

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 388**

51 Int. Cl.:

C12N 9/10 (2006.01)
C12P 19/08 (2006.01)
A61K 8/73 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)
C08B 37/02 (2006.01)
C08L 5/02 (2006.01)
A23L 29/269 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.06.2015 PCT/EP2015/063864**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2015 WO15193492**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2015 E 15732192 (8)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3158062**

54 Título: **Dextranos que tienen una masa molar muy alta**

30 Prioridad:

20.06.2014 FR 1455751

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.03.2020

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES
 APPLIQUÉES DE TOULOUSE (20.0%)
 135 avenue de Ranguéil
 31077 Toulouse Cedex 4, FR;
 INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
 AGRONOMIQUE (20.0%);
 CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
 SCIENTIFIQUE (20.0%);
 UNIVERSITÉ DE BORDEAUX (20.0%) y
 INSTITUT POLYTECHNIQUE DE BORDEAUX
 (20.0%)**

72 Inventor/es:

**VUILLEMIN, MARLÈNE;
 CLAVERIE, MARION;
 MOULIS, CLAIRE;
 REMAUD-SIMEON, MAGALI;
 GRIMAUD, FLORENT;
 MONSAN, PIERRE;
 SABATE, AGNÈS;
 GARNIER, CATHERINE;
 DOLS-LAFARGUE, MARGUERITE y
 LUCAS, PATRICK**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
 Bemerkungen) en el folleto original publicado por
 la Oficina Europea de Patentes**

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).

ES 2 748 388 T3

DESCRIPCIÓN

Dextranos que tienen una masa molar muy alta

5 **Sector de la técnica**

El objeto de la invención son dextranos que tienen una masa molar muy alta, al mismo tiempo que tienen un índice de dispersión bajo.

10 **Estado de la técnica**

Salvo que se indique lo contrario, en la presente invención, por "masa molar" o "masas molares promedio" se entiende que es la masa molar promedio en peso.

15 La invención también se refiere a una dextransacarasa que permite fabricar dichos dextranos, y a un procedimiento de fabricación de dichos dextranos.

20 Las glucansacaratas de origen bacteriano son transglucosilasas que pertenecen a las familias 13 y 70 de las glucosidohidrolasas. A partir de sacarosa, estas enzimas catalizan la síntesis de α -glucanos formados por de unidades de glucosilo. También pueden sintetizar oligosacáridos o glucoconjugados por reacción de transglucosilación en aceptores exógenos de diversa naturaleza. Las glucansacaratas tienen diferentes especificidades de productos, tanto a nivel de enlaces osídicos sintetizados (α -1,2; α -1,3; α -1,4 o α -1,6) como de la organización de estos enlaces en los productos formados.

25 De manera general, las bacterias lácticas, por ejemplo de los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* o *Weissela* sp., producen glucansacaratas.

30 Entre las glucansacaratas, las dextransacaratas producen dextrano, que generalmente tienen al menos un 50 % de enlaces osídicos α -1,6 en la cadena principal y ramificaciones en α -1,2, α -1,3 y/o α -1,4. El índice de ramificación y su disposición espacial varían según la enzima productora.

Los dextranos y derivados de dextrano tienen un número creciente de aplicaciones industriales, dependiendo de su tamaño.

35 Los dextranos de masa molar baja o media (que generalmente varía de 10^3 a $7 \cdot 10^4$ g mol⁻¹) se utilizan principalmente para aplicaciones analíticas, por ejemplo, como soportes de cromatografía versátiles, en el campo de la medicina, por ejemplo, como un extensor de plasma sanguíneo gracias a su baja antigenicidad y baja viscosidad en solución salina, transportador de hierro o anticoagulante (después de la funcionalización), en la prevención de complicaciones postoperatorias, en el tratamiento de quemaduras o en la reducción del riesgo de trombosis o embolia.

40 La cepa NRRL B-512F de *Leuconostoc mesenteroides*, es uno de los microorganismos que más se han utilizado durante muchos años para la producción industrial de dextranos. Esta cepa permite obtener dextranos de masa molar muy alta, que varía de 10^6 a más de 10^8 g.mol⁻¹. La enzima responsable de esta síntesis es la dextransacarasa denominada DSR-S. Este homopolímero de glucosa presenta 95 % de enlaces glucosídicos α -1,6 y 5 % de enlaces glucosídicos α -1,3 (1). Sin embargo, los dextranos producidos por la cepa NRRL B-512F de *Leuconostoc mesenteroides*, son muy polidispersos y tienen un comportamiento reológico y, principalmente, un poder viscosificante, que limita su uso como agente texturizante.

50 El gen que codifica la DSR-S ha podido clonarse en *Escherichia coli* (1,2), permitiendo la construcción de diferentes variantes de DSR-S. Principalmente, formas truncadas a nivel de los dominios N y C terminal de DSR-S sintetizan, directamente a partir de sacarosa, dextranos de masas molares controladas de $4,1 \cdot 10^8$, $40 \cdot 10^3$ o $1 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹. Uno de ellos, denominado DSR-S var del Δ 4N y producido en forma recombinante por *Escherichia coli*, cataliza, a partir de sacarosa, la síntesis de un dextrano de masa molar estimada de $4,1 \cdot 10^8$ g.mol⁻¹ y está constituido por 96 % de enlaces α -1,6 y 4 % de enlaces α -1,3. La solución de dextrano obtenida con DSR-S var del Δ 4N presenta una viscosidad superior de un factor de 10 a 100 dependiendo del esfuerzo de cizalla aplicado en comparación con la obtenida con la enzima DSR-S, y presenta un comportamiento de reofluidificante. Por tanto, el dextrano obtenido con DSR-S var del Δ 4N es particularmente interesante para aplicaciones en el campo de los agentes texturizantes. Sin embargo, la viscosidad de este polímero disminuye bruscamente cuando se aplican esfuerzos de cizalla constantes de larga duración.

60 Por tanto, los dextranos producidos por las glucansacaratas conocidas hasta ahora, tienen inconvenientes, en particular, relacionados con índices de dispersión elevados o con masas molares promedio que no superan aproximadamente 10^8 g.mol⁻¹, así como con propiedades reológicas, principalmente un poder texturizante, relativamente limitadas.

65 Por lo tanto, todavía existe la necesidad de nuevos dextranos cuyas propiedades permitan ampliar el campo de

aplicaciones de este tipo de polímeros.

Objeto de la invención

- 5 Los inventores se atribuyen por tanto el mérito de haber elaborado dextranos que tienen una masa molar extremadamente elevada, significativamente superior a lo que hasta ahora se había realizado, al mismo tiempo que tienen un índice de dispersión bajo. Estas características les otorgan principalmente propiedades fisicoquímicas particularmente originales en comparación con los dextranos hasta ahora sintetizados.
- 10 Los dextranos de conformidad con la invención se caracterizan por que tienen entre 95 % y 99 %, preferentemente entre 97 % y 98 %, preferentemente aún entre 97,4 % y 97,6 %, de enlaces glucosídicos α -1,6, una masa molar promedio en peso M_w al menos igual a $0,7 \cdot 10^9$ g.mol⁻¹ y un índice de dispersión D_i comprendido entre 1,3 y 3.
- 15 Normalmente, para determinar la masa molar promedio en peso, se podrá utilizar el método descrito en los ejemplos.
- Según una realización particular de la invención, los dextranos de conformidad con la invención tienen una masa molar promedio en peso M_w al menos igual a $1 \cdot 10^9$ g.mol⁻¹. Normalmente, la masa molar promedio en peso M_w de los dextranos de conformidad con la invención es inferior a $5 \cdot 10^{10}$, preferentemente inferior a $1 \cdot 10^{10}$, preferentemente inferior a $5 \cdot 10^9$ g.mol⁻¹.
- 20 Por tanto, los dextranos de conformidad con la invención tienen la ventaja de tener una masa molar extremadamente elevada y controlada, del orden de 10 veces superior al de los dextranos sintetizados hasta ahora.
- Asimismo, los dextranos de conformidad con la invención tienen un índice de dispersión D_i comprendido entre 1,3 y 3, preferentemente comprendido entre 1,5 y 2,5. Preferentemente aún, el índice de dispersión D_i es de $1,8 \pm 0,3$. De esta manera, aunque su masa molar sea muy elevada, los dextranos de conformidad con la invención también tienen la ventaja de tener un índice de dispersión bajo. En comparación, un dextrano comercial de $2 \cdot 10^6$ Da tiene un índice de dispersión de 3,49 (11).
- 25 En el presente documento, un polímero o dextrano denominado "casi lineal", es un polímero o un dextrano cuyo índice de ramificación es bajo y/o cuyo coeficiente hidrodinámico u_G está comprendido entre 0,44 y 0,52, preferentemente comprendido entre 0,46 y 0,50, preferentemente es de 0,48. De esta manera, los dextranos de conformidad con la invención tienen entre 95 % y 99 %, preferentemente entre 97 % y 98 %, preferentemente aún entre 97,4 % y 97,6 %, de enlaces glucosídicos α -1,6. Asimismo, los dextranos de conformidad con la invención tienen, de manera ventajosa, entre 1 % y 5 %, preferentemente entre 2 % y 3 %, preferentemente aún entre 2 % y 2,5 %, de enlaces glucosídicos α -1,3. De manera particularmente ventajosa, los dextranos de conformidad con la invención tienen 97,55 % de enlaces glucosídicos α -1,6 y 2,45 % de enlaces glucosídicos α -1,3. Los dextranos de conformidad con la invención son, por tanto, casi lineales.
- 30 Las características estructurales particulares de los dextranos según la invención les confieren propiedades fisicoquímicas particularmente interesantes, permitiendo su uso en numerosas aplicaciones, y principalmente en la industria petrolera, cosmética o agroalimentaria.
- 35 Con respecto a las propiedades reológicas, los dextranos de conformidad con la invención tienen una viscosidad dinámica elevada a bajas velocidades de cizalla y presentan un comportamiento de tipo reofluidificante o pseudoplástico, disminuyendo su viscosidad dinámica al aumentar el gradiente de velocidad (o velocidad de cizalla), como se describe en el ejemplo 12.
- 40 Por otro lado, la viscosidad de los dextranos de conformidad con la invención se ve poco afectada por los esfuerzos de cizalla constantes de larga duración, permitiendo que se adapten a procedimientos industriales en los que se requiere una agitación permanente. Por ejemplo, cuando el esfuerzo de cizalla se establece a 50 s⁻¹ durante un período de aproximadamente 10 minutos, se observa una disminución de la viscosidad del dextrano en solución sintetizado por DSR-S vardel $\Delta 4N$, cosa que no ocurre en los dextranos de conformidad con la invención, principalmente sintetizados por la dextran sacarasa DSR-OK recombinante como se revela en el Ejemplo 12.
- 45 Asimismo, los dextranos de conformidad con la invención tienen un umbral de flujo relativamente elevado, en particular comprendido entre 25 y 40 Pa, dependiendo de la cantidad inicial de sacarosa presente en el medio de reacción, como se muestra en el ejemplo 12.
- 50 Los dextranos de conformidad con la invención tienen un comportamiento débil similar a un gel. Esto se caracteriza por mediciones de reología en condiciones dinámicas, con detección de módulos elásticos o módulo de conservación G' y el módulo viscoso o módulo de pérdida G'' . Para un gel, G' es superior a G'' en el intervalo de frecuencia estudiado, como se observa en el ejemplo 12.
- 55 Finalmente, los dextranos de conformidad con la invención tienen temperaturas de transición vítrea de 95 °C para un contenido hídrico de 6,6 %, y de 25 °C para un contenido hídrico de 12,9 %. En otras palabras, para un contenido

hídrico de aproximadamente 13 %, los dextranos según la invención tienen un estado correoso, flexible a temperaturas superiores a aproximadamente 25 °C y se consideran como "quebradizos" por debajo de aproximadamente 25 °C.

5 La presente descripción también se refiere a una nueva dextransacarasa, denominada DSR-OK, que permite sintetizar dextranos de conformidad con la invención.

Por tanto, un objeto de la presente descripción se refiere a una dextransacarasa cuya secuencia de aminoácidos es la secuencia SEQ ID NO: 1.

10 La secuencia del ADN genómico de la cepa *Oenococcus kitaharae* DSM 17330 se publicó en 2012 con la referencia de Genbank n°CM001398.1 (*whole genome shotgun sequence*, secuencia hologenómica de escopeta) (4). En la base de datos del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica), el gen que codifica DSR-OK se describe como supuesta glucosiltransferasa (número de registro EHN59583).

15 Los inventores han descubierto sorprendentemente que esta secuencia proteica codifica una enzima, una dextransacarasa muy activa y particularmente interesante. Este resultado fue inesperado por varias razones.

20 En primer lugar, esta enzima se obtiene de una bacteria láctica, *Oenococcus kitaharae* DSM17330, aislada por primera vez en 2006 en subproductos de destilería del Shochu (3). Esta nueva especie, *kitaharae*, fue identificada en ese momento como una bacteria láctica perteneciente al género *Oenococcus*, pero alejada de *Oenococcus oeni* al no ser acidófila y al no realizar fermentación maloláctica. Asimismo, en el 2006, los investigadores llegaron a la conclusión de que cultivando esta cepa en un medio MRS, es decir, un medio tradicional para el crecimiento de bacterias lácticas, complementado con sacarosa, la cepa *Oenococcus kitaharae* DSM17330 no produce dextrano en el medio extracelular a partir de sacarosa. Por tanto, habría sido posible suponer que esta glucosiltransferasa es inactiva en sacarosa.

30 Finalmente, la secuencia de DSR-OK solo posee una identidad máxima de 58 % (en el 97 % de su secuencia) con la dextransacarasa DSR-N de *Leuconostoc mesenteroides* KIBGE IB-22 cuya secuencia está disponible en las bases de datos con el número de registro del Genbank AFP53921.1. En comparación con otras supuestas secuencias de glucansacarosas que pueden identificarse después de las campañas de secuenciación de genomas bacterianos, este porcentaje de identidad es bajo. Por otro lado, la base de datos CAZy, que recoge todas las enzimas activas en los azúcares, no menciona en absoluto esta cepa y este gen en la familia GH-70, familia de las glucansacarosas.

35 Por lo tanto, el experto en la materia no se ha planteado considerar esta supuesta enzima como una posible dextransacarasa interesante por sus propiedades catalíticas y por los dextranos sintetizados.

Los inventores han revelado finalmente las excepcionales propiedades de DSR-OK como dextransacarasa.

40 La dextransacarasa DSR-OK se compone de 1 484 aminoácidos, que posee la triada catalítica DED y los 4 motivos conservados habitualmente descritos en las enzimas de la familia 70 de las glucósidohidrolasas. Los motivos proteicos conservados del núcleo catalítico (I a IV) se han identificado desde la posición 936 a la posición 942 para el motivo I, de la posición 458 a la posición 468 para el motivo II, de posición 495 a la posición 505 para el motivo III y de la posición 568 a posición 582 para el motivo IV. En comparación con la secuencia proteica de la glucansacarasa GTF-180, los cinco dominios estructurales tradicionalmente descritos para las glucansacarosas (A, B, C, IV y V) (5) pueden identificarse en la estructura primaria de DSR-OK (Figura 1).

50 La DSR-OK es una dextransacarasa muy específica de la polimerización a través de enlaces glucosídicos de tipo α -1,6 y es una excelente polimerasa. En efecto, como se observa en el ejemplo 5, los análisis cromatográficos realizados después de una síntesis de dextrano a partir de 100 g.l⁻¹ de sacarosa muestran que, para la producción de polímero, se utiliza aproximadamente un 89 % de unidades de glucosilo derivadas del sustrato.

55 Asimismo, la DSR-OK tiene una temperatura de funcionamiento óptima de aproximadamente 30 °C y un pH óptimo de aproximadamente 5,75. A 30 °C, esta dextransacarasa es estable y fuerte, siendo su semivida de aproximadamente 111 h durante una caracterización en medio sin procesar, es decir, no purificado, como se observa en la Figura 2. Esta propiedad es particularmente interesante y rara en las glucansacarosas. De esta manera, en comparación, la DSR-S vardel Δ 4N, otra glucansacarasa recombinante, tiene una semivida de tan solo 24 horas en las mismas condiciones.

60 Por otro lado, la DSR-OK sigue un mecanismo Michaeliano, con una inhibición por exceso de sustrato, y es un catalizador con buen rendimiento en comparación con otras dextransacarosas similares, como se muestra en el ejemplo 8. Por ejemplo, la DSR-OK tiene una constante de afinidad, Km, de 8,99 mM y una constante catalítica, Kcat, de 550 s⁻¹ (véanse las figuras 3 y 4). Por lo tanto, la enzima tiene una buena afinidad por el sustrato (Km), del mismo orden de magnitud que la mayoría de las dextransacarosas caracterizadas, y tiene una excelente constante catalítica (kcat), raramente observada en las glucansacarosas. Por lo tanto, la enzima es extremadamente eficaz para catalizar reacciones de polimerización a partir de sacarosa.

65 Finalmente, como se muestra en la figura 5, la constante de inhibición de DSR-OK se eleva a 1 M, lo que muestra que

esta dextranasa está ligeramente inhibida por un exceso de sustrato. Esta característica permite su uso en procedimientos de síntesis de dextrano a partir de concentraciones de sacarosa iniciales muy variables según la masa molecular del dextrano deseado. En efecto, se sabe que el aumento en la concentración inicial de sustrato favorece la síntesis de dextranos de masas moleculares más bajas (2).

5 En la presente solicitud también se incluyen variantes de función conservadoras. Se denomina "*variante de función conservadora*", a una variante en la que, en una proteína, un resto (o más) de aminoácido dado, se ha modificado sin alterar la conformación global ni la actividad enzimática de la dextranasa, lo que permite sintetizar dextranos de conformidad con la invención. Normalmente, la modificación puede referirse a partes no sensibles de la enzima, y no se refiere principalmente a la triada catalítica.

10 De esta manera, una realización particular de la invención se refiere a variantes de función conservadora. Normalmente, dicha una variante de función conservadora es una dextranasa cuya secuencia de aminoácidos tiene al menos 80 %, preferentemente 85 %, preferentemente aún 90 %, preferentemente aún 95 %, preferentemente aún 98 % de identidad en las posiciones que van de la 359 a 1038 en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, que corresponde a los dominios A+B+C de la enzima, siempre que se conserve la actividad enzimática de la dextranasa, que permite sintetizar dextranos de conformidad con la invención.

20 Una dextranasa según la invención es una variante de la enzima dextranasa de secuencia SEQ ID NO: 1, siempre que esta sea una variante de función conservadora de la enzima.

25 Por lo tanto, un objeto de la invención se refiere a una dextranasa que tiene al menos 80 %, preferentemente 85 %, preferentemente aún 90 %, preferentemente aún 95 %, preferentemente aún 98 % de identidad con la secuencia que va de las posiciones 359 a 1038 de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, no teniendo la dextranasa, como secuencia de aminoácidos, la secuencia SEQ ID NO: 1.

30 La actividad enzimática de una variante de dextranasa puede ensayarse según las técnicas conocidas por el experto en la materia, por ejemplo, mediante el método con ácido dinitrosalicílico (DNS) de Sumner y Howell (10) o mediante análisis de HPLC (siglas del inglés *high performance liquid chromatography*, cromatografía líquida de alto rendimiento).

Según un modo de realización particular, se puede preparar una dextranasa según la invención mediante técnicas conocidas de recombinación genética.

35 El experto en la materia sabrá cómo utilizar las tecnologías de biología molecular y podrá elegir un sistema de expresión adecuado según las técnicas conocidas. En este caso, se puede hacer referencia al ejemplo 2 a continuación.

40 La expresión "*sistema de expresión*" comprende una célula hospedadora y un vector compatible en condiciones apropiadas, es decir, condiciones que permiten la expresión de la proteína codificada por el ADN extraño transportado por el vector e introducido en la célula hospedadora. Normalmente, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una dextranasa, preferentemente una dextranasa DSR-OK tal como se ha descrito anteriormente o una variante de función conservadora, puede insertarse en un vector de expresión apropiado que después se introducirá en una célula hospedadora procarionte o eucariote adecuada.

45 Un vector de expresión es normalmente un plásmido, un cósmido, un episoma, un cromosoma artificial, un fago o un vector vírico.

50 Normalmente, la expresión de los ácidos nucleicos de la presente invención puede realizarse en células hospedadoras procariontes o eucariotas. Como ejemplos no limitantes de cepas de células hospedadoras procariontes, pueden mencionarse cepas tales como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* o cepas de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*. Como ejemplos no limitantes de cepas de células hospedadoras eucariotas, pueden mencionarse cepas tales como las de los parásitos *Apicomplexan (Plasmodia, Toxoplasma, Cryptosporidia)* *Leishmania* o *Trypanosoma*, o células de levadura tales como *Saccharomyces* como *Saccharomyces cerevisiae* o *pombe*, *Pichia pastoris* etc.

60 Preferentemente, se utilizan células hospedadoras procariontes. Según un modo de realización ventajosa, las células utilizadas para la expresión de los ácidos nucleicos de la presente invención son *Escherichia coli* y, más preferentemente, las cepas se seleccionan entre TOP10, BL21AI, BL21 Star DE3, Arctic Express DE3.

65 De manera ventajosa, la dextranasa también puede comprender, en el extremo N terminal, una secuencia señal. Esta secuencia señal puede ser una de las secuencias señal conocidas por el experto en la materia, principalmente para que, cuando la proteína se sintetice en una célula hospedadora, la síntesis de dextrano pueda efectuarse extracelularmente. En efecto, la dextranasa DSR-OK no tiene péptido señal. La presencia de un péptido señal adecuado permite así la síntesis de dextrano extracelularmente. Además, las herramientas genéticas se están desarrollando cada vez más para la expresión heteróloga en microorganismos generalmente reconocidos como

seguros (GRAS, por las siglas del inglés *Generally Recognized As Safe*) de los géneros *Bacillus* y *Lactococcus*. De esta manera, actualmente existen diversos sistemas conocidos de excreción de proteínas recombinantes en estas bacterias, que el experto en la materia puede utilizar en este caso en cuestión.

- 5 Como se menciona en el ejemplo 2, la producción recombinante de dextransacarasa en *Escherichia coli* utilizando las condiciones descritas en el ejemplo 2, alcanza aproximadamente 30 000 unidades de actividad enzimática por litro de cultivo, lo que permite su uso a bajo coste en procedimientos de síntesis de polímeros.

10 De esta manera, una dextransacarasa según la invención, puede prepararse cultivando células hospedadoras que contengan una secuencia de ácidos nucleicos que codifique una dextransacarasa, preferentemente una dextransacarasa DSR-OK tal como se ha descrito anteriormente o una variante de función conservadora, en condiciones que permitan la expresión de una dextransacarasa, y por aislamiento de dicha dextransacarasa del medio de cultivo según las técnicas conocidas por el experto en la materia.

15 Después, dichas dextransacarasas pueden purificarse mediante cualquier técnica de purificación conocida por el experto en la materia, por ejemplo, por precipitación, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio hidrófobo, filtración en gel, cromatografía HPLC de fase inversa, etcétera. Según un modo de realización preferido, la dextransacarasa obtenida mediante el cultivo de la célula hospedadora, se purifica por cromatografía de afinidad. También pueden inmovilizarse mediante técnicas conocidas por el experto en la materia, principalmente, por ejemplo, por adsorción, formación de enlace covalente entre el soporte y la proteína, inclusión o encapsulación.

20 Según otro modo de realización, una dextransacarasa según la invención puede prepararse directamente cultivando la cepa nativa *Oenococcus oeni*. La cepa *Oenococcus oeni* solo tiene un gen de dextransacarasa, que codifica la DSR-OK.

La invención también se refiere a la fabricación de dextranos de conformidad con la invención.

30 Por lo tanto, un objeto de la invención se refiere a un procedimiento de fabricación de dextranos de conformidad con la invención que comprende la reacción de una dextransacarasa de secuencia SEQ ID NO: 1, o una variante de función conservadora como se describió anteriormente, con sacarosa.

35 El experto en la materia sabrá cómo adaptar las condiciones de fermentación a aplicar para tener una producción optimizada de dextrano.

De manera general, la dextransacarasa debe incubarse en un medio de síntesis que contenga sacarosa.

40 Según un modo de realización particular, los microorganismos que secretan la dextransacarasa o extractos celulares de microorganismos que producen la dextransacarasa intracelularmente, pueden cultivarse o utilizarse en un medio que comprenda sacarosa, lo que conduce a la síntesis de dextrano según la invención.

Como se describió anteriormente, la síntesis de dextrano puede realizarse a partir de dextransacarasa nativa o dextransacarasa recombinante, purificada o no.

45 De esta manera, según otro modo de realización particular, una dextransacarasa recombinante, preferentemente la dextransacarasa DSR-OK o una variante de función conservadora, se incuba en un medio de síntesis que contenga sacarosa.

50 De manera ventajosa, la reacción se realiza a una temperatura comprendida entre 20 °C y 40 °C, preferentemente comprendida entre 25 °C y 35 °C, preferentemente aún comprendida entre 30 °C y 33 °C. Normalmente, la reacción se realiza a una temperatura de aproximadamente 30 °C.

55 El experto en la materia sabrá adaptar la duración de la síntesis, en particular, dependiendo de la cantidad de enzima añadida al medio de reacción y en función de la temperatura. Normalmente, la reacción se realiza durante un período comprendido entre 4 horas y 20 horas, preferentemente entre 8 horas y 16 horas, preferentemente durante un período de aproximadamente 12 horas.

60 Además, la concentración de sacarosa está comprendida, preferentemente, entre aproximadamente 50 y 200 g.l⁻¹, preferentemente, entre aproximadamente 50 y 150 g.l⁻¹. Normalmente, la concentración de sacarosa es de aproximadamente 100 g.l⁻¹. De manera general, se sabe que será más probable que la masa molar promedio en peso del dextrano sintetizado se eleve utilizando una concentración inicial de sacarosa baja.

65 De manera ventajosa, durante la reacción, el pH está comprendido entre aproximadamente 5 y 6,5, preferentemente, entre 5 y 6, preferentemente aún entre 5 y 5,8. Normalmente, durante la reacción, el pH es de aproximadamente 5,75.

Un objeto de la invención se refiere a una composición cosmética o alimentaria que comprende dextranos, tales como

los descritos anteriormente y al menos un soporte farmacéuticamente aceptable o alimentario.

Los dextranos de conformidad con la invención podrán utilizarse en cualquier tipo de aplicación para la cual se adapten sus propiedades fisicoquímicas, por ejemplo, aplicaciones que requieren dextranos de masa molar alta y/o una viscosidad importante a baja cizalla, un comportamiento reofluidificante, con una viscosidad estable a lo largo del tiempo durante esfuerzos de cizalla constantes de larga duración, y que tienen un umbral de flujo relativamente elevado (del orden de 30 Pa).

Por tanto, los dextranos de conformidad con la invención pueden utilizarse en la industria petrolera, cosmética o incluso en la industria agroalimentaria.

Como ejemplos no limitativos, los dextranos de conformidad con la invención pueden utilizarse para mejorar la recuperación de petróleo. También pueden utilizarse en los campos de perforación y minería, por ejemplo, como agente floculante, como se describe en la solicitud FR 2 978 773 A. Los dextranos de conformidad con la invención también pueden utilizarse como agentes espesantes, gelificantes y/o texturizantes, por ejemplo, como sustituto de goma arábiga, o en productos como los productos gelificados, las salsas, para productos de panadería, confitería o para helados. Por ejemplo, se puede hacer referencia a la patente US 6 627 235 que describe la utilización de dextranos de masa molar alta en productos de panadería para mejorar la textura de los productos, así como su resistencia a la cocción y al endurecimiento.

Por lo tanto, un objeto de la invención se refiere al uso de dextranos de conformidad con la invención como agente espesante, gelificante y/o texturizante.

La invención también se refiere a hidrolizados de dextranos.

En el presente documento por "*hidrolizado de dextrano*" se entiende que es un dextrano de conformidad con la invención y que se somete a una o más etapas de tratamiento adicionales capaces de conferirle una masa molar controlada inferior a la masa molar alcanzada según la presente invención. El experto en la materia conoce dichos métodos. Por ejemplo, puede aplicarse una hidrólisis ácida seguida de fraccionamiento, principalmente, mediante disolventes orgánicos.

La invención también se refiere a reacciones de aceptor realizadas a partir de sacarosa y glucooligosacáridos añadidos al medio de reacción al comienzo de la síntesis (glucosa o maltosa, por ejemplo). El experto en la técnica conoce bien esta reacción de aceptor para promover la síntesis de dextranos de masas molares más bajas que a partir de sacarosa sola, y los productos obtenidos pueden tener aplicaciones similares a las de los dextranos obtenidos por hidrolizados.

Por tanto, los dextranos obtenidos, de menor tamaño, pueden utilizarse en todos los campos en los que sea apropiado una masa molar mas baja, por ejemplo, para aplicaciones farmacéuticas (sustituto de plasma sanguíneo, transportador de hierro o anticoagulante), para aplicaciones analíticas (soportes de cromatografía versátiles), en el campo médico (expansor de plasma sanguíneo) etc. También puede hacerse referencia a la publicación de Vettori et al. (6).

Un objeto de la invención se refiere a un procedimiento de fabricación de un hidrolizado de dextrano, en el que el dextrano de conformidad con la invención se somete a etapas de hidrólisis y de fraccionamiento.

La invención también se refiere a derivados de dextrano.

En el presente documento, por "*derivado de dextrano*", se entiende que es un dextrano de conformidad con la invención y que se somete a una o más etapas de modificación química conocidas, principalmente seleccionadas entre una eterificación, una esterificación o una reticulación. Por lo tanto, es posible obtener un derivado de dextrano tal como un dextrano reticulado, un éster de dextrano, por ejemplo, un éster inorgánico de dextrano (fosfato de dextrano, sulfato de dextrano) o un éster orgánico de dextrano, un éter de dextrano, por ejemplo, un éter de dextrano no iónico (dextrano alquilado, hidroxialquil éter o hidroxialquil aril éter de dextrina, éter de dextrano poli(etilenglicol) o un éter de dextrano iónico (sulfopropil dextrano, dextrano carboximetilado, dextrano 2-(dietilamino)etilo). Dichas técnicas de modificación química, así como las aplicaciones para las cuales los dextranos así obtenidos son adecuados, son muy conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo, puede hacerse referencia al documento de Heinze et al (7) y a la tesis de Ndegwa Henry Maina (8).

Por lo tanto, un objeto de la invención se refiere a un procedimiento de modificación de un dextrano de conformidad con la invención, en el que el dextrano se somete a uno o más etapas de modificación química.

De manera ventajosa, una etapa de modificación química se selecciona entre una eterificación, una esterificación y una reticulación.

Descripción de las figuras

Figura 1: Representación esquemática de la estructura primaria de DSR-OK (basada en el alineamiento de

proteínas con la enzima GFT180 de *Lactobacillus reuteri* 180). Se diferencian cinco dominios: dominio V en rojo, dominio IV en amarillo, dominio B en verde, dominio A en azul y dominio C en morado. La triada catalítica se indica con las letras blancas "D", "E" y "D".

5 **Figura 2:** Representación gráfica de la actividad relativa de la dextransacarasa DSR-OK a 30 °C en función del tiempo.

Figura 3: Determinación de la constante de inhibición por exceso de sustrato (variación de la inversa de la velocidad inicial en función de la concentración inicial del sustrato).

10 **Figura 4:** Representación gráfica de Michaelis-Menten (variación de la velocidad inicial de producción de fructosa en función de la concentración inicial de sustrato).

15 **Figura 5:** Representación gráfica de Lineweaver-Burk (variación de la inversa de la velocidad en función de la inversa de la concentración de sustrato).

Figura 6: Espectro obtenido por RMN de protones en el dextrano sintetizado por DSR-OK recombinante. Las flechas corresponden a los enlaces α -1,3 y α -1,6.

20 **Figura 7:** Perfil de elución obtenido por AF4-MALLS (por las siglas del inglés *Asymmetric Flow-Field-Flow-Fractionation - Multi-Angle Laser Light Scattering*, Fraccionamiento asimétrico de flujo de campo de flujo con dispersión de luz láser de múltiples ángulos) (D1 = respuesta refractométrica, D1-DL = dispersión de luz) y distribución en masa molar de dextrano producido por la preparación de DSR-OK recombinante (D1 M_w).

25 **Figura 8:** Perfiles de elución obtenidos por HPSEC de dextranos producidos a partir de 100 g.l⁻¹ de sacarosa por (a) la DSR-S nativa producida por la cepa NRRL B-512F de *L. mesenteroides*, (b) la enzima DSR-S var del Δ 4N recombinante y por (c) la enzima DSR-OK recombinante. El pico 1 corresponde a dextrano de masa molar muy alta, el pico 2 corresponde a oligosacáridos con un grado de polimerización inferior a 7 y el pico 3 corresponde a la fructosa coproducida durante la reacción.

30 **Figura 9:** Representación del radio de giro (en nm) en función de la masa molar de diferentes dextranos: gcn1 producido por un mutante DSR-S var del Δ 4N, el dextrano producido por DSR-OK y un dextrano comercial T2000 (Pharmacosmos) de 2.10⁶ g.mol⁻¹.

35 **Figura 10:** Comportamiento reológico del dextrano en función de la concentración de sacarosa midiendo la viscosidad del dextrano sintetizado por DSR-OK en el medio de síntesis sin procesar a partir de diferentes concentraciones de sacarosa: 50 g.l⁻¹ (●), 75 g.l⁻¹ (▲), 100 g.l⁻¹ (■) y 150 g.l⁻¹ (○).

40 **Figura 11:** Comportamiento reológico del dextrano purificado midiendo la viscosidad del dextrano sintetizado por DSR-OK, purificado por precipitación con etanol, y concentrado a 50 g.l⁻¹ en agua destilada.

45 **Figura 12:** Medición del umbral de flujo de dextrano producido por DSR-OK en el medio de síntesis sin procesar, a partir de 100 g.l⁻¹ de sacarosa por representación gráfica del índice de cizalla de dextrano a 33 g.l⁻¹ producido por DSR-OK en función del esfuerzo de cizalla aplicado.

Figura 13: Comportamiento reológico del dextrano producido por DSR-OK midiendo los módulos G' (•) y G'' (○) mediante barrido de frecuencia en condiciones oscilatorias (oscilaciones entre 10⁻² y 10² rad.s⁻¹): comportamiento de tipo gel G'>G''.

50 **Figura 14:** Comportamiento reológico de diferentes dextranos midiendo la viscosidad en función del esfuerzo de cizalla del dextrano producido en presencia de 100 g.l⁻¹ de sacarosa, por la DSR-OK recombinante (■), por la DSR-S nativa obtenida de la cepa NRRL B-512F (-) de *L. mesenteroides*, por la DSR-S var del Δ 4N (◇).

55 **Figura 15:** Evolución de la viscosidad aparente de los dextranos en su medio de síntesis sin procesar sintetizados a partir de 100 g.l⁻¹ de sacarosa A: para la DSR-OK recombinante y B: para la DSR-S var del Δ 4N a un esfuerzo de cizalla constante de 50 s⁻¹, a 20 °C y presión atmosférica ambiente.

Descripción detallada de la invención

60 **Ejemplo 1: Identificación del gen *dsrok* en el genoma de *Oenococcus kitaharae* DSM 17330 y análisis de la estructura primaria de la proteína correspondiente**

65 El gen *dsrok* se ha identificado en el genoma de *Oenococcus kitaharae* DSM 17330 (disponible en la base de datos del NCBI con el número de registro NZ_CM001398) mediante blast nucleotídico contra una base de datos constituida por secuencias nucleotídicas de glucansacarosas clasificadas en la familia 70 de las glucósidohidrolasas según la CAZY (*Carbohydrate Active enZYme*, base de datos de enzimas activas sobre carbohidratos,

www.cazy.org/GH70_all.html).

El gen se ha traducido a una secuencia de proteínas gracias al programa informático disponible en línea, Transeq de EMBOSS (www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/).

5 El programa informático SignalP versión 4.1 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) ha previsto la ausencia de péptido señal.

10 Múltiples alineamientos de proteínas (con el programa informático de alineamiento global, ClustalW2, disponible en línea, www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) con otras glucansacarosas caracterizadas, han permitido identificar los motivos conservados del núcleo catalítico de DSR-OK y cortar la enzima en diferentes dominios proteicos (A, B, C, IV y V).

15 Los diferentes porcentajes de identidad y de similitud entre secuencias proteicas, indicados en la ficha preliminar de la invención, se calcularon con la herramienta BlastP (Blast para proteína-proteína) del NCBI, disponible en línea y utilizando los parámetros predeterminados propuestos por el sitio.

Ejemplo 2: Clonación y expresión heteróloga de la proteína en *Escherichia coli*

20 En primer lugar, el gen *dsrok* se amplificó por PCR, a partir del ADN genómico de la cepa *Oenococcus kitaharae* DSM 17330, utilizando los dos cebadores mostrados en la tabla 1.

Tabla 1

Cebador	Secuencia (de 5' a 3')
cebador Directo	CACCATGATGGCGACCGGCTC (SEQ ID NO: 2)
cebador Inverso	GAGGATTTGACCGTTTCCAACTTATCG (SEQ ID NO: 3)

25 La adición de las 4 bases, CACC, en la posición 5' del cebador directo, permitió la inserción correcta del fragmento de PCR en el vector de entrada pENTR/D/TOPO (Life Technologies), para después proceder a la clonación utilizando la tecnología Gateway.

30 Se seleccionó un clon de entrada positivo (vector de entrada que contenía el fragmento de PCR en la dirección deseada) y se recombinó con el vector de destino pET-53-DEST (Novagen) utilizando la mezcla II de enzima clonasa LR (Life technologies). Los clones recombinantes positivos se seleccionaron y analizaron por restricción. La ausencia de mutación dentro de los plásmidos se confirmó por secuenciación (GATC).

35 Para la producción de la enzima recombinante, células de *Escherichia coli* BL21 star DE3 se transformaron con el plásmido pET-53/DSR-OK construido como se indicó anteriormente. Se inocularon 300 µl de la mezcla de transformación en 30 ml de medio LB (caldo lisogénico), complementado con 100 µg.ml⁻¹ de ampicilina e incubado durante la noche a 37 °C para preparar un precultivo.

40 Cultivos de IL en medio ZYM5052 modificado (glicerol al 1 %, glucosa al 0 %, lactosa al 1 %, Studier, 2005) se sembraron a una densidad óptica DO600 nm inicial de 0,05 a partir del precultivo del día anterior, y después se incubaron durante 24 horas a 23 °C y a 150 rpm. Al final de la fermentación, los medios de cultivo se centrifugaron (15 min, 6 500 rpm, 4 °C) y los sedimentos se concentraron a una DO de 80 en tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 5,75.

45 Para obtener la enzima recombinante (producida por *Escherichia coli* intracelularmente), las células se degradaron con ultrasonido según el siguiente protocolo: 5 ciclos de 20 segundos al 30 % de la potencia máxima de la sonda, en frío, separados 4 minutos de descanso en hielo. El sobrenadante de la sonicación (que contiene la enzima recombinante soluble) se recupera después de 30 minutos de centrifugación (10 000 rpm, 10 °C) y se conserva a 4 °C.

50 La producción recombinante de dextran sacarasa en *Escherichia coli* utilizando las condiciones descritas en este documento alcanza aproximadamente 30 000 unidades de actividad enzimática por litro de cultivo, lo que permite su uso a bajo coste en procedimientos de síntesis de polímeros.

Ejemplo 3: Método de determinación de la actividad enzimática de la enzima DSR-OK.

55 Una unidad enzimática de glucansacarasa representa la cantidad de enzima que libera un µmol de fructosa por minuto, a 30 °C, a partir de 100 g.l⁻¹ de sacarosa en tampón de acetato de sodio 50 mM, a pH 5,75.

60 La actividad se determina midiendo la velocidad de producción inicial de los azúcares reductores utilizando el método del ácido dinitrosalicílico (DNS). Durante una cinética, se toman 100 µl de medio de reacción y la reacción se detiene añadiendo un volumen equivalente de DNS. Después, las muestras se calientan durante 5 minutos a 95 °C, se enfrían en el hielo, se diluyen a la mitad en agua, y la absorbancia se lee a 540 nm. Un intervalo estándar de 0 a 2 g.l⁻¹ de

fructosa permite establecer la relación entre el valor de absorbancia y la concentración de azúcares reductores.

Ejemplo 4: Determinación de las condiciones de trabajo óptimas de la enzima DSR-OK.

- 5 El valor de la temperatura óptima se determinó midiendo la actividad del extracto enzimático sin procesar, a diferentes temperaturas (entre 23 y 40 °C) a partir de 100 g.l⁻¹ de sacarosa en tampón de acetato de sodio 50 mM, a pH 5,75.

La enzima dextransacarasa DSR-OK recombinante tiene una temperatura óptima de 30 °C.

- 10 El efecto del pH sobre la actividad enzimática del extracto enzimático sin procesar se mide a 30 °C a partir de 100 g.l⁻¹ de sacarosa, en tampón de citrato fosfato 50 mM, para valores de pH comprendidos entre 3,5 y 8 (intervalo de 0,5).

La enzima dextransacarasa DSR-OK recombinante tiene un pH óptimo comprendido entre 5 y 5,8.

- 15 **Ejemplo 5 - Determinación de los rendimientos de producción y de la actividad polimerasa de la enzima dextransacarasa DSR-OK recombinante.**

Los rendimientos de producción se determinan por cromatografía de intercambio aniónico (HPAEC-PAD, siglas del inglés *High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection*, cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada), para una reacción enzimática a 20 1 U.ml⁻¹ de DSR-OK, a partir de 100 g.l⁻¹ de sacarosa en tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 5,75. Los azúcares, glucosa, fructosa, leucrosa y sacarosa, se separan en una columna Dionex CarboPac PA-100 mediante un gradiente de acetato de sodio de 6 a 500 mM en 36 minutos, que contiene hidróxido de sodio (sosa) 150 mM. Se realizan intervalos estándar de 5, 10, 15 y 20 mg.kg⁻¹ de estos azúcares y se permite su cuantificación.

- 25 Los rendimientos de producción, es decir, la parte de glucosa obtenida de la sacarosa, incorporada en la formación de glucosa, leucrosa y dextrano libres, se calcula de la siguiente manera:

$$\%G \text{ glucosa} = \frac{([Glucosa]_{tf} - [Glucosa]_{t0}) \times 342}{([Sacarosa]_{t0} - [Sacarosa]_{tf}) \times 180} \times 100$$

$$\%G \text{ leucrosa} = \frac{([Leucrosa]_{tf} - [Leucrosa]_{t0})}{([Sacarosa]_{t0} - [Sacarosa]_{tf})} \times 100$$

- 30 El análisis de los productos de reacción por cromatografía de exclusión por tamaño (HPSEC) muestra que solo se sintetiza glucosa, leucrosa y dextrano de masa molecular muy alta. Como consecuencia de los problemas recurrentes de colmatado de las columnas durante el análisis con este polímero, la cuantificación directa del dextrano de masa molecular muy alta no es factible. El porcentaje de unidades de glucosilo incorporado en la síntesis de dextrano se dedujo de los análisis HPAEC-PAD de la siguiente manera:

$$\%G \text{ dextrano} = 100 \% - (\%G \text{ glucosa} + \%G \text{ leucrosa})$$

- 40 En este caso, se ha revelado que la enzima es una excelente polimerasa. En efecto, los análisis cromatográficos (HPAEC-PAD y HPSEC-RI) realizados después de una síntesis de dextrano a partir de 100 g.l⁻¹ de sacarosa, muestran que aproximadamente el 89 % (más exactamente, 86 % ± 5 %) de las unidades de glucosilo obtenidas del sustrato, se utilizan para la producción del polímero en las condiciones de producción estándar (100 g.l⁻¹ de sacarosa, a 30 °C y a pH 5,75).

- 45 Solo se pierde el 2 % y el 9 % de estas unidades al incorporarse en la síntesis de glucosa y leucrosa libres, respectivamente.

Ejemplo 6 - Estudio de la estabilidad de la enzima recombinante DSR-OK.

- 50 Para estudiar la estabilidad de DSR-OK a 30 °C, la enzima (purificada o no) se llevó a una temperatura de 30 °C, inicialmente a 40 U.ml⁻¹, en tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 5,75. La actividad residual se midió, a intervalos regulares, a partir de 100 g.l⁻¹ de sacarosa, en tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 5,75, hasta la desnaturalización completa de la proteína. El tiempo de semivida corresponde al tiempo en el cual la enzima ha perdido la mitad de su actividad enzimática inicial.

- 55 Como se observa en la figura 2, el tiempo de semivida de la enzima DSR-OK a 30 °C es de 111 h ± 10 h durante una caracterización en medio sin procesar (no purificado). Por lo tanto, la enzima DSR-OK es muy estable, lo que es una propiedad particularmente interesante para una glucansacarasa de la familia 70 de las glucósidohidrolasas.

- 60 En comparación, la DSR-S vardel Δ4N, otra glucansacarasa recombinante, tiene un tiempo de semivida solo de 24 horas en las mismas condiciones.

Ejemplo 7 Purificación de la enzima recombinante DSR-OK por cromatografía de afinidad.

5 La enzima recombinante DSR-OK producida en *Escherichia coli* se fusiona a dos etiquetas de purificación 6xHis y Strep Tag II en los extremos N y C terminal respectivamente, para permitir una purificación por afinidad. Una purificación doble en una columna StrepTactin (afinidad por la etiqueta Strep Tag II), ha demostrado ser el método más eficaz y de excelente calidad.

10 Las purificaciones enzimáticas se realizan en el sistema ÄKTExpress de GE Healthcare, en un recinto a 8 °C. En una columna Strep Tactin Sepharose High Performance™ de 5 ml (GE Healthcare), preequilibrada con tampón PBS 1X, NaCl 280 mM, pH 7,4, se inyectan 10 ml de extracto enzimático que contiene la proteína DSR-OK etiquetada. Después de una hora de fijación en circuito cerrado, la elución se realizó a 4 ml.min⁻¹, mediante un gradiente de D-destiobiotina de 0,05 a 2,5 mM en tampón de fijación (PBS 1X, NaCl 280 mM, pH 7,4) en 20 volúmenes de columna. La fracción purificada se desaló en una columna 10 DG (Biorad) preequilibrada con tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 5,75, CaCl₂ 0,05 g.l⁻¹, Tween80 al 0,1 %. Para mejorar el factor de purificación y la calidad de la preparación enzimática pura, el extracto obtenido anteriormente se purificó nuevamente según estas mismas condiciones.

15 La concentración de proteína se midió a 280 nm en el espectrofotómetro Nanodrop 1000 3.7.1 de Thermo Scientific, fijando el coeficiente de extinción molar de la enzima DSR-OK a 224160 M⁻¹.cm⁻¹ y su peso molecular a 165124 Da (preestablecido por el programa ProtParam de ExPasy disponible en línea).

Ejemplo 8 - Determinación de los parámetros cinéticos de la enzima dextranasa DSR-OK recombinante.

25 Los parámetros cinéticos (V_m, K_m y K_{cat}) se determinaron a 30 °C, en tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 5,75, complementado con 250 mg.l⁻¹ de BSA. Las velocidades iniciales se miden para concentraciones de sacarosa que varían de 2 a 600 mM, utilizando la enzima purificada a 1 U.ml⁻¹ final. Se toman muestras a intervalos regulares, y la reacción enzimática se detiene calentando a 95 °C durante 5 min.

30 Después, las muestras se analizan por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en una columna Aminex Biorad HPX-87K (300×7,8 mm, BioRad). La temperatura del horno de la columna se mantiene a 65 °C y como eluyente se utiliza agua ultrapura a un caudal de 0,6 ml.min⁻¹. Para permitir la cuantificación de los diferentes azúcares, se realizan intervalos estándar de 5, 10, 15 y 20 g.kg⁻¹ de sacarosa, leucrosa glucosa y fructosa. La detección se realiza por refractometría.

35 La DSR-OK es una enzima michaeliana, los parámetros cinéticos, V_m y K_m se determinan a partir de la representación gráfica de Lineweaver y Burk, según la ecuación $\frac{1}{v_i} = \left(\frac{K_m}{v_{máx}} \times \frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{v_{máx}}$ en la que [S] representa la concentración inicial de sacarosa y v_i, la velocidad inicial.

40 Los parámetros cinéticos de la enzima se determinaron en tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 5,75, en presencia de BSA (250 mg.l⁻¹) y a 30 °C.

45 Por lo tanto, se ha revelado que la DSR-OK, que sigue un mecanismo Michaeliano con una inhibición por exceso de sustrato, es un catalizador que tiene un buen rendimiento y una constante de afinidad K_m de 9 mM ± 1 mM y una constante catalítica K_{cat} de 550 s⁻¹ (figuras 3 y 4).

Estos valores son muy similares a los de la dextranasa DSR-S var del Δ4N, que es una de las enzimas que tienen mejor rendimiento entre las glucansaras caracterizadas de la familia 70 de las glucosidohidrolasas (K_m de 7,5 M y K_{cat} de 584 s⁻¹).

50 Sin embargo, la DSR-OK se diferencia de la dextranasa DSR-S var del Δ4N porque se inhibe mucho menos por exceso de sustrato. En efecto, como se muestra en la figura 5, su constante de inhibición solo se eleva a 1 M contra 0,326 M para la DSR-S var del Δ4N.

EJEMPLO 9 - Síntesis de dextrano por la dextranasa DSR-OK recombinante.

55 Las síntesis de dextrano se realiza a partir de concentraciones variables de sacarosa (generalmente 100 g.l⁻¹), a 30 °C en tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 5,75 y utilizando 1 U.ml⁻¹ de enzima durante un período de 15 horas. Para la mayoría de los análisis, el polímero se purificó mediante dos precipitaciones con etanol al 50 %, seguido de dos lavados y de una resuspensión en agua ultrapura antes de liofilizarse.

EJEMPLO - 10 Análisis de la naturaleza de los enlaces de dextrano producidos por la dextranasa DSR-OK recombinante.

65 Después de la liofilización, 20 mg de dextrano purificado se diluyen en 0,5 ml de agua deuterada y se analizan mediante RMN de protón con el espectrómetro Bruker Avance (500 MHz). Después, los espectros se tratan e

interpretan con el programa informático TOPSPIN 3.0.

de esta manera, se ha revelado mediante análisis de RMN, que el producto sintetizado a partir de 100 g.l⁻¹ de sacarosa, a 30 °C, pH 5.75, es un polímero de unidades de glucosilo unidas al 97,6 % (± 0,2 %) en α-1,6 y al 2,4 % en α-1,3, como se muestra en la figura 6.

Se trata por tanto de un dextrano casi lineal, y esto demuestra nuevamente que la dextransacarasa DSR-OK es una dextransacarasa muy específica de la polimerización mediante enlaces osídicos de tipo α-1,6.

10 Ejemplo 11 - Determinación de las características macromoleculares del dextrano producido por la dextransacarasa DSR-OK recombinante.

La masa molar promedio en número y en peso, y la estructura del dextrano sintetizado por la DSR-OK, se analizaron mediante AFFFF-MALLS (Fraccionamiento asimétrico de flujo de campo de flujo con dispersión de luz láser de múltiples ángulos), a partir de medios de síntesis sin procesar según las condiciones de producción descritas en el ejemplo 9.

Las muestras se diluyeron 500 veces en agua que contenía azida sódica al 0,02 % y se filtraron a través de una membrana Durapore de 0,45 μm antes de la inyección (rendimiento de filtración > 90 %). El procedimiento es el mismo que el utilizado para caracterizar los dextranos de masa molar alta sintetizados por variantes de DSR Δ4N (9). De esta manera, las muestras se inyectan a 0,2 ml.min⁻¹ durante un período de 300 s con un flujo cruzado de 1 ml.min⁻¹. Una vez finalizada la inyección, las muestras se someten a un tiempo de relajación de 60 segundos. La elución se realiza con un flujo de arrastre de 0,84 ml.min⁻¹, a un flujo cruzado constante de 0,1 ml.min⁻¹ durante 3 125 segundos, a temperatura ambiente. Los valores de las masas molares (M_i) y los de los radios de giro (R_{Gi}) se determinan con el programa informático ASTRA versión 5.3.2.13 (Wyatt Technology).

A cada intervalo de tiempo (i), la respuesta refractométrica permite determinar la concentración C_i. La masa molar y el radio de giro se determinan por extrapolación de la relación de la difusión de la luz en ángulo cero, utilizando un diagrama de Berry según:

$$\sqrt{\left(\frac{K_C}{R_\theta}\right)} = \sqrt{\frac{1}{M_i} \left(1 + \frac{16\pi^2 n^2}{3\lambda^2} R_{Gi}^2 \sin^2(\theta/2)\right)}$$

Donde, **K** es la constante óptica, **R_θ**, la relación de Rayleigh, λ, la longitud de onda del rayo láser incidente, **n** el índice de refracción de la luz y θ, el ángulo de observación.

El programa informático ASTRA calcula directamente las masas molares promedio en peso (M_w) y en número (M_n), así como el radio de giro promedio en z (R_{Gz}) según las siguientes relaciones:

$$M_n = \frac{\sum_i c_i}{\sum_i \frac{c_i}{M_i}}$$

$$M_w = \frac{\sum_i c_i M_i}{\sum_i c_i}$$

$$R_{Gz}^2 = \frac{\sum_i c_i M_i R_{Gi}^2}{\sum_i c_i M_i}$$

La relación M_w/M_n representa el índice de dispersión, **D_i**.

La densidad (**d_{Gapp}**) se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$d_{Gapp} = \frac{M_w}{\left(\frac{4\pi}{3}\right) \times R_{Gz}^3}$$

donde **R_{Gw}** representa el radio de giro promedio en peso.

El coeficiente hidrodinámico, **u_G**, se determina a partir de la representación gráfica del radio de giro (R_{Gi}) en función de la masa molar (M_i) y según la ecuación:

$$R_{Gi} = K_G \cdot M_i^{u_G}$$

donde **K_G** es una constante.

El valor del parámetro de ramificación g_M se calcula según con la siguiente relación:

$$g_M = \frac{\overline{R}_{Gw(br)}^2}{\overline{R}_{Gw(lin)}^2}$$

5 donde $R_{Gw(br)}$ y $R_{Gw(lin)}$ representan los radios de giro promedio en peso del polímero ramificado de su equivalente lineal de la misma naturaleza química y de la misma masa molar.

10 De este modo, analizando las características macromoleculares, se ha revelado que el dextrano tiene una masa molar promedio en peso M_w muy alta de aproximadamente $1,01 \cdot 10^9 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ($\pm 0,3 \cdot 10^9 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), como se observa en la figura 7.

La masa molar promedio en número también es elevada, es decir, $M_n = 5,5 \cdot 10^8 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ($\pm 1,6 \cdot 10^8 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$).

15 El índice de dispersión D_i del dextrano producido por DSR-OK es, por tanto, de aproximadamente 1,8, lo que representa un índice muy bajo en comparación con los dextransos producidos hasta ahora.

20 Por ejemplo, en comparación con el dextrano producido por la cepa histórica NRRL B-512F de *L. mesenteroides*, y con el dextrano producido por la enzima DSR-S var del $\Delta 4N$ recombinante, el dextrano producido por la dextransacarasa DSR-OK es de mayor tamaño y es significativamente menos polidisperso que el dextrano nativo producido por la cepa NRRL B-512F de *L. mesenteroides*.

25 El radio de giro del polímero también es extremadamente elevado, del orden de 370 nm (figura 9). El coeficiente hidrodinámico, es decir, la pendiente del gráfico que representa el radio de giro en función de la masa molar (figura 9) es de 0,48. Este valor muestra que se trata de un polímero casi lineal, muy poco ramificado.

La Tabla 2 revela las principales características macromoleculares del dextrano producido por la DSR-OK recombinante.

30

Tabla 2

Característica	Valor
M_w (masa molar promedio en peso)	$1 \cdot 10^9 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \pm 0,3 \cdot 10^9 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
M_n (masa molar promedio en número)	$5,5 \cdot 10^8 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \pm 1,6 \cdot 10^8 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
$D_i = M_w/M_n$ (índice de dispersión)	$1,8 \pm 0,3$
R_{Gz} (radio de giro promedio en z)	$370 \text{ nm} \pm 18,5 \text{ nm}$
d_{Gapp} (densidad aparente)	$8,2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ nm}^3 \pm 2,2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ nm}^3$
u_G (coeficiente hidrodinámico)	$0,48 \pm 0,02$
g_M (parámetro de ramificación promedio)	$0,0158 \pm 0,004$

Ejemplo 12: Análisis del comportamiento reológico del dextrano producido por la dextransacarasa DSR-OK recombinante.

35 *Curva de flujo y determinación del umbral de flujo de dextrano en su medio de síntesis sin procesar a partir de diferentes concentraciones de sacarosa.*

40 Las síntesis se realizaron en un volumen total de 20 ml, a partir de diferentes concentraciones iniciales de sacarosa (50, 75, 100 y 150 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$), en tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 5,75, a 1 $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$ de enzima. La temperatura y la agitación se establecieron a 30 °C y a 60 rpm. La reacción enzimática se realizó durante un período de 15 horas.

45 Los análisis reológicos de dextrano (en su medio de síntesis sin procesar) se realizaron en el reómetro HAAKE MARS III de Thermo Scientific, controlado por el programa informático HAAKE RheoWin 4. Todas las mediciones se determinaron utilizando una geometría plano-plano (35 mm de diámetro), a un entrehierro de 0,5 mm, a 20 ° (MTMC MarsIII peltier) y a presión atmosférica.

50 Las curvas de flujo se obtuvieron modificando el gradiente de velocidad de 10^{-1} a 10^3 s^{-1} . Los valores de umbral de flujo se determinaron a partir de la representación gráfica trazando los valores de la tensión en función del gradiente de velocidad. El umbral de flujo está determinado por la tensión obtenida a la velocidad de cizalla más baja (que tiende hacia una meseta)

Curva de viscosidad y medidas viscoelásticas del dextrano purificado

El polímero, purificado por dos precipitaciones con etanol y liofilizado, se resuspende a 50 μl^{-1} en agua destilada y se

solubiliza durante una noche a 25 °C, con suave agitación. Las propiedades reológicas se miden con un reómetro de deformación controlada (ARES, TA.) utilizando una geometría de plano cónico (5 cm de diámetro, ángulo de cono de 0,05 rad) a 20 °C y a presión atmosférica. La curva de flujo se determina modificando el gradiente de velocidad de 10^{-2} a 10^2 s⁻¹. Los espectros mecánicos (módulos G' y G'' en función de la frecuencia) se determinan dinámicamente, modificando la frecuencia de 10^{-2} a 10^2 rad.s⁻¹, a una amplitud de deformación controlada ubicada en el dominio de viscoelasticidad lineal.

Se observa que el polímero de dextrano es muy viscoso a simple vista y que es necesario aplicar una fuerza para que fluya.

En la figura 10 se muestran las curvas de flujo determinadas a partir del medio de síntesis sin procesar para diferentes concentraciones iniciales de sacarosa (50, 75, 100 y 150 g.l⁻¹) y en la figura 11 se muestran las curvas de flujo determinadas a partir de polímero purificado por precipitación con alcohol y preparado a una concentración del 5 % (p/v) en agua destilada.

En ambos casos, la viscosidad dinámica de la solución es muy elevada para velocidades de cizalla bajas (del orden de 100 Pa.s a 0,1 s⁻¹, figuras 10 y 11). El polímero adopta un comportamiento reofluidificante o pseudoplástico, es decir, su viscosidad dinámica disminuye a medida que aumenta el gradiente de velocidad (o velocidad de cizalla).

Como se observa en la figura 14, el dextrano producido por la dextransacarasa DSR-OK tiene una viscosidad que es aproximadamente 500 veces mayor que la del dextrano nativo producido por la cepa NRRL B-512F de *L. mesenteroides* para esfuerzos de cizalla aplicados bajos. Asimismo, a diferencia de los dextranos producidos por DSR-OK o DSR-S vandel Δ4N, que son reofluidificantes, el dextrano nativo tiene un comportamiento newtoniano.

Además, El dextrano en solución tiene un umbral de flujo. De esta manera, se midieron umbrales de flujo de 26 Pa y 38 Pa para el dextrano en el medio de síntesis sin procesar a partir de 100 g.l⁻¹ y 200 g.l⁻¹ de sacarosa respectivamente (figura 12).

En comparación, el dextrano del medio de síntesis producido por la enzima DSR-S vandel Δ4N recombinante a partir de 100 g.l⁻¹ tiene un umbral de flujo de 12 Pa.

Para productos que requieren un umbral de flujo, podrían utilizarse concentraciones bajas de dextrano, por ejemplo, como reemplazo de la solución de goma de xantano o de solución de guar, utilizadas como agentes espesantes y con umbrales de flujo a 10 g.l⁻¹ de 7 y 4 Pa, respectivamente. Por lo tanto, el dextrano de conformidad con la presente invención puede utilizarse en productos de tipo dentífrico, salsas etc.

Ensayos de barridos de frecuencia, en condiciones oscilatorias, indican por otro lado que el polímero es un gel débil. En efecto, como se muestra en la figura 13, el módulo elástico G' es superior al módulo viscoso G'' en el intervalo de frecuencias ensayadas, de 10^{-2} a 10^2 rad.s⁻¹.

Finalmente, se observa que la viscosidad del polímero producido por DSR-OK se mantiene estable cuando se aplican tensiones de cizalla constantes de larga duración, mientras que la viscosidad del polímero producido por DSR-S vandel Δ4N disminuye en las mismas condiciones (figura 15). Por lo tanto, el dextrano de conformidad con la presente invención, puede utilizarse en procedimientos industriales en los que se requiere una agitación permanente.

Ejemplo 13: Determinación de la temperatura de transición vítrea y del contenido hídrico del dextrano producido por la dextransacarasa DSR-OK recombinante.

El polímero purificado por dos precipitaciones con etanol y liofilizado se equilibra a 57 % y 43 % de humedad relativa al colocarlo al vacío en presencia de soluciones saturadas de NaBr y K₂CO₃ a temperatura ambiente durante una semana. Las temperaturas de transición vítrea (T_g) se determinan mediante un sistema de análisis de entalpía diferencial, el DSC Q100 (TA Instruments, Francia). El dispositivo está calibrado con indio. Las mediciones se efectúan en 2 a 30 mg de muestra utilizando cápsulas de aluminio selladas (TA Instruments, Guyancourt, Francia), calentadas de 0 a 120 °C a 3 °C min⁻¹. Se realizaron dos escaneos de calentamiento, separados por una fase de enfriamiento de 0 °C a 10 °C min⁻¹, para evitar cualquier firma debido al envejecimiento de la muestra. Como referencia se utiliza una cápsula vacía. La temperatura de transición vítrea (T_g) se toma en el punto de inflexión de cambio de capacidad calorífica.

El contenido hídrico se determina después de cada medición calorimétrica por análisis termogravimétrico (TGA) utilizando un sistema TGA2050 (TA). Instruments, New Castle, DE, U.S.A.). El contenido hídrico corresponde a la pérdida de masa cuando la muestra se calienta a 130 °C a 10 °C min⁻¹ y después se mantiene a esta temperatura durante 40 minutos.

Los análisis de DSC (siglas del inglés *Differential Scanning Calorimetry*, calorimetría diferencial de barrido) permitieron determinar temperaturas de transición vítrea de 95 °C (± 1 °C) para un contenido hídrico de 6,6 % y de 25 °C (± 1 °C) para un contenido hídrico de 12,9 %.

Por tanto, para un contenido hídrico de aproximadamente 13 %, el polímero tendrá un estado correoso a temperaturas superiores a 25 °C y será considerado como "quebradizo" por debajo de 25 °C.

5 REFERENCIAS

- (1) Characterization of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F dextranucrase (DSRS) and identification of amino-acid residues playing a key role in enzyme activity, Monchois y col., Applied Microbiology and Biotechnology, octubre de 1997, vol 48, edición 4, 465-472
- 10 (2) High-level production and purification of a fully active recombinant dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, Moulis y col., FEMS Microbiology Letters, agosto de 2006, vol 261, Tema 2, 203-210
- (3) Functional Divergence in the Genus *Oenococcus* as Predicted by Genome Sequencing of the Newly-Described Species, *Oenococcus kitaharae*, Borneman y col., PloS ONE, enero de 2012, vol. 7, Tema 1
- 15 (4) *Oenococcus kitaharae* sp. nov., a non-acidophilic and non-malolactic-fermenting oenococcus isolated from a composting distilled shochu residue, Akihito Endo y Sanae Okada, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (2006), 56, 2345-2348
- (5) Glucanases: Three-dimensional structures, reactions, mechanism, alpha-glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications Lemhuis et al., Journal of Biotechnology, enero de 2013, vol 20 163, Tema 2, 250-272
- (6) Dextran: effect of process parameters on production, purification and molecular weight and recent applications, Vettori y col., Diálogos & Ciência, ISSN 1678-0493, no 31, septiembre de 2012
- (7) Functional Polymers Based on Dextran, Thomas Heinze, Tim Liebert, Brigitte Heublein, Stephanie Hornig, Adv Polym Sci (2006) 205: 199-291, DOI 10.1007/12_100.
- 25 (8) Structure and macromolecular properties of *Weissella confusa* and *Leuconostoc citreum* dextrans with a potential application in sourdough, Ndegwa Henry Maina, 1 de junio de 2012, University of Helsinki, Department of Food and Environmental Sciences, Chemistry and Biochemistry Division.
- (9) Structure and Property Engineering of alpha-D-Glucans Synthesized by Dextranucrase Mutants, Irague et al, BioMacromolecules, 2012, vol 13, Tema 1, 187-195.
- 30 (10) A method for determination of invertase activity, Sumner & Howell, Journal of biological chemistry, 1935, vol 108, Tema 51
- (11) Online Determination of Structural Properties and Observation of Deviations from Power Law Behavior, Rolland-Sabaté et al, Biomacromolecules, 2008, vol 9, 1719-1730.

35 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> INSA
- <120> Dextranos que tienen una masa molar muy alta
- 40 <130> BCT150191 QT
- <160> 3
- 45 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 1484
- <212> PRT
- 50 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> *Oenococcus kitaharae*
- 55 <400> 1

ES 2 748 388 T3

Met Met Ala Thr Gly Ser Asn Leu Ile Thr Ala Gln Ala Asp Asp Leu
 1 5 10 15

Asn Gln Glu Gly Thr Ala Ala Gln Ser Val Ser Pro Ser Thr Ala Ala
 20 25 30

Ala Asn Gln Ser Glu Ser Ser Ala Gln Ser Thr Glu Gln Ser Ala Thr
 35 40 45

Gln Ala Ala Thr Asp Gly Glu Ala Ser Thr Val Ser Thr Ala Val Thr
 50 55 60

Thr Ile Thr Pro His Tyr Val Gln Gln Ala Gly Lys Trp Leu Tyr Met
 65 70 75 80

Gly Ser Asp Gly Glu Phe Val Lys Gly Pro Gln Thr Ile Asp Gly Asn
 85 90 95

Leu Gln Phe Phe Asp Glu Gln Gly Ile Gln Ile Lys Gly Ser Phe Glu
 100 105 110

Thr Val Asp Gly Ser Ser Tyr Tyr Phe Asp Ser Gln Ser Gly Asn Ala
 115 120 125

Val Thr Gly Phe Lys Ile Ile Asn Asn Asp Leu His Tyr Phe Glu Glu
 130 135 140

Asp Gly Lys Glu Thr Val Asn Asn Tyr Ala Thr Asp Lys Gln Gly Asn
 145 150 155 160

Ile Phe Tyr Phe Asp Glu Asn Gly Gln Met Ala Thr Gly Val Lys Thr

ES 2 748 388 T3

				165						170						175
Ile	Gln	Gly	Gln	Ser	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Gln	Asp	Gly	His	Met	Arg	Lys	
			180					185					190			
Gly	Tyr	Ser	Gly	Val	Phe	Asp	Asn	Gln	Val	Leu	Tyr	Phe	Asp	Lys	Thr	
		195					200					205				
Thr	Gly	Ala	Leu	Ala	Asn	Thr	Asn	Val	Ser	Ser	Ile	Lys	Glu	Gly	Leu	
	210					215					220					
Thr	Ala	Gln	Asn	Asp	Asp	Phe	Thr	Ala	His	Asn	Ala	Val	Tyr	Ser	Thr	
225					230					235					240	
Lys	Ser	Glu	Ser	Phe	Thr	Asn	Ile	Asp	Gly	Tyr	Leu	Thr	Ala	Glu	Ala	
				245					250					255		
Trp	Tyr	Arg	Pro	Ala	Asp	Ile	Leu	Glu	Asn	Gly	Thr	Asp	Trp	Arg	Ala	
			260					265					270			
Ser	Arg	Ala	Asp	Glu	Phe	Arg	Pro	Ile	Leu	Thr	Thr	Trp	Trp	Pro	Asp	
		275					280					285				
Lys	Gln	Thr	Glu	Val	Asn	Tyr	Leu	Asn	Tyr	Met	Lys	Thr	Gln	Gly	Phe	
	290					295					300					
Ile	Thr	Asn	Asp	Gln	Asp	Phe	Lys	Leu	Ser	Asp	Asp	Gln	Leu	Leu	Leu	
305					310					315					320	
Asn	His	Ala	Ala	Gln	Ser	Val	Gln	Gly	Glu	Ile	Glu	Lys	Lys	Ile	Ser	
				325					330					335		
Gln	Gln	Gly	Ser	Thr	Asp	Trp	Leu	Lys	Thr	Leu	Leu	Gln	Thr	Phe	Ile	
			340					345					350			
Asn	Gln	Gln	Pro	Ser	Trp	Asn	Gly	Glu	Ser	Glu	Asp	Pro	Gly	Ser	Asp	
		355					360					365				
His	Leu	Gln	Gly	Gly	Ala	Leu	Thr	Phe	Val	Asn	Ser	Pro	Leu	Thr	Pro	
	370					375					380					
Asp	Ser	Asn	Ser	Asn	Phe	Arg	Leu	Leu	Asn	Arg	Thr	Pro	Thr	Asn	Gln	
385					390					395					400	
Thr	Gly	Thr	Pro	Gln	Tyr	Asp	Thr	Asp	Ala	Ser	Leu	Gly	Gly	Phe	Glu	
				405					410					415		

ES 2 748 388 T3

Leu Leu Leu Ala Asn Asp Val Asp Asn Ser Asn Pro Val Val Gln Ala
 420 425 430

Glu Gln Leu Asn Trp Leu Tyr Tyr Leu Leu Asn Phe Gly Ser Ile Thr
 435 440 445

Ala Asp Asp Pro Asn Ala Asn Phe Asp Gly Ile Arg Ile Asp Ala Val
 450 455 460

Asp Asn Val Asp Ala Asp Leu Leu Gln Ile Ala Ala Ala Tyr Phe Lys
 465 470 475 480

Asp Ala Phe Lys Ser Gly Ser Asn Asp Gln Thr Thr Asn Gln His Leu
 485 490 495

Ser Ile Leu Glu Asp Trp Ser His Asn Asp Pro Glu Tyr Met Lys Ala
 500 505 510

Gln Gly Tyr Pro Gln Leu Thr Met Asp Asp Tyr Met His Thr Gln Leu
 515 520 525

Ile Trp Ser Leu Thr Lys Pro Asp Asn Ile Arg Gly Thr Met Gln Arg
 530 535 540

Phe Met Asp Tyr Tyr Leu Val Asn Arg Ala Asn Asp Ser Thr Asn Asn
 545 550 555 560

Glu Ala Val Ala Asn Tyr Ser Phe Val Arg Ala His Asp Ser Glu Val
 565 570 575

Gln Thr Val Ile Ala Gln Ile Ile Ser Asp Leu Tyr Pro Asn Ser Gly
 580 585 590

Ser Gly Leu Ile Pro Thr Thr Asp Gln Leu Gln Ala Ala Phe Glu Val
 595 600 605

Tyr Asn Ala Asp Met Lys Ser Asp Val Lys Lys Tyr Thr Gln Tyr Asn
 610 615 620

Ile Pro Ser Ala Tyr Ala Met Leu Leu Thr Asn Lys Asp Thr Val Pro
 625 630 635 640

Arg Val Tyr Tyr Gly Asp Met Tyr Thr Asp Asp Gly Asp Tyr Met Ala
 645 650 655

Asn Lys Ser Pro Tyr Phe Asp Ala Ile Ser Thr Leu Leu Lys Ala Arg
 660 665 670

ES 2 748 388 T3

Val Lys Tyr Ala Ala Gly Gly Gln Ser Met Ala Val Asp Lys Asn Asp
675 680 685

Ile Leu Thr Ser Val Arg Phe Gly Gln Asn Ala Met Leu Ala Ser Asp
690 695 700

Ser Gly Asp Asn Gln Thr Arg Gln Glu Gly Ile Gly Val Ile Val Ser
705 710 715 720

Asn Asn Ser His Leu Lys Leu Ala Glu Asn Asp Gln Val Val Leu His
725 730 735

Met Gly Ala Ala His Lys Asn Gln Ala Phe Arg Ala Leu Leu Leu Thr
740 745 750

Ile Glu Ser Gly Leu Glu Asn Phe Asp Thr Asp Leu Gln Ala Pro Val
755 760 765

Lys Tyr Thr Asp Ala Asn Gly Asp Leu Ile Phe Thr Ala Ala Glu Leu
770 775 780

Ala Gly Tyr Leu Asn Pro Glu Val Ser Gly Tyr Leu Ser Ala Trp Val
785 790 795 800

Pro Val Gly Ala Ala Asp Asn Gln Asp Ala Arg Thr Ala Ala Asp Ser
805 810 815

Ala Thr Ser Thr Asp Gly Asn Val Phe His Ser Asn Ala Ala Leu Asp
820 825 830

Ser Asn Val Ile Phe Glu Gly Phe Ser Asn Phe Gln Ser Ile Pro Thr
835 840 845

Ala Glu Gln His Asp Asp Phe Thr Asn Val Lys Ile Ala Glu Asn Ala
850 855 860

Gly Leu Phe Lys Asp Trp Gly Ile Thr Ser Phe Gln Leu Ala Pro Gln
865 870 875 880

Tyr Arg Ser Ser Thr Asp Ser Thr Phe Leu Asp Ser Ile Ile Gln Asn
885 890 895

Gly Tyr Ala Phe Thr Asp Arg Tyr Asp Leu Gly Phe Asp Thr Pro Thr
900 905 910

Lys Tyr Gly Asp Val Asp Asp Leu Arg Ala Ala Ile Lys Ala Leu His
915 920 925

ES 2 748 388 T3

Ala Asn Asn Ile Gln Val Met Ala Asp Trp Val Pro Asp Gln Ile Tyr
930 935 940

Asn Leu Gln Asn Pro Glu Ile Ile Thr Val Asn Arg Thr Asp Ser Tyr
945 950 955 960

Gly Gln Pro Ile Ala Gly Ser Asp Leu Gln Asn Asp Leu Tyr Leu Ala
965 970 975

Tyr Thr Asn Gly Gly Gly Gln Tyr Gln Thr Lys Phe Gly Gly Ala Phe
980 985 990

Leu Glu Lys Leu Gln Gln Leu Tyr Pro Asp Leu Phe Thr Lys Thr Gln
995 1000 1005

Ile Ser Thr Gly Gln Thr Ile Asp Pro Ser Gln Lys Ile Thr Glu
1010 1015 1020

Trp Ser Ala Lys Tyr Phe Asn Gly Ser Asn Ile Gln Gly Arg Gly
1025 1030 1035

Ala Tyr Tyr Val Leu Arg Asp Ser Gly Thr Asp Gln Tyr Phe Lys
1040 1045 1050

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

Thr Asn Gln Pro Gly Glu Thr Gly Phe Ser Gln Asp Asp Gln Gly
1070 1075 1080

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

Val Gln Gly Asp Asp Gly Asn Tyr Tyr Tyr Phe Asp Asn Thr Gly
1100 1105 1110

His Met Val Thr Gly Pro Gln Thr Ile Asn Gly Arg His Tyr Leu
1115 1120 1125

Phe Phe Pro Asn Gly Val Glu Ala Gln Asn Val Phe Val Gln Asn
1130 1135 1140

Asp Arg Gly Glu Thr Tyr Tyr Tyr Asp Gln Arg Gly Arg Gln Val
1145 1150 1155

Ala Asn Gln Tyr Val Thr Asp Thr Asn Gly Asn Ser Phe Arg Phe

ES 2 748 388 T3

1160						1165						1170			
Asp	Glu	Asn	Gly	Ile	Met	Leu	Ala	Asn	Gln	Leu	Ala	Gln	Val	Asp	
1175						1180					1185				
Gly	His	Trp	Gln	Phe	Phe	Lys	Ser	Ser	Gly	Val	Gln	Ala	Lys	Asp	
1190						1195					1200				
Ala	Phe	Ile	Leu	Gly	Ser	Asp	Gly	Lys	Leu	Arg	Tyr	Phe	Glu	Ser	
1205						1210					1215				
Gly	Asn	Gly	Asn	Met	Ala	Val	Asn	Glu	Phe	Lys	Gly	Ser	Glu	Asn	
1220						1225					1230				
Gly	Arg	Tyr	Tyr	Tyr	Phe	Gly	Ala	Asp	Gly	Gln	Ala	Val	Ser	Gly	
1235						1240					1245				
Leu	Gln	Thr	Ile	Asn	Gly	Arg	Gln	Leu	Tyr	Phe	Asp	Asp	His	Gly	
1250						1255					1260				
Gln	Gln	Met	Lys	Asp	Ala	Phe	Tyr	Thr	Asn	Gln	Ser	Gly	Gln	Arg	
1265						1270					1275				
Phe	Tyr	Phe	Asn	Ala	Leu	Thr	Gly	Asp	Leu	Val	Lys	Gly	Asn	Phe	
1280						1285					1290				
Ile	Tyr	Thr	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Phe	Thr	Pro	Asp	Asn	Asp	Ser	
1295						1300					1305				
Ser	Asp	Ser	Tyr	Gln	Gly	Asp	Ser	His	Leu	Trp	Tyr	Tyr	Ala	Asp	
1310						1315					1320				
Ser	Gln	Gly	Gln	Ile	Val	Thr	Gly	Phe	Gln	Thr	Ile	Asn	Gly	His	
1325						1330					1335				
Leu	Gln	Tyr	Phe	Asp	Asp	Ile	Ser	Gly	Gln	Met	Ile	Thr	Asn	Arg	
1340						1345					1350				
Phe	Met	Arg	Arg	Ala	Asp	Gly	Asn	Trp	Ile	Tyr	Leu	Asp	Glu	Asn	
1355						1360					1365				
Gly	Glu	Ala	Val	Arg	Gly	Met	Arg	Val	Ile	Asn	Gly	Leu	Thr	Asn	
1370						1375					1380				
Tyr	Phe	Arg	Asp	Asp	Phe	Thr	Gln	Val	Lys	Asp	Gly	Phe	Ala	Gln	
1385						1390					1395				

ES 2 748 388 T3

Asp Pro Asn Ser Gly Glu Arg His Tyr Phe Asn Gly Thr Asn Gly
 1400 1405 1410
 Ala Met Val Thr Asn Asp Tyr Phe Ser Pro Asp Gln Ile His Trp
 1415 1420 1425
 Tyr Tyr Ala Asp Asp Ser Gly Gln Pro Val Thr Gly Phe Gln Thr
 1430 1435 1440
 Ile Lys Gly Gln Val Gln Tyr Phe Asp Gln Asp Gly Ile Gln Leu
 1445 1450 1455
 Lys Gly Gly Ser Gln Thr Asp Pro Val Thr Lys Gln Thr Tyr Tyr
 1460 1465 1470
 Phe Asp Asp Lys Phe Gly Asn Gly Gln Ile Leu
 1475 1480

5 <210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador
 <400> 2
 caccatgatg gcgaccggct c 21

15 <210> 3
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador
 <400> 3
 gaggatttga ccggttccaa acttatcg 28

REIVINDICACIONES

- 5 1. Dextranos **caracterizados por que** tienen entre 95 % y 99 %, preferentemente entre 97 % y 98 %, preferentemente aún entre 97,4 % y 97,6 %, de enlaces glucosídicos α -1,6, una masa molar promedio en peso M_w al menos igual a $0,7 \cdot 10^9 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ y un índice de dispersión D_i comprendido entre 1,3 y 3.
2. Dextranos según la reivindicación 1, **caracterizados por que** tienen una masa molar promedio en peso M_w al menos igual a $1 \cdot 10^9 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.
- 10 3. Dextransacarasa que tiene al menos 80 %, preferentemente 85 %, preferentemente aún 90 %, preferentemente aún 95 %, preferentemente aún 98 % de identidad con la secuencia que va de las posiciones 359 a 1038 de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, no teniendo la dextransacarasa, como secuencia de aminoácidos, la secuencia SEQ ID NO: 1.
- 15 4. Procedimiento de fabricación de dextranos según la reivindicación 1 o 2, que comprende la reacción de una dextransacarasa que tiene como secuencia de aminoácidos la secuencia SEQ ID NO: 1, o al menos 80 %, preferentemente 85 %, preferentemente aún 90 %, preferentemente aún 95 %, preferentemente aún 98 % de identidad con la secuencia que va de las posiciones 359 a 1038 de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 con sacarosa.
- 20 5. Procedimiento de fabricación según la reivindicación 4, **caracterizado por que** la reacción se realiza a una temperatura comprendida entre 20 °C y 40 °C, preferentemente comprendida entre 25 °C y 35 °C, preferentemente aún comprendida entre 30 °C y 33 °C.
- 25 6. Procedimiento de fabricación según la reivindicación 4 o 5, **caracterizado por que** la concentración de sacarosa está comprendida entre aproximadamente 50 y 200 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, preferentemente, entre aproximadamente 50 y 150 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$.
- 30 7. Procedimiento de fabricación según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, **caracterizado por que** durante la reacción el pH está comprendido entre aproximadamente 5 y 6,5, preferentemente entre 5 y 6, preferentemente aún entre 5 y 5,8.
- 35 8. Composición cosmética o alimentaria que comprende dextranos según la reivindicación 1 o 2 y al menos un soporte farmacéuticamente aceptable o alimentario.
9. Uso de dextranos según la reivindicación 1 o 2 como agente espesante, gelificante y/o texturizante.

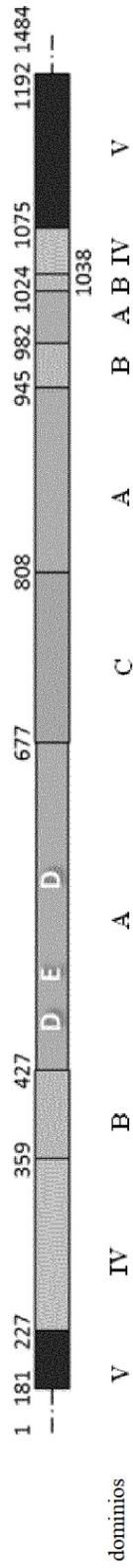


Figura 1

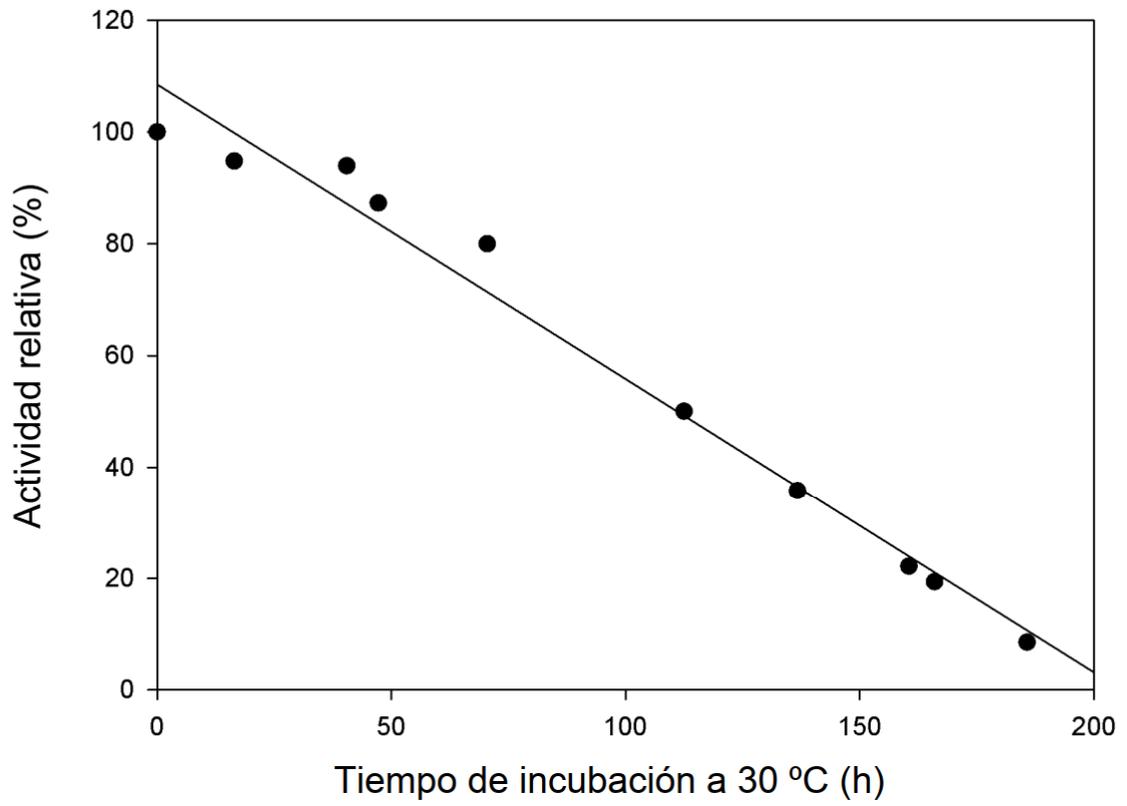


Figura 2

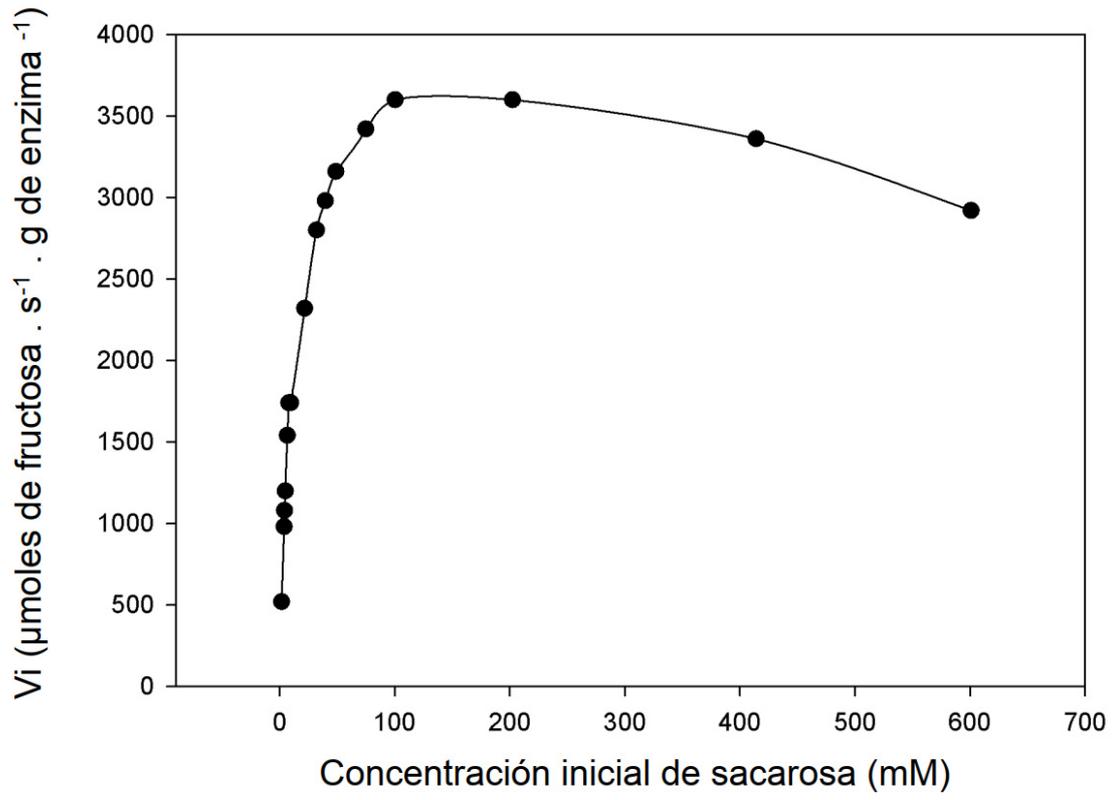


Figura 3

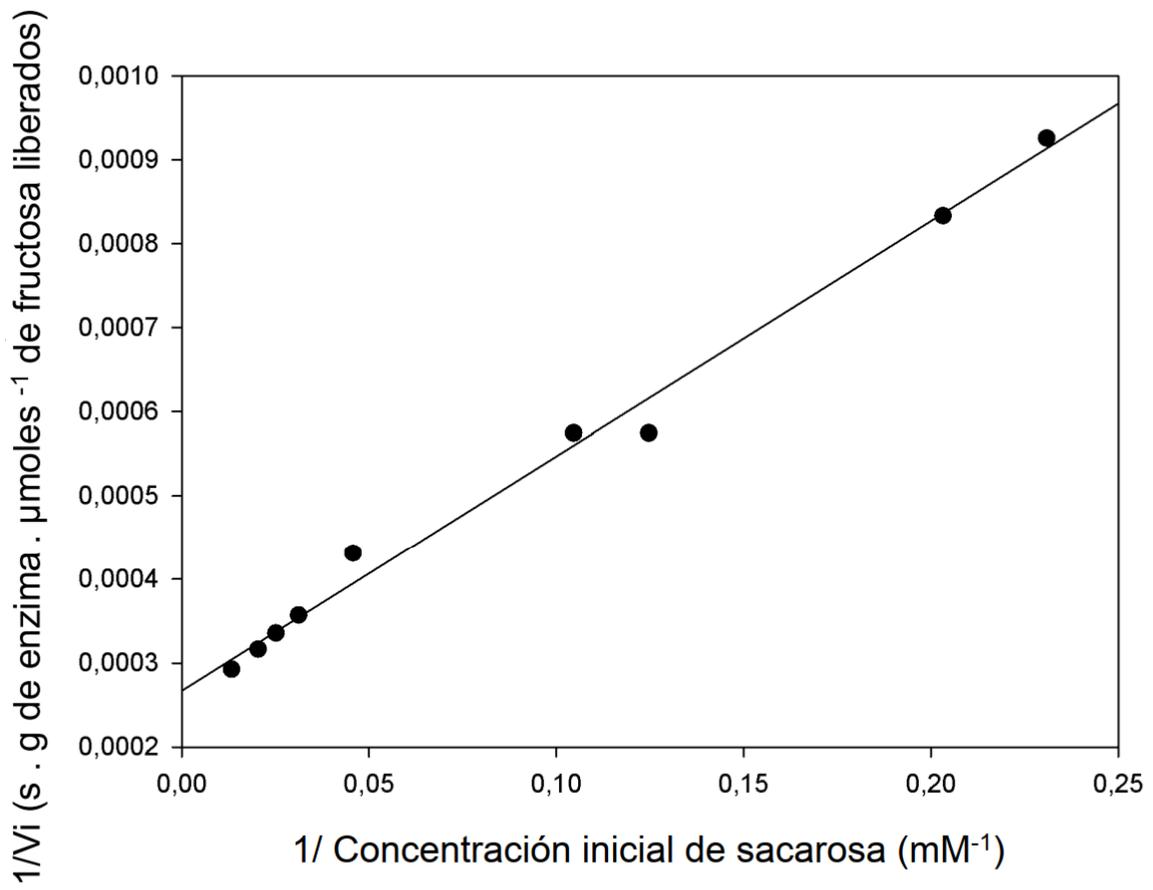


Figura 4

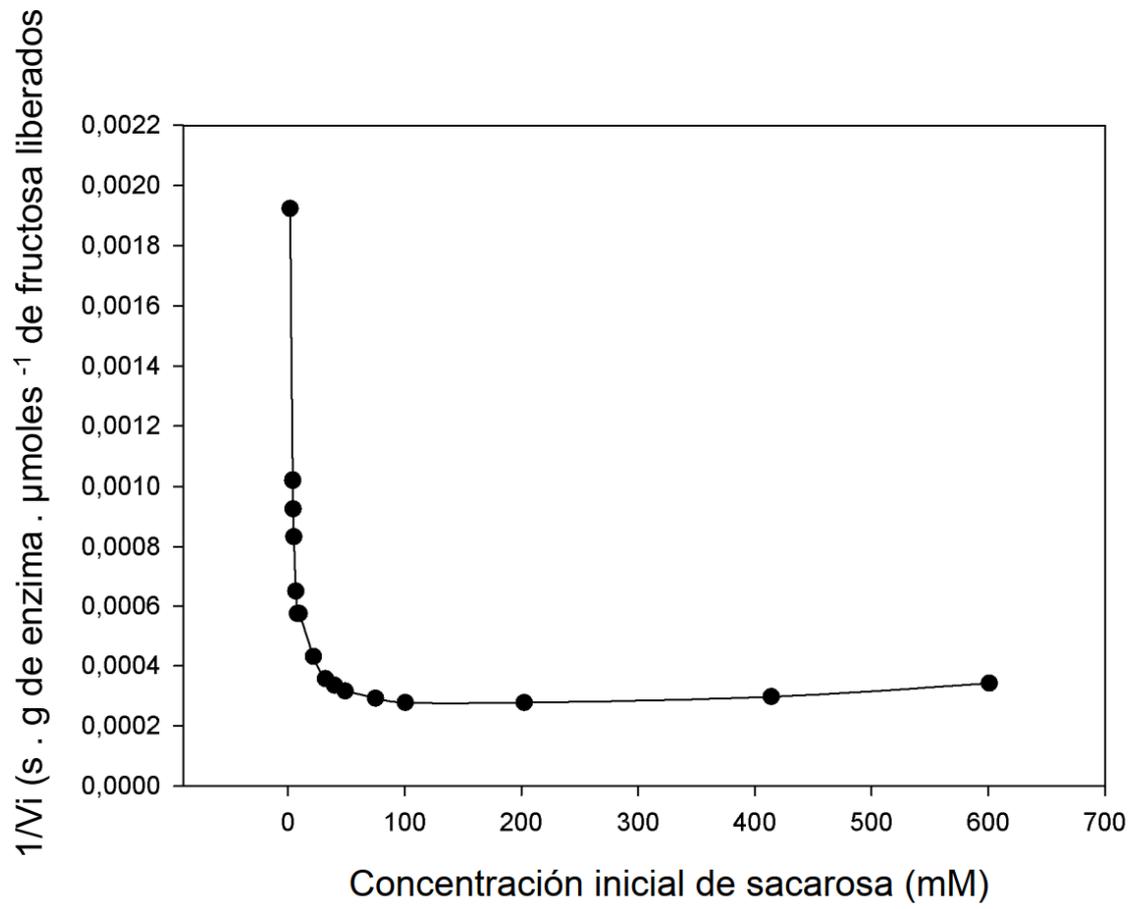


Figura 5

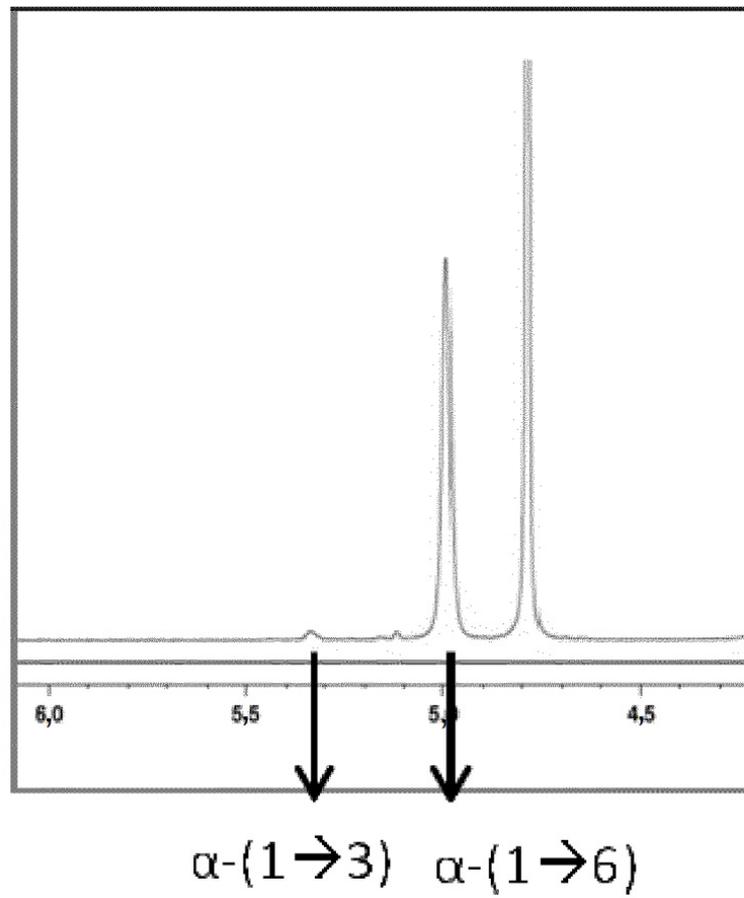


Figura 6

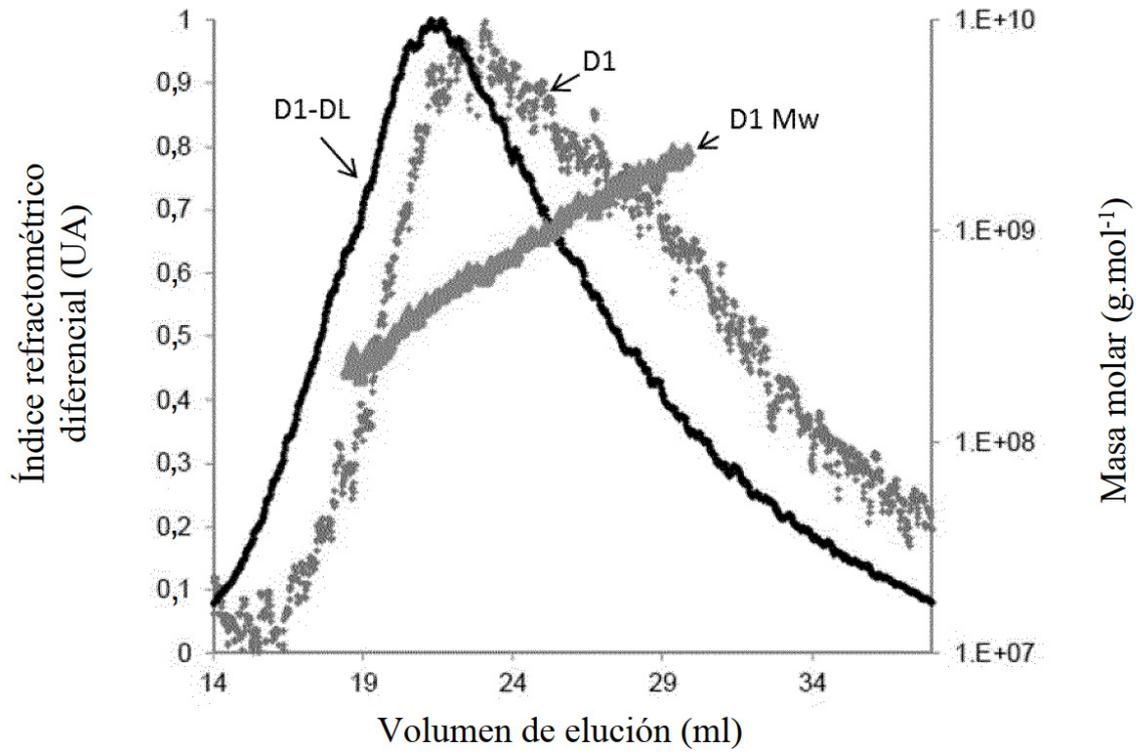


Figura 7

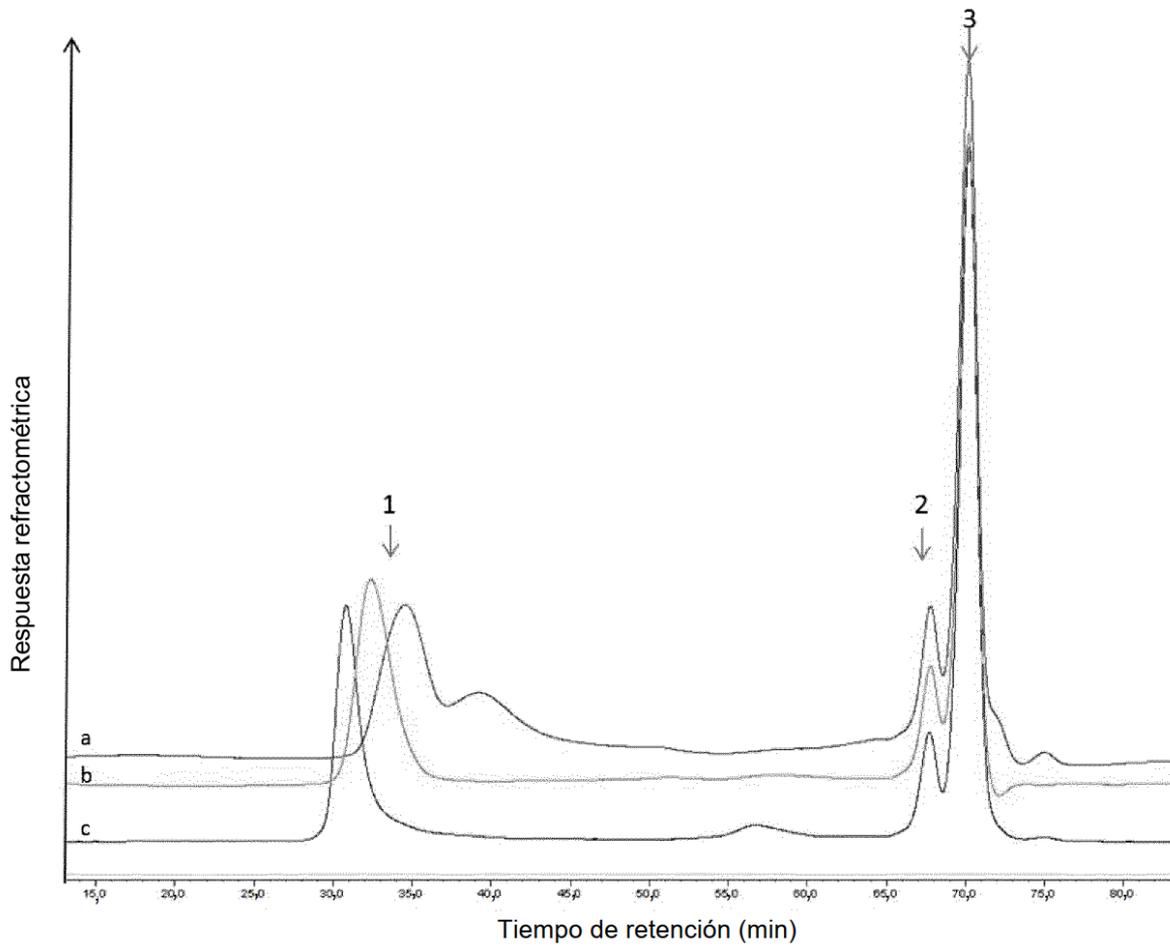


Figura 8

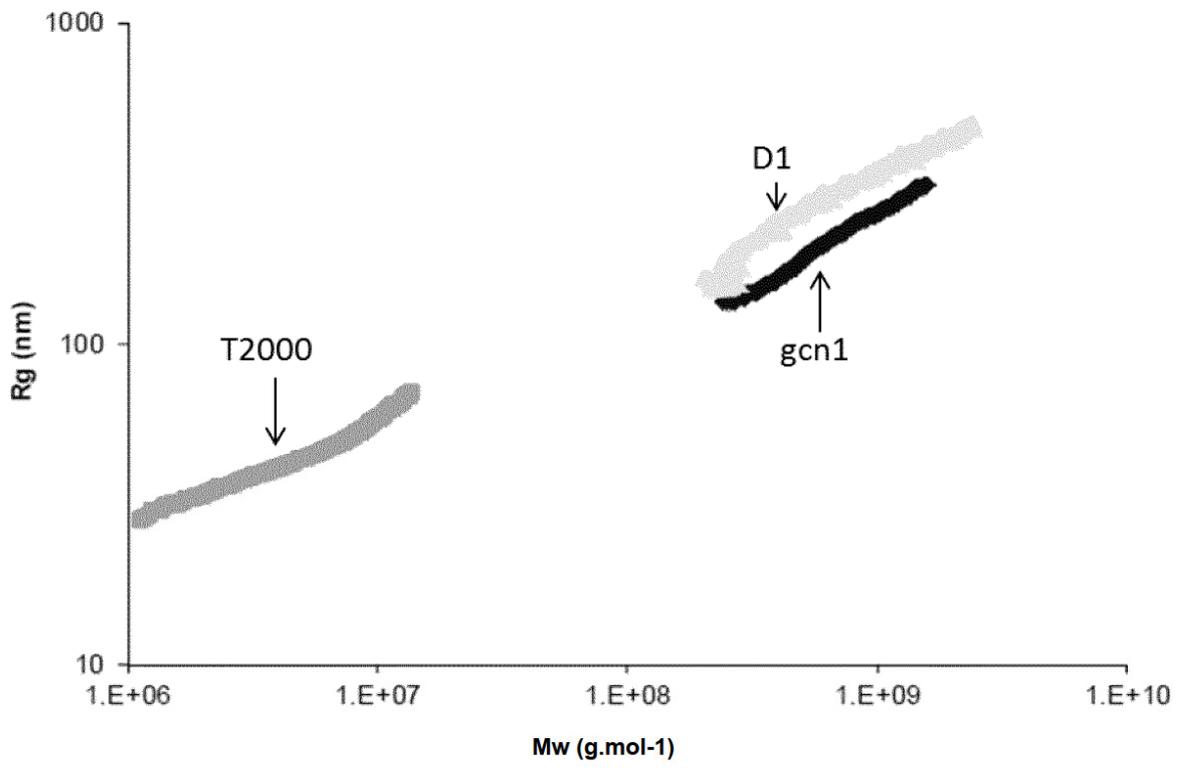


Figura 9

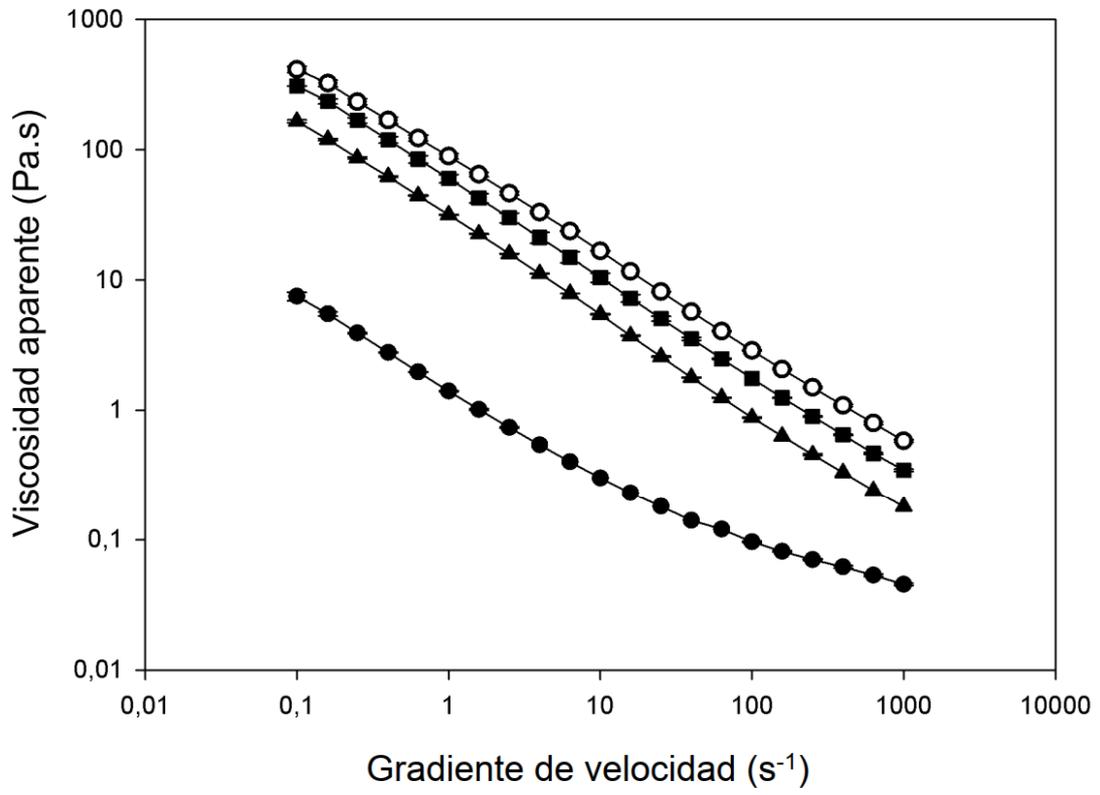


Figura 10

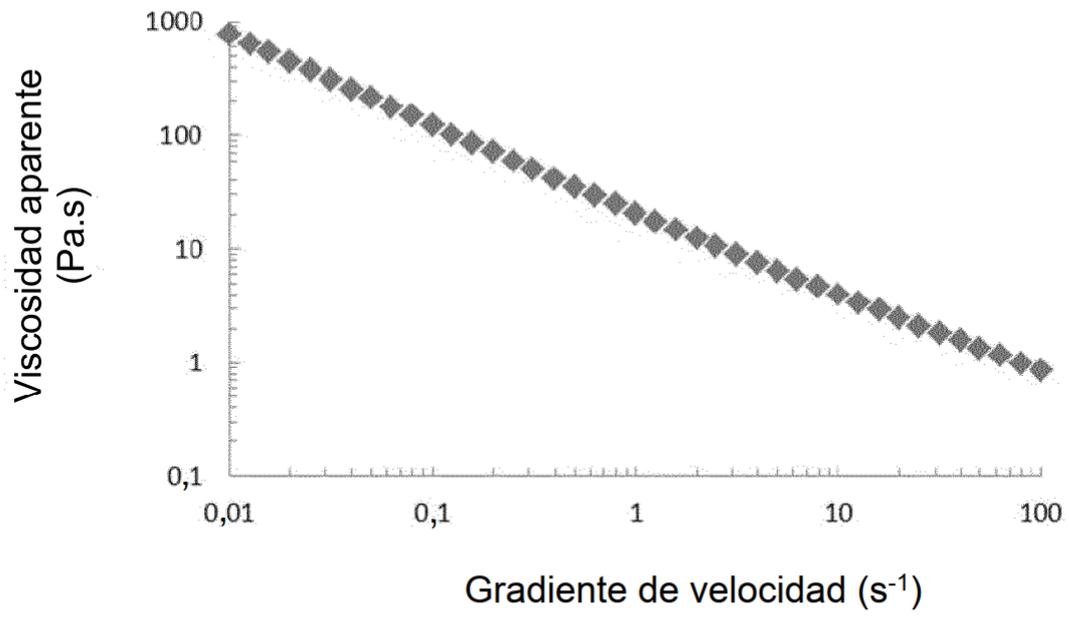


Figura 11

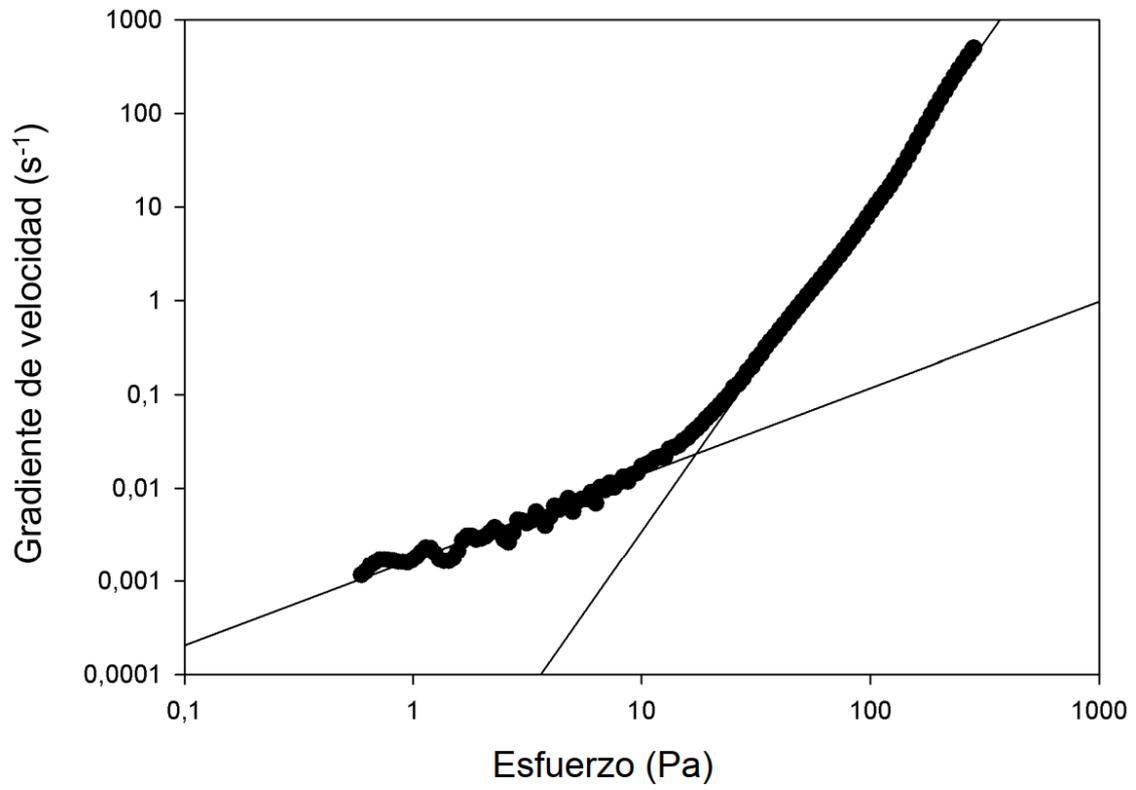


Figura 12

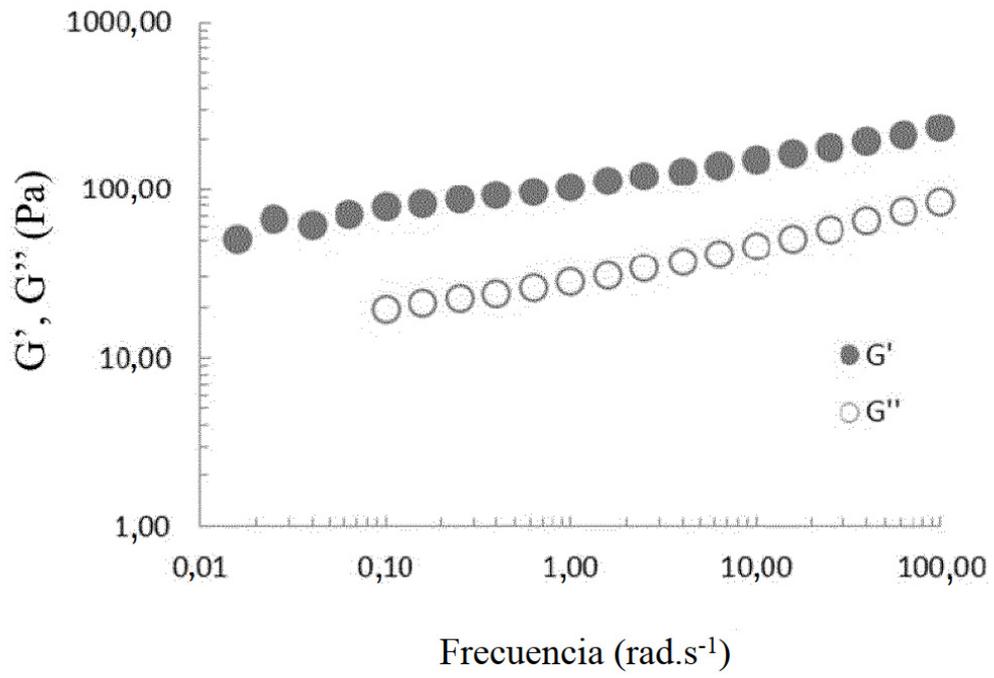


Figura 13

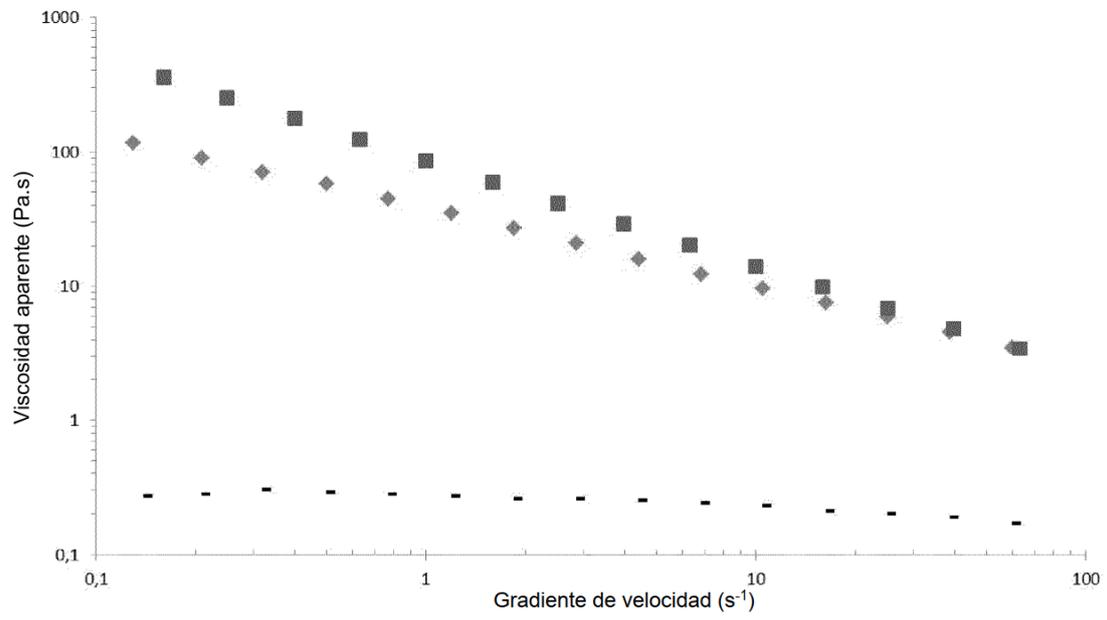
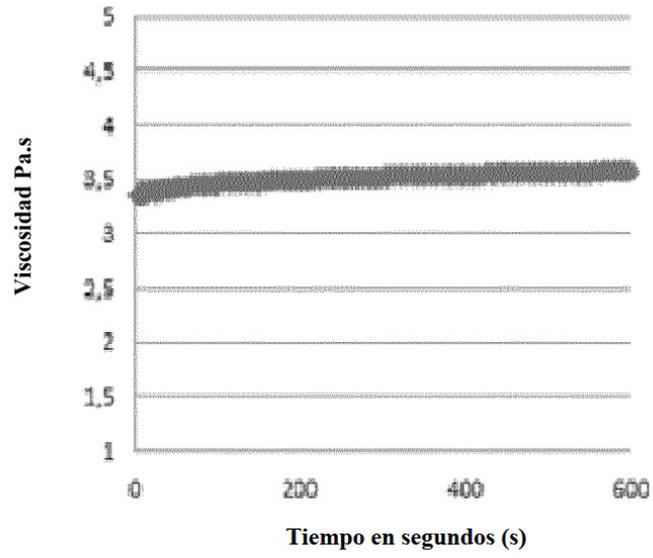


Figura 14

A



B

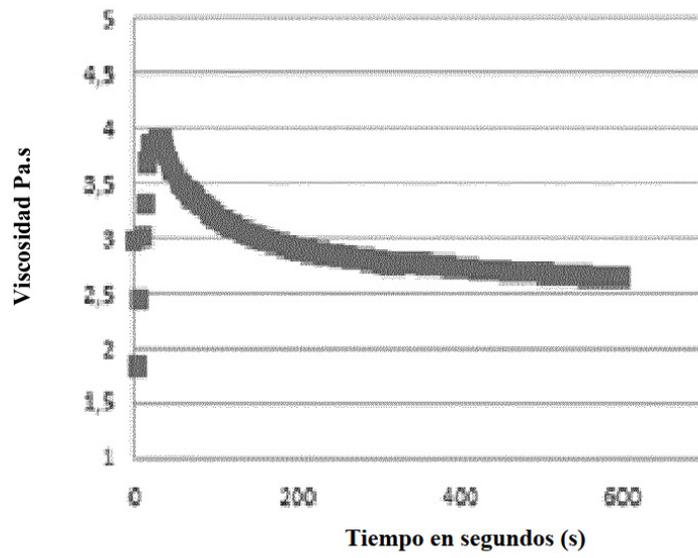


Figura 15