCT   1998

A   F   K   V   Y   N   E   D   E   K   L   A   D   K   K   Y   T   Q     684
GCT TTC AAA GTA TAC AAT GAA GAT GAA AAA TTA GCA GAC AAA AAG TAC ACA CAA   2052

Y   N   M   A   S   A   Y   A   M   L   L   T   N   K   D   T   V   P     702
TAT AAT ATG GCT AGT GCT TAT GCG ATG TTG CTA ACC AAT AAG GAT ACT GTT CCT   2106

R   V   Y   Y   G   D   L   Y   T   D   D   G   Q   Y   M   A   T   K     720
CGT GTC TAT TAT GGC GAT TTA TAT ACA GAT GAT GGT CAA TAT ATG GCA ACA AAG   2160

S   P   Y   Y   D   A   I   N   T   L   L   K   A   R   V   Q   Y   V     738
TCA CCA TAC TAT GAT GCG ATT AAC ACT TTG CTA AAG GCT AGA GTT CAG TAT GTT   2214

A   G   G   Q   S   M   S   V   D   S   N   D   V   L   T   S   V   R     756
GCT GGT GGC CAA TCG ATG TCC GTT GAT AGT AAT GAC GTG TTA ACA AGT GTT CGC   2268

Y   G   K   D   A   N   T   A   S   D   T   G   T   S   E   T   R   T     774
TAT GGT AAA GAT GCC ATG ACA GCT TCT GAC ACT GGA ACA TCT GAG ACG CGT ACT   2322
```

FIGURA 5 (continuación)

```
E   G   I   G   V   I   V   S   N   N   A   E   L   Q   L   E   D   G     792
GAA GGT ATT GGA GTC ATC GTC AGC AAT AAC GCG GAG CTA CAA TTA GAG GAT GGG   2376

H   T   V   T   L   H   M   G   A   A   H   K   N   Q   A   Y   R   A     810
CAT ACT GTC ACA TTG CAT ATG GGG GCA GCT CAT AAG AAC CAA GCT TAT CGT GCT   2430

L   L   S   T   T   A   D   G   L   A   Y   Y   D   T   D   E   N   A     828
TTG TTA TCA ACA ACT GCA GAT GGA TTA GCT TAT TAT GAT ACT GAT GAA AAT GCA   2484

P   V   A   Y   T   D   A   N   G   D   L   I   F   T   N   E   S   I     846
CCT GTG GCG TAC ACA GAT GCT AAC GGC GAT TTG ATT TTT ACG AAT GAA TCA ATT   2538

Y   G   V   Q   N   P   Q   V   S   G   Y   L   A   V   W   V   F   V     864
TAT GGT GTA CAA AAT CCA CAA GTT TCT GGT TAC TTG GCA GTT TGG GTT CCG GTA   2592

G   A   Q   Q   D   Q   D   A   R   T   A   S   D   T   T   T   N   T     882
GGT GCG CAA CAA GAT CAA GAT GCA CGA ACG GCC TCT GAT ACA ACA ACA AAC ACG   2646

S   D   K   V   F   K   S   N   A   A   L   D   S   Q   V   I   Y   E     900
AGT GAT AAA GTG TTC CAT TCA AAC GCT GCT CTT GAT TCT CAA GTC ATC TAC GAA   2700

G   F   S   N   F   Q   A   F   A   T   D   S   S   E   Y   T   N   V     918
GGT TTC TCA AAC TTC CAA GCA TTT GCT ACA GAC AGC AGT GAA TAT ACA AAC GTA   2754

V   I   A   Q   N   A   D   Q   F   K   Q   W   G   V   T   S   F   Q     936
GTC ATC GCT CAG AAT GCG GAC CAA TTT AAG CAA TGG GGT GTG ACA AGC TTC CAA   2808

L   A   P   Q   Y   R   S   S   T   D   T   S   F   L   D   S   I   I     954
TTG GCA CCA CAA TAT CGT TCA AGT ACA GAT ACA AGT TTC TTG GAT TCA ATT ATT   2862

Q   N   G   Y   A   F   T   D   R   Y   D   L   G   Y   G   T   P   T     972
CAA AAC GGG TAT GCA TTC ACG GAT CGT TAT GAC TTA GGT TAT GGC ACA CCG ACA   2916

K   Y   G   T   A   D   Q   L   R   D   A   I   K   A   L   K   A   S     990
AAA TAT GGA ACT GCT GAT CAG TTG CGC GAT GCT ATT AAA GCC TTA CAT GCT AGC   2970

G   I   Q   A   I   A   D   W   V   P   D   Q   I   Y   N   L   P   E     1008
GGT ATT CAA GCC ATT GCC GAT TGG GTG CCG GAC CAA ATT TAT AAT TTG CCA GAG   3024

Q   E   L   A   T   V   T   R   T   N   S   F   G   D   D   D   T   D     1026
CAA GAA TTA GCT ACT GTC ACA AGA ACA AAT TCA TTT GGA GAT GAC GAT ACA GAT   3078

S   D   I   D   N   A   L   Y   V   V   Q   S   R   G   G   G   Q   Y     1044
TCT GAT ATT GAC AAT GCC TTA TAT GTT GTA CAA AGT CGT GGG GGT GGT CAA TAT   3132

Q   H   M   Y   G   G   A   F   L   E   E   L   Q   A   L   Y   P   S     1062
CAA GAG ATG TAT GGT GGT GCC TTC TTA GAA GAG TTA CAG GCA CTC TAT CCA TCC   3186

L   F   K   V   N   Q   I   S   T   G   V   P   I   D   G   S   V   K     1080
CTA TTT AAA GTG AAT CAA ATC TCA ACT GGC GTT CCA ATT GAT GGC AGT GTA AAG   3240

I   T   E   W   A   A   K   Y   F   N   G   S   N   I   Q   G   K   G     1098
ATT ACT GAG TGG GCG GCT AAG TAC TTC AAT GGC TCT AAC ATC CAA GGT AAA GGT   3294

A   G   Y   V   L   K   D   N   G   S   N   K   Y   F   K   V   V   S     1116
GCT GGA TAC GTA TTG AAA GAT ATG GGT TCT AAT AAG TAC TTT AAG GTC GTT TCG   3348

N   T   E   D   G   D   Y   L   P   K   Q   L   T   N   D   L   S   E     1134
AAC ACT GAG GAT GGT GAC TAC TTA CCA AAA CAG TTA ACT AAT GAT CTG TCA GAA   3402

T   G   F   T   H   D   D   K   G   I   I   Y   Y   T   L   S   G   Y     1152
ACT GGC TTT ACA CAC GAT GAT AAA GGA ATC ATC TAT TAT ACA TTA AGT GGT TAT   3456

R   A   Q   N   A   F   I   Q   D   D   D   N   N   Y   Y   Y   F   D     1170
CGT GCC CAA AAT GCA TTT ATT CAA GAT GAT GAT AAT AAC TAT TAC TAT TTT GAT   3510

K   T   G   H   L   V   T   G   L   Q   K   I   N   N   H   T   Y   F     1188
AAA ACA GGT CAT TTA GTA ACA GGT TTG CAA AAG ATT AAT AAC CAT ACC TAC TTC   3564

F   L   P   N   G   I   E   L   V   K   S   F   L   Q   N   E   D   G     1206
TTC TTA CCT AAT GGT ATC GAA CTG GTC AAG AGC TTC TTA CAA AAC GAA GAT GGT   3618
```

FIGURA 5 (continuación)

```
T   I   V   Y   F   D   K   K   G   H   Q   V   F   D   Q   Y   I   T     1224
ACA ATT GTT TAT TTC GAT AAG AAA GGT CAT CAA GTT TTT GAT CAA TAT ATA ACT   3672

D   Q   N   G   M   A   Y   Y   F   D   D   A   G   V   M   L   K   S     1242
GAT CAA AAT GGA AAT GCG TAT TAC TTT GAT GAT GCT GGT GTA ATG CTT AAA TCA   3726

G   L   A   T   I   D   G   H   Q   Q   Y   F   D   Q   N   G   V   Q     1260
GGG CTT GCA ACG ATT GAT GGA CAT CAA CAG TAT TTT GAT CAA AAT GGT GTG CAG   3780

V   K   D   K   F   V   I   G   T   D   G   Y   K   Y   Y   F   E   P     1278
GTT AAG GAT AAG TTT GTG ATT GGC ACT GAT GGT TAT AAG TAT TAC TTT GAA CCA   3834

G   S   G   N   L   A   I   L   R   Y   V   Q   N   S   K   N   Q   W     1296
GGT AGT GGT AAC TTA GCT ATC CTA CGT TAT GTG CAA AAT AGT AAG AAT CAA TGG   3888

F   Y   F   D   G   N   G   H   A   V   T   G   F   Q   T   I   N   G     1314
TTC TAT TTT GAT GGT AAT GGC CAT GCT GTC ACT GGT TTC CAA ACA ATT AAT GGT   3942

K   K   Q   Y   F   Y   N   D   G   H   Q   S   K   G   E   F   I   D     1332
AAA AAA CAA TAT TTC TAT AAT GAT GGT CAT CAA AGT AAA GGT GAA TTC ATT GAT   3996

A   D   G   D   T   F   Y   T   S   A   T   D   G   R   L   V   T   G     1350
GCA GAC GGG GAT ACT TTC TAT ACG AGT GCC ACT GAT GGT CGC CTA GTA ACT GGT   4050

V   Q   K   I   N   G   I   T   Y   A   F   D   N   T   G   N   L   I     1368
GTT CAG AAG ATT AAT GGT ATT ACC TAT GCT TTT GAT AAC ACA GGA AAT TTG ATC   4104

T   N   Q   Y   Y   Q   L   A   D   G   K   Y   M   L   L   D   D   S     1386
ACA AAT CAG TAT TAT CAA TTA GCA GAT GGT AAA TAT ATG TTG TTA GAT GAT AGT   4158

G   R   A   K   T   G   F   V   L   Q   D   G   V   L   R   T   F   D     1404
GGT CGT GCG AAA ACA GGG TTT GTA TTG CAA GAT GGT GTA CTA AGA TAC TTC GAT   4212

Q   N   G   E   Q   V   K   D   A   I   I   V   D   P   D   T   N   L     1422
CAA AAC GGT GAG CAA GTG AAA GAT GCT ATC ATT GTG GAT CCA GAT ACT AAC TTG   4266

S   Y   K   G   E   L   E   G   K   P   I   P   N   P   L   L   G   L     1440
AGT TAC AAG GGC GAG CTT GAA GGT AAG CCT ATC CCT AAC CCT CTC CTC GGT CTC   4320

D   S   T   R   T   G   H   H   H   H   H   H                             1452
GAT TCT ACG CGT ACC GGT CAT CAT CAC CAT CAC CAT                           4356
```

FIGURA 5 (final)

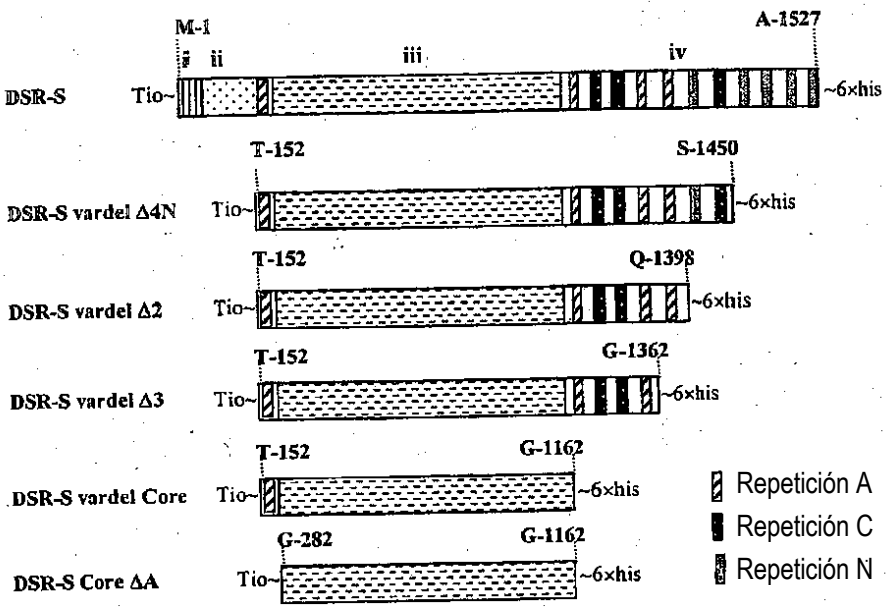
M-1
A-1527
i
ii
iii
iv
DSR-S
Tio~
~6×his
T-152
S-1450
DSR-S vardel Δ4N
Tio~
~6×his
T-152
Q-1398
DSR-S vardel Δ2
Tio~
~6×his
T-152
G-1362
DSR-S vardel Δ3
Tio~
~6×his
T-152
G-1162
DSR-S vardel Core
Tio~
~6×his
G-282
G-1162
DSR-S Core ΔA
Tio~
~6×his
Repetición A
Repetición C
Repetición N

FIGURA 6

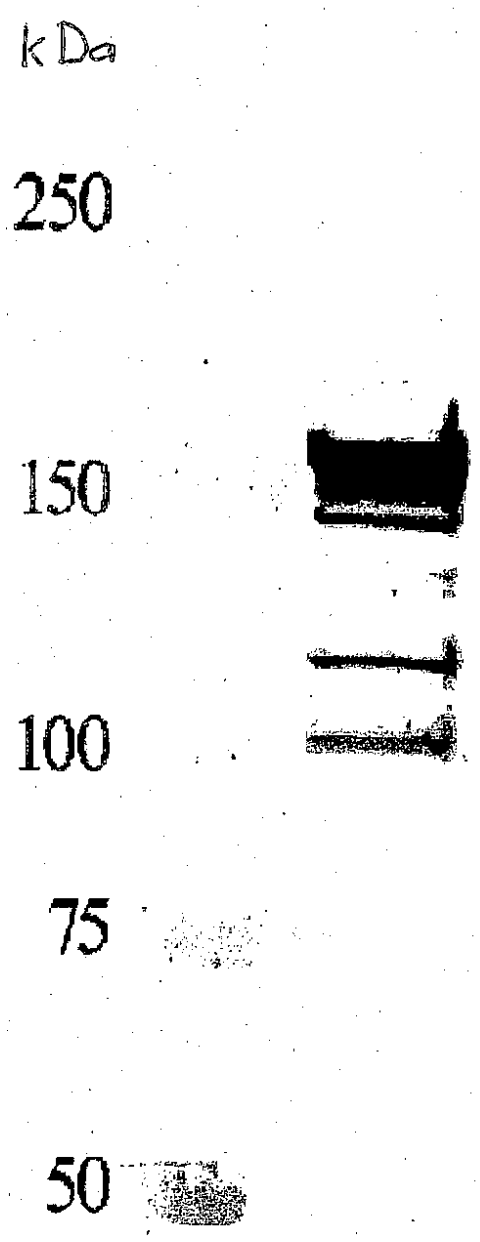

FIGURA 7A

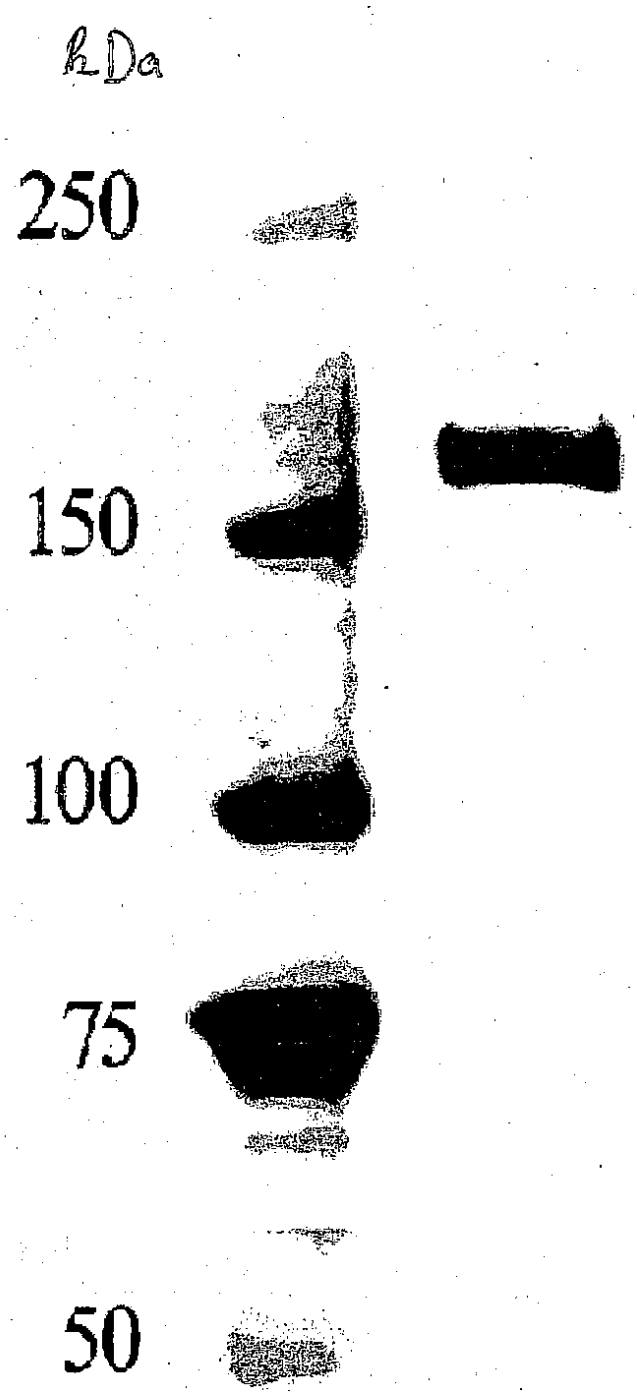

FIGURA 7B

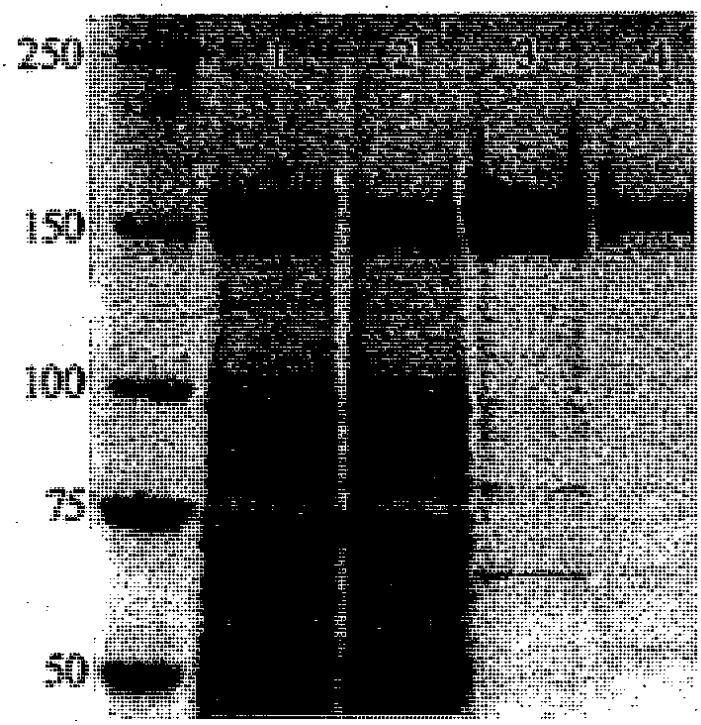

FIGURA 8

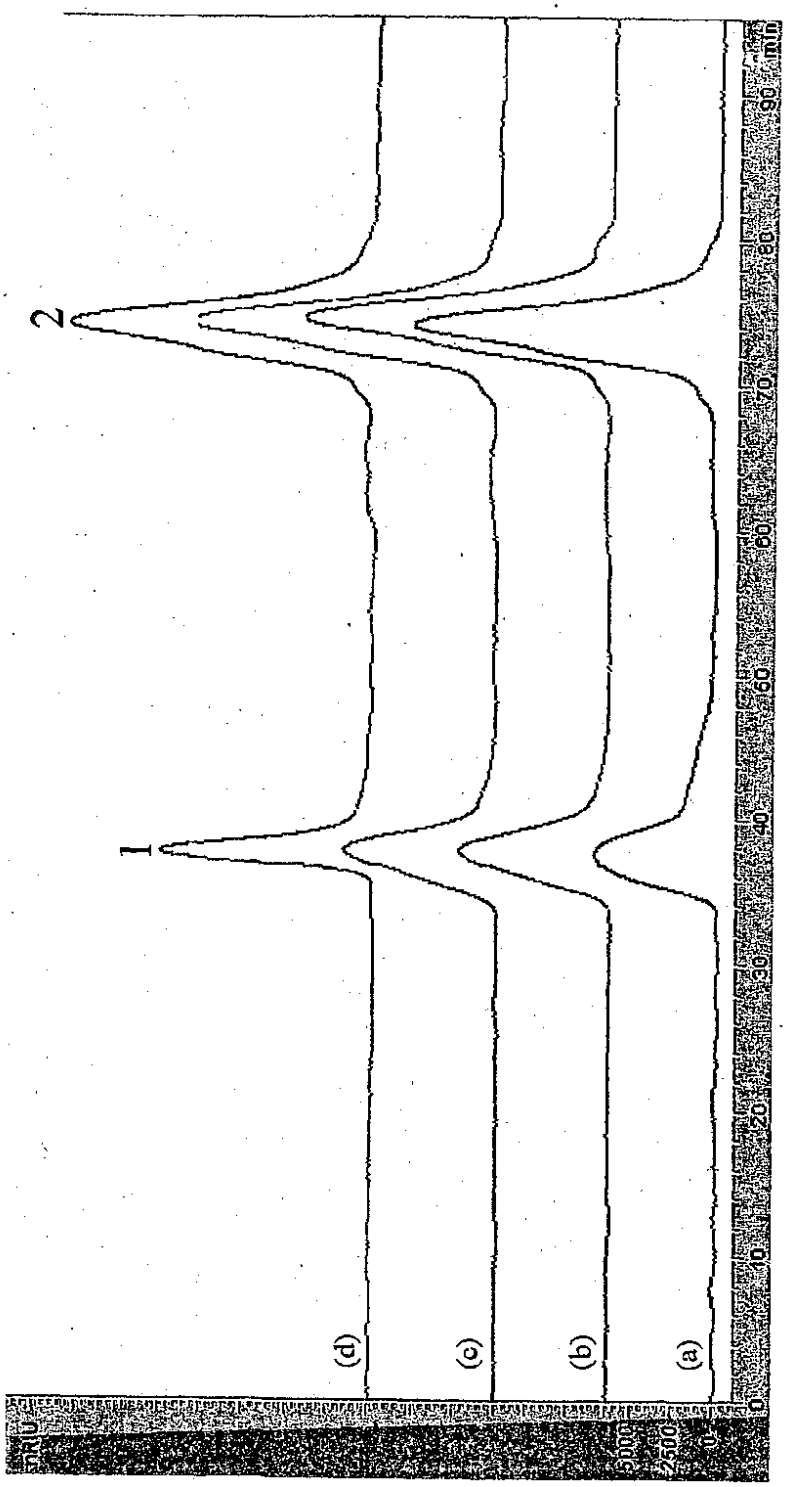

FIGURA 9

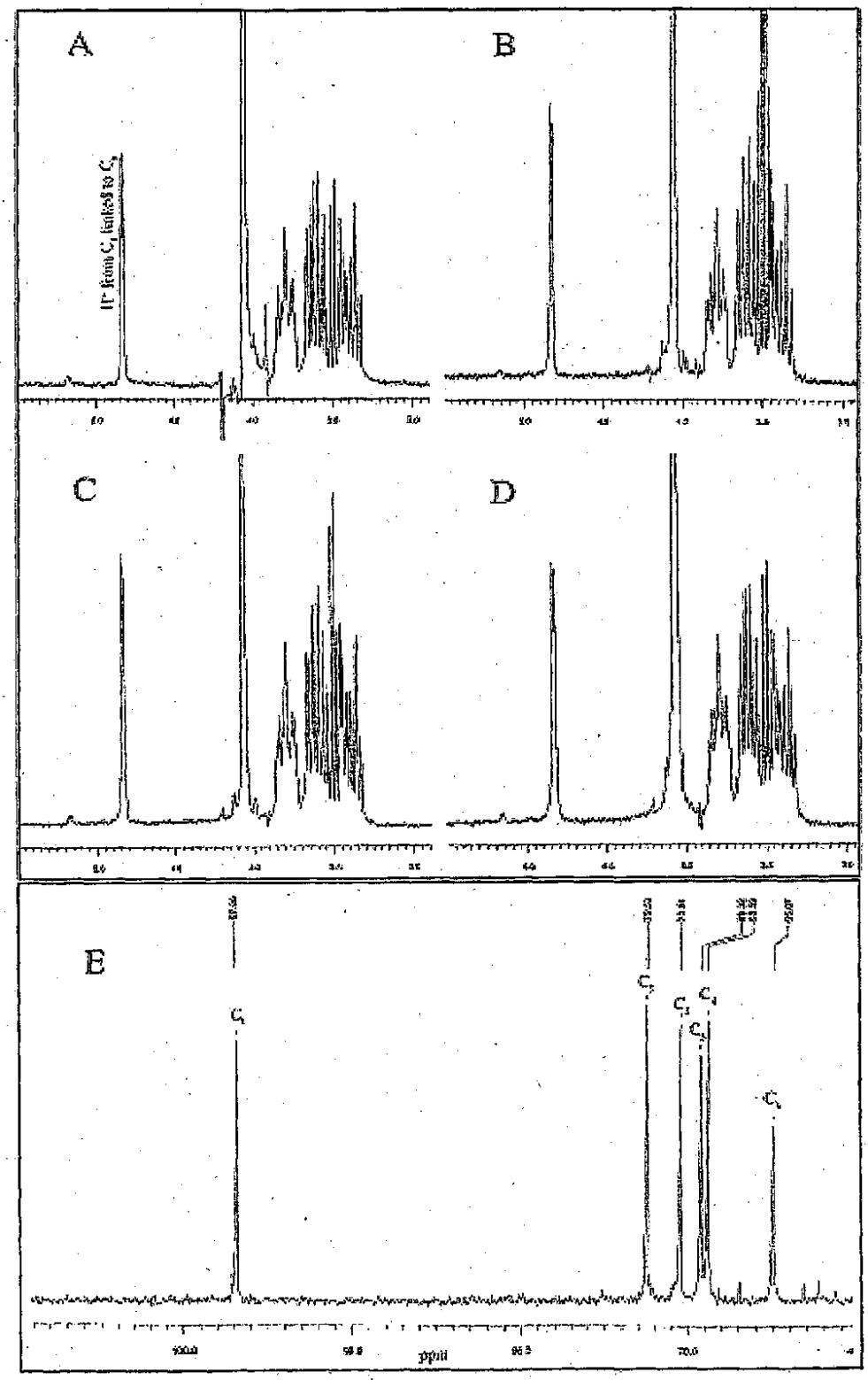

FIGURA 10

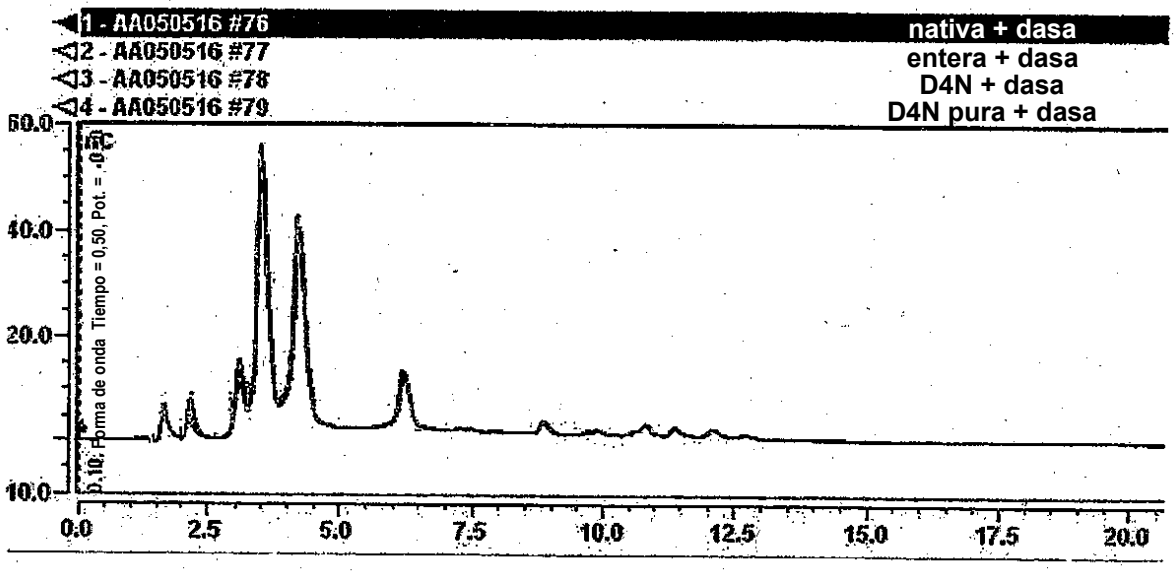
1 - AA050516 #76
2 - AA050516 #77
3 - AA050516 #78
4 - AA050516 #79
nativa + dasa
entera + dasa
D4N + dasa
D4N pura + dasa
50.0
40.0
20.0
10.0
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
15.0
17.5
20.0

FIGURA 11

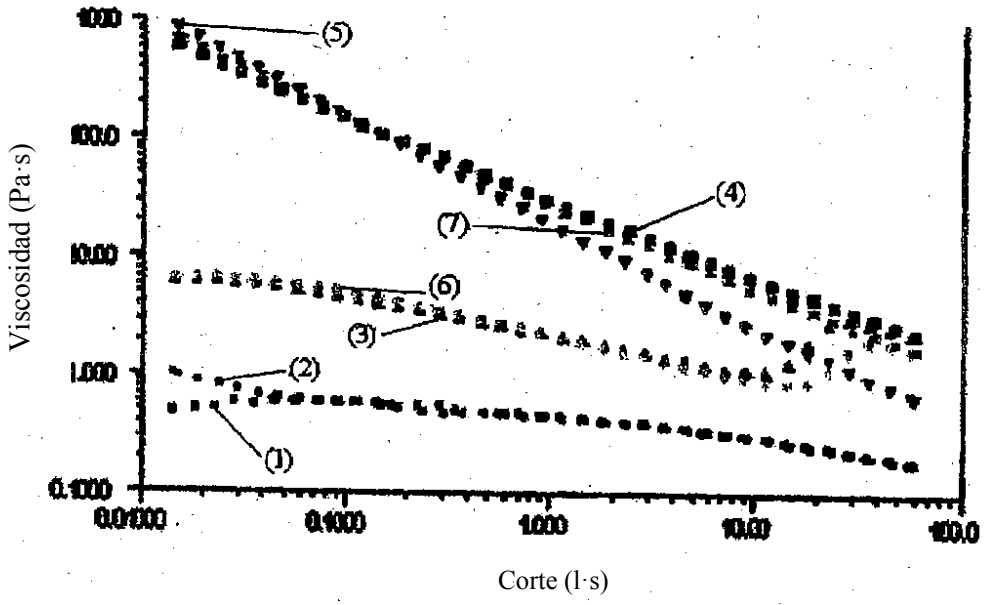
1000
100.0
10.00
1.000
0.1000
0.01000
0.1000
1.000
10.00
100.0
Viscosidad (Pa·s)
Corte (l·s)
(1)
(2)
(3)
(4)
(5)
(6)
(7)

FIGURA 12A

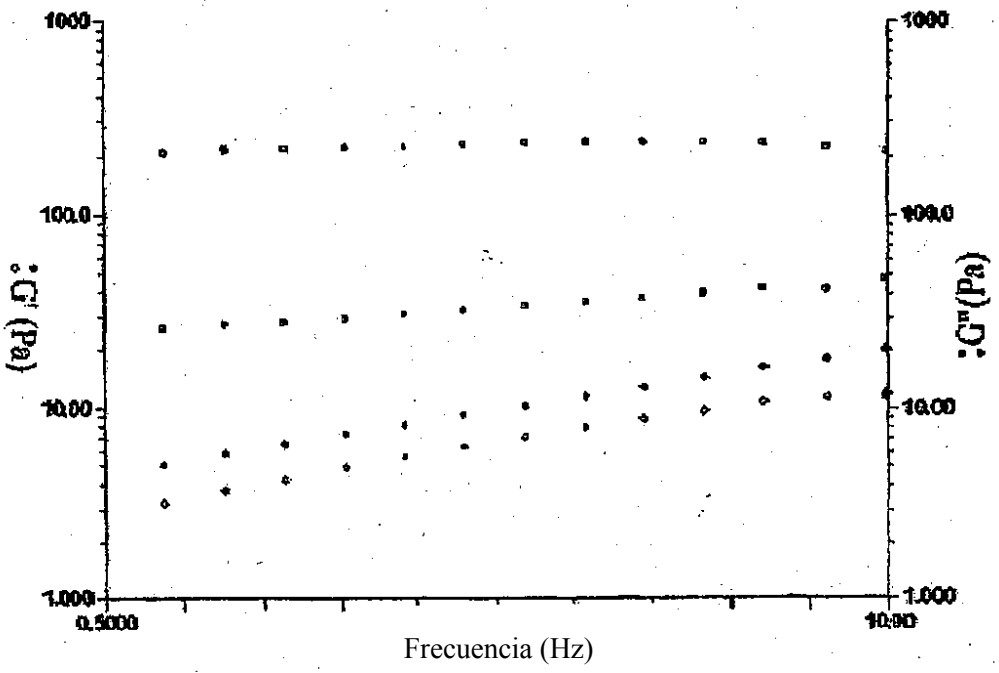

FIGURA 12B

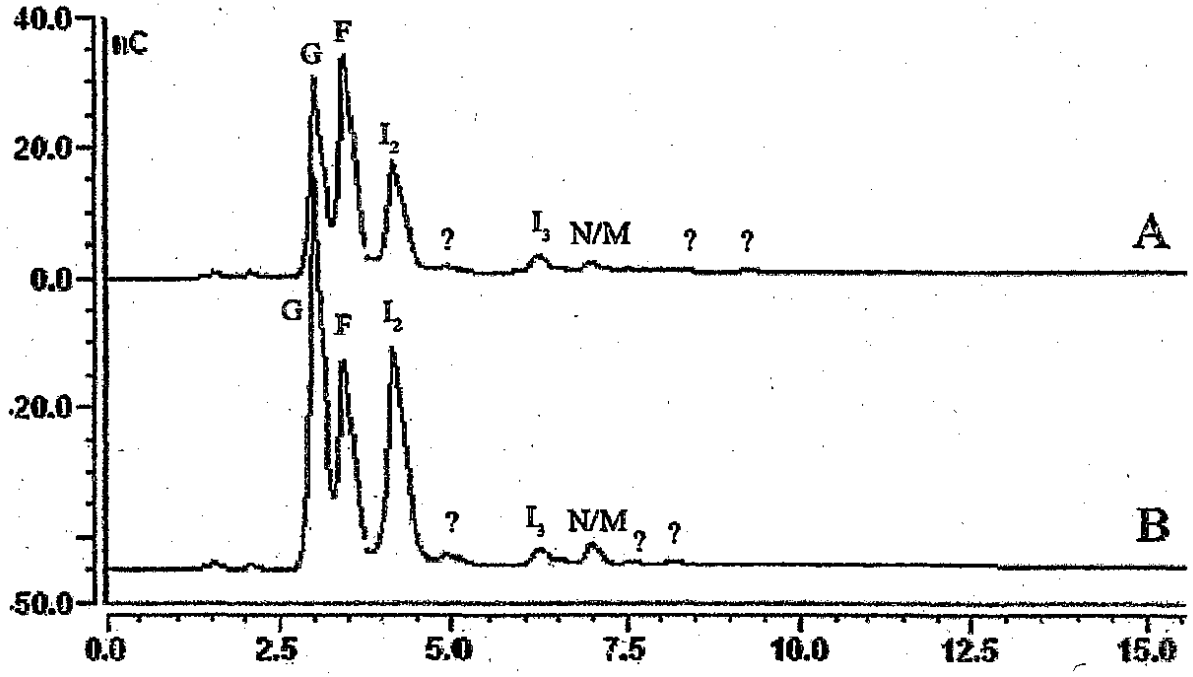
40.0
20.0
0.0
-20.0
-50.0
nC
G
F
I_2
?
I_3
N/M
?
?
A
G
F
I_2
?
I_3
N/M
?
?
B
0.0
2.5
5.0
7.5
10.0
12.5
15.0

FIGURA 13

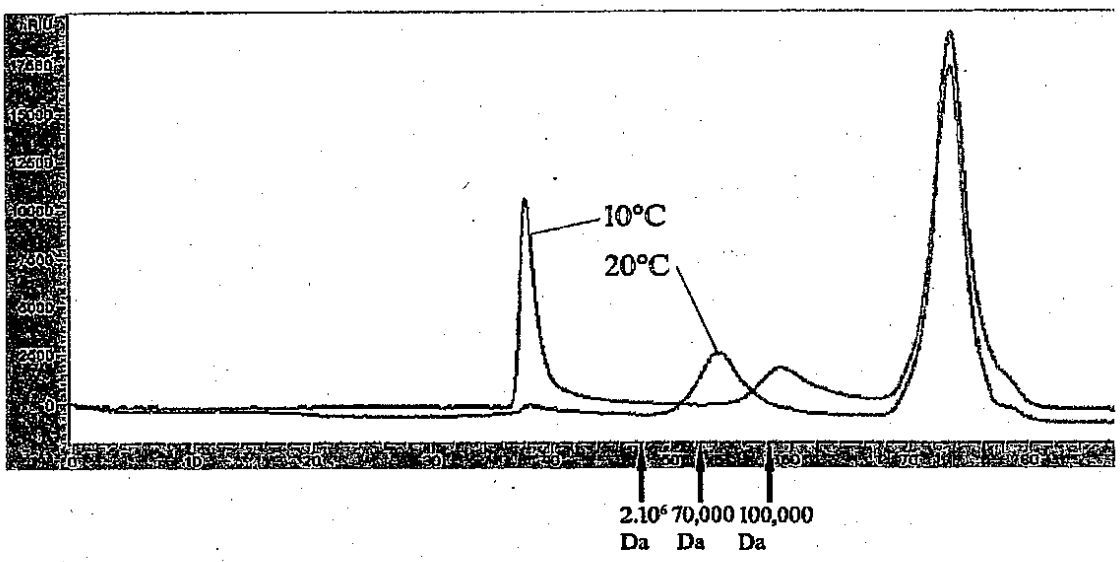

FIGURA 14

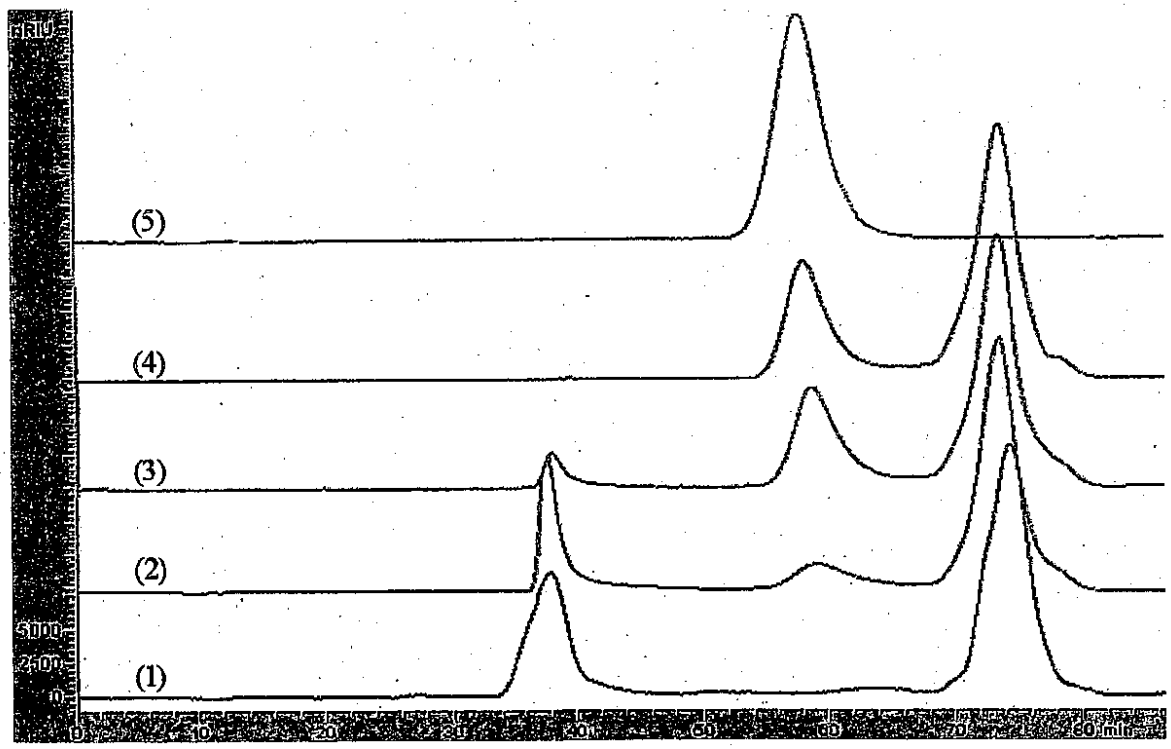

FIGURA 15

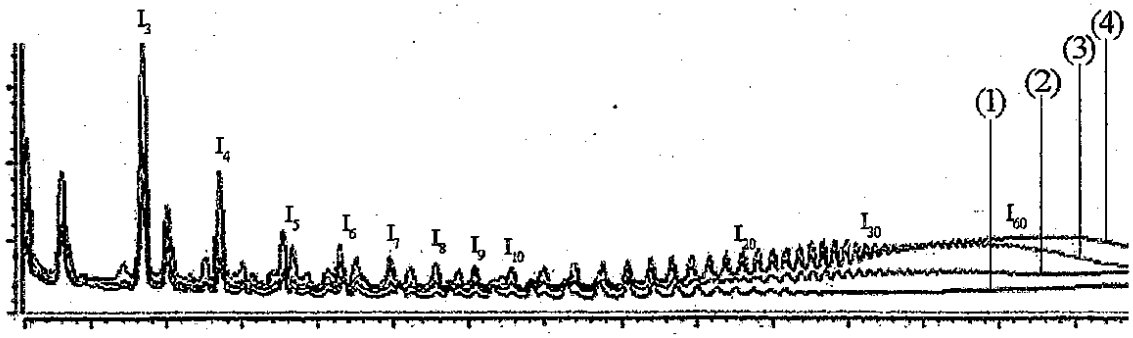

FIGURA 16

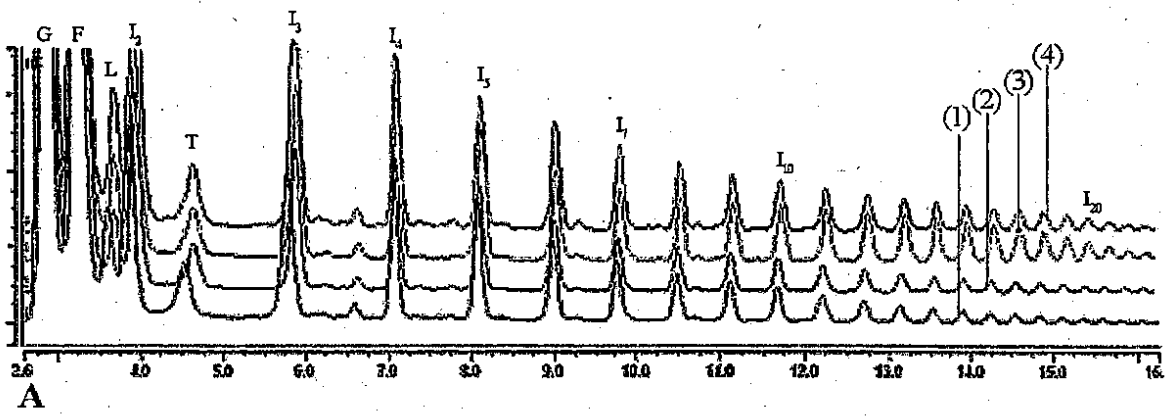

FIGURA 17A

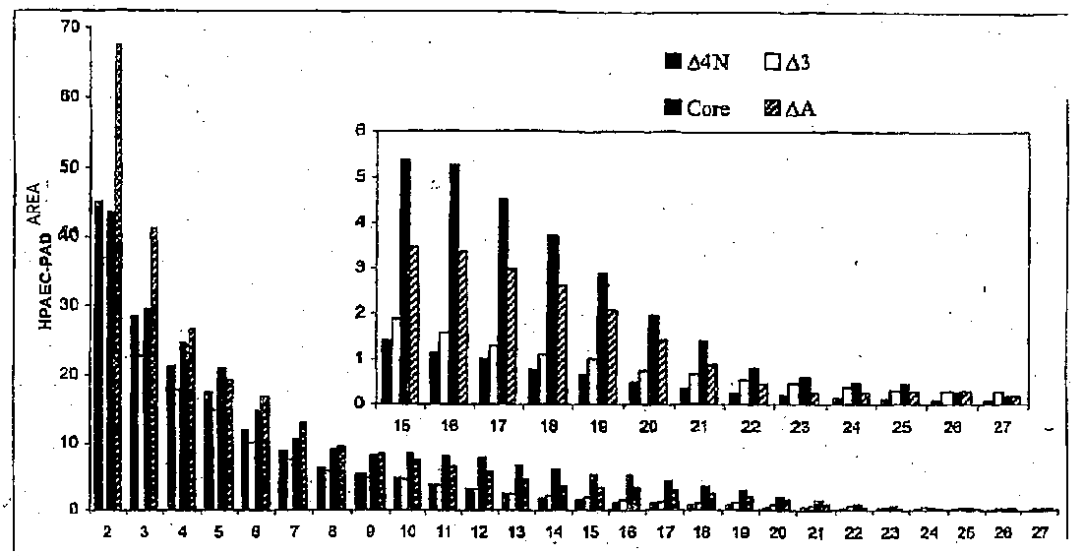

FIGURA 17B