

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 320**

51 Int. Cl.:

C12N 9/10 (2006.01)
C12P 19/08 (2006.01)
C12P 19/18 (2006.01)
A61K 8/73 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61K 31/721 (2006.01)
C08B 37/02 (2006.01)
A23L 29/269 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.07.2015** **PCT/FR2015/052002**
87 Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2016** **WO16016544**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2015** **E 15759857 (4)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019** **EP 3174978**

54 Título: **Proteína con actividad dextranasa y aplicaciones**

30 Prioridad:

28.07.2014 FR 1457264

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.05.2020

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES
APPLIQUÉES DE TOULOUSE (25.0%)
135 avenue de Rangueil
31077 Toulouse Cedex 4, FR;
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (25.0%);
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (25.0%) y
UNIVERSITÉ PAUL SABATIER TOULOUSE III
(25.0%)**

72 Inventor/es:

**VUILLEMIN, MARLÈNE;
CLAVERIE, MARION;
MOULIS, CLAIRE;
REMAUD-SIMEON, MAGALI;
MONSAN, PIERRE;
SEVERAC, ETIENNE y
FONTAGNE-FAUCHER, CATHERINE**

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**

ES 2 759 320 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

Proteína con actividad dextransacarasa y aplicaciones

5 **Sector de la técnica**

La invención tiene por objeto una proteína con actividad dextransacarasa procedente de la cepa *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299, especialmente, una proteína con actividad dextransacarasa troncada. La invención se refiere también a un procedimiento de síntesis de dextranos mediante una proteína tal con actividad dextransacarasa, así como a los dextranos sintetizados.

Estado de la técnica

A continuación, para mayor claridad, el término "dextransacarasa" se podrá utilizar, a veces, para designar una proteína con actividad dextransacarasa.

Las glucansacarases de origen bacteriano son α -transglucosilasas que pertenecen a las familias 13 y 70 de las glucosidohidrolasas. A partir de sacarosa, estas enzimas catalizan generalmente la síntesis de α -glucanos de masa molar elevada (10^6 - 10^9 g.mol⁻¹). También pueden sintetizar oligosacáridos o glucoconjugados por reacción de transglucosilación en aceptores exógenos de diversa naturaleza. Las glucansacarases tienen diferentes especificidades de productos, tanto en los que respecta a la naturaleza de los enlaces osídicos sintetizados (α -1,2; α -1,3; α -1,4 o α -1,6) y su organización, como al tamaño de los productos formados.

De manera general, las dextransacarases se producen de forma natural por bacterias lácticas, por ejemplo los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* o *Weissella* sp.

Entre las glucansacarases, las dextransacarases producen dextrano, que generalmente tienen al menos un 50 % de enlaces osídicos α -1,6 en la cadena principal y, opcionalmente, 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, a menudo dependientes de sus masas molares.

Salvo que se indique lo contrario, se entiende por "masa molar" o "masa molar promedio", en la presente invención, la masa molar promedio en peso, expresada independientemente en g.mol⁻¹ o Da.

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 en aplicaciones analíticas, 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, para soluciones oftálmicas, 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, etc.

Estos dextranos de masa molar baja o media se producen de forma general mediante hidrólisis ácida, seguida de fraccionamiento con ayuda de disolventes orgánicos. Sin embargo, estos procedimientos químicos suelen ser costosos, poco rentables y contaminantes.

Por tanto, se han desarrollado procedimientos alternativos para mejorar la producción de dextranos de masa molar baja o media.

De este modo, la patente US 5,229,277 describe un procedimiento de síntesis de dextranos de masa molar baja que lleva a la práctica el uso de *Leuconostoc mesenteroides* y una cepa mutante de *Lipomyces starkeyi* ATCC 74054. Este procedimiento, además de requerir el uso de dos microorganismos, necesita condiciones de cultivo específicas y duraciones y temperaturas precisas para que la actividad dextranasa identificada en *Lipomyces starkeyi* ATCC 74054 reduzca la masa molar de los dextranos sintetizados por *Leuconostoc mesenteroides*. Los polímeros de dextrano producidos tienen una masa molar comprendida entre $4 \cdot 10^4$ y $1,5 \cdot 10^5$ Da.

La solicitud de patente EP2365084 describe un procedimiento de síntesis de dextranos de masa molar controlada. Estos α -glucanos se producen directamente mediante formas troncadas de las glucansacarases DsrS, procedentes de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 F, a partir de sacarosa, con la adición opcional de un aceptor exógeno. Una variante DsrS Core ΔA es especialmente interesante para la producción de dextrano de masa molar media de $1 \cdot 10^4$ Da.

Sin embargo, la síntesis debe realizarse a temperaturas bajas (preferentemente a 10 °C) para de maximizar los rendimientos. Además, la enzima no presenta una gran eficacia catalítica, y se necesitan aproximadamente 48 horas de síntesis para alcanzar el consumo total de la sacarosa.

También es posible fomentar la producción de dextranos de masa molar baja aumentando la concentración inicial de sustrato. Sin embargo, se ha demostrado frecuentemente con este método que el dextrano producido frecuentemente está polidisperso, y que la síntesis de polímeros de masa molar elevada no se anula por completo.

- 5 Sigue existiendo por tanto la necesidad de producir dextranos que tengan una masa molar baja, especialmente de dextranos poco polidispersos.

Objeto de la invención

- 10 Un objeto de la invención era también proporcionar dextranos lineales. Dichos dextranos son útiles en muchos campos, en particular para aplicaciones médicas. En efecto, se ha demostrado que los dextranos que tienen un alto contenido en enlaces α -1,6 (y, por tanto, los más lineales) son los que conllevan menores cantidades de reacciones alérgicas (1,2).

- 15 Otro objeto de la invención era también proporcionar un procedimiento de producción de dichos dextranos de forma enzimática, y no química, y de manera simple, rápida y precisa, necesitando solamente usar un único microorganismo.

- 20 Otro objetivo de la invención era poder controlar la masa molar de un dextrano sintetizado de manera muy precisa, en particular mediante parámetro(s) de reacción fácilmente controlable(s).

- 25 Los inventores tienen por tanto el mérito de haber descubierto que una proteína con actividad dextransacarasa procedente de la cepa *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 permite la síntesis de dextranos de masa molar controlable de manera muy precisa, y esto, sin necesitar de reacciones enzimáticas limitantes, directamente a partir de sacarosa, y sin agregar ningún aceptor exógeno ni otra(s) enzima(s) adicional(es).

- 30 Dicha proteína tiene por secuencia de aminoácidos la secuencia SEQ ID NO: 1. La proteína solo posee una identidad máxima del 62 % para el 100 % de su secuencia con la alternansacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* LBAE C11 cuya secuencia está disponible en las bases de datos con el número de registro de Genbank WP_004904957.1. En comparación con otras supuestas secuencias de glucansacarasa que pueden identificarse después de las campañas de secuenciación de genomas bacterianos, este porcentaje de identidad es bastante bajo.

- 35 La proteína con actividad dextransacarasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, denominada DsrM, de masa molar 229 kDa, está compuesta de 2065 aminoácidos, que posee la tríada catalítica DED y los 4 motivos conservados habitualmente descritos en las enzimas de la familia 70 de las glucosidohidrolasas. Los motivos proteicos conservados del núcleo catalítico (I a IV) se han identificado desde la posición 1177 a la posición 1183 para el motivo I, desde la posición 673 a la posición 683 para el motivo II, desde posición 710 a la posición 721 para el motivo III y desde la posición 785 a posición 799 para el motivo IV. En comparación con la secuencia proteica de la glucansacarasa GTF-180, los cinco dominios estructurales tradicionalmente descritos para las glucansacarasa (A, B, C, IV y V) (3) se pueden identificar en la estructura primaria de la proteína con actividad dextransacarasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 (figura 1).

- 45 Las variantes de función conservadora de la proteína con actividad dextransacarasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 también están incluidas en la presente solicitud.

- 50 Se denomina "*variante de función conservadora*", una variante en la que, en una proteína, un resto (o más) de aminoácido dado se ha modificado o suprimido sin alterar la conformación global ni la actividad enzimática de la proteína con actividad dextransacarasa. La actividad enzimática de una variante de dextransacarasa 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 (4) o mediante análisis de HPLC (siglas del inglés *high performance liquid chromatography*, cromatografía líquida de alto rendimiento).

- 55 Preferentemente, dicha una variante de función conservadora es una proteína con actividad dextransacarasa cuya secuencia de aminoácidos tiene al menos un 80 %, preferentemente un 85 %, aún más preferentemente un 90 %, aún más preferentemente un 95 %, aún más preferentemente un 98 % de identidad respecto de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

- 60 De manera ventajosa, la una o varias modificaciones relativas a las partes no sensibles de la enzima, y que por tanto no se refieren específicamente a la zona comprendida entre la posición 563 y la posición 1282 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, correspondiente a la tríada catalítica y a los dominios A, B, C.

- 65 Preferentemente, la una o varias modificaciones no se refieren específicamente a la zona comprendida entre la posición 563 y la posición 1282 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 así como a las zonas comprendidas entre la posición 1316 y 1433 (parte del dominio V del extremo C) de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Aún más preferentemente, la una o varias modificaciones no se refieren específicamente a la zona comprendida entre la posición 563 y la posición 1282 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, las zonas comprendidas entre la posición 1316 y 1433 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 así como a las zonas comprendidas entre la posición 174 y 421 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Las secuencias comprendidas entre las posiciones 174 y 421, y también entre 1316 y 1433 incluyen de este modo unidades repetidas (repeticiones YG) generalmente descritas en esta familia con afinidad por el glucano y, por tanto, por tener un papel sobre el tamaño de los productos formados, así como sobre la actividad catalítica de la enzima (3).

Aún más preferentemente, la una o varias modificaciones no se refieren específicamente a la zona comprendida entre la posición 563 y la posición 1282 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, las zonas comprendidas entre la posición 1316 y 1433 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 así como a las zonas comprendidas entre la posición 42 y 421 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

De este modo, se ha puesto de manifiesto mediante ensayos de truncamiento de la dextranasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 que la supresión de los aminoácidos comprendidos entre las posiciones 1434 y 2065 del dominio V del extremo C, entre ellos la totalidad de los "motivos APY", no alteraría la actividad y la especificidad de la enzima (véase la figura 2, dextranasa truncada DsrM ΔPS ΔC-APY).

Por el contrario, se ha puesto de manifiesto que la supresión de los aminoácidos entre las posiciones 1 y 174 y entre las posiciones 1317 y 2065 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 (dominio C del extremo C), producen la pérdida de su actividad como enzima (véase la figura 2, dextranasa truncada DsrM Δ174-1317).

El experto en la materia sabrá determinar las variantes conservadoras de función, especialmente en lo que respecta a estos elementos.

De este modo, un objeto de la invención es una proteína con actividad dextranasa que tiene por secuencia de aminoácidos la secuencia SEQ ID NO: 1, o que comprende al menos un 80 %, preferentemente un 85 %, aún más preferentemente un 90 %, aún más preferentemente un 95 %, aún más preferentemente un 98 % de identidad en las posiciones 563 a 1282 de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, preferentemente en las posiciones 563 a 1282 y 1316 a 1433 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, aún más preferentemente en las posiciones 563 a 1282, 1316 a 1433 y 174 a 421 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, aún más preferentemente en las posiciones 563 a 1282, 1316 a 1433 y 42 a 421 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Según una realización particular, una variante conservadora de función consiste en una forma truncada de una proteína con actividad dextranasa tal como se ha definido anteriormente que conserva la actividad enzimática dextranasa.

Preferentemente, dicha forma truncada comprende menos de 2065 aminoácidos, preferentemente menos de 1600 aminoácidos, aún más preferentemente menos de 1450 aminoácidos. Muy preferentemente, dicha forma truncada comprende 1392 aminoácidos.

Según una realización particular, dicha forma truncada de la proteína con actividad dextranasa con secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 tiene por secuencia de aminoácidos la secuencia SEQ ID NO: 2. Esta forma truncada concreta se denomina DsrM ΔPS ΔC-APY.

La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 de la posición 42 a la posición 1433, y se ha eliminado de las posiciones 1 a 41 y 1434 a 2065 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. Como se ha indicado anteriormente, se ha puesto de manifiesto por tanto que la supresión de estos aminoácidos, entre ellos la totalidad de los "motivos APY", no altera la actividad y la especificidad de la enzima.

Por otro lado, la proteína con actividad dextranasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 no supera el 54 % de identidad y el 68 % de similitud, respecto de las secuencias proteicas de DsrS y sus variantes DsrS vardel Δ3, DsrS vardel Core y DsrS Core ΔA (véase la solicitud de patente EP2365084).

Las variantes de función conservadora de la proteína con actividad dextranasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 también está comprendida en la presente solicitud, y se define de la misma manera que antes.

De este modo, preferentemente, la una o varias modificaciones pueden referirse a las partes no sensibles de la enzima, y que por tanto no se refieren específicamente a la zona comprendida entre la posición 522 y la posición 1241 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, correspondiente a la tríada catalítica y a los dominios A, B, C.

Preferentemente, la una o varias modificaciones no se refieren específicamente a la zona comprendida entre la posición 522 y la posición 1241 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 así como a las zonas comprendidas entre la posición 1275 y 1392 (parte del dominio V del extremo C) de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

Aún más preferentemente, la una o varias modificaciones no se refieren específicamente a la zona comprendida entre la posición 522 y la posición 1241 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, las zonas comprendidas entre la posición 1275 y 1392 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 así como a las zonas comprendidas entre la posición 133 y 380 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

Aún más preferentemente, la una o varias modificaciones no se refieren específicamente a la zona comprendida entre la posición 522 y la posición 1241 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, las zonas comprendidas entre la posición 1275 y 1392 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 así como a las zonas comprendidas entre la posición 1 y 380 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

De este modo, un objeto de la invención se refiere a una proteína con actividad dextranasa que tiene por secuencia de aminoácidos la secuencia SEQ ID NO: 2, o que comprende al menos un 80 %, preferentemente un 85 %, aún más preferentemente un 90 %, aún más preferentemente un 95 %, aún más preferentemente a un 98 % de identidad en las posiciones 522 a 1241 de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, preferentemente en las posiciones 522 a 1241 y 1275 a 1392 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, aún más preferentemente en las posiciones 522 a 1241, 1275 a 1392 y 133 a 380 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, aún más preferentemente en las posiciones 522 a 1241, 1275 a 1392 y 1 a 380 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

A continuación, la expresión "proteína con actividad dextranasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2" (o "dextranasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2" se refiere tanto a la proteína con actividad dextranasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 como a sus variantes conservadoras de función. Según una realización particular, se trata solamente de la proteína con actividad dextranasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

Los inventores han puesto de manifiesto las funciones excepcionales de una dextranasa de acuerdo con la invención.

Una proteína con actividad dextranasa de acuerdo con la invención es exclusivamente específica de la polimerización a través de enlaces glucosídicos de tipo α -1,6 y, sobre todo, es una excelente polimerasa. En efecto, como se pone de manifiesto en la parte experimental, los análisis cromatográficos realizados después de una síntesis de dextrano a partir de 100 g.l⁻¹ de sacarosa muestran que aproximadamente un 85 % y 81 % de las unidades de glucosilo derivadas de la sacarosa se utilizan en la producción del polímero durante el uso respectivo de una dextranasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y de una dextranasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Asimismo, una proteína con actividad dextranasa de acuerdo con la invención tiene una temperatura óptima de funcionamiento comprendida entre 30 °C y 45 °C, y un pH óptimo comprendido entre 4 y 7, más precisamente entre 4,5 y 5,75 para una proteína con actividad dextranasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, y entre 5 y 7 para una proteína con actividad dextranasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

De esta forma, una dextranasa de acuerdo con la invención ofrece una amplia gama de utilización en términos de pH y temperaturas. En concreto, la enzima conserva más del 80% de su actividad en un amplio intervalo de temperaturas, especialmente hasta 45 °C, lo que es muy raro en las enzimas de la familia 70 de las glucosidohidrolasas. Sin embargo, la puesta en práctica de la síntesis de dextranos a temperaturas elevadas, por ejemplo de aproximadamente 45 °C, permite limitar ciertas contaminaciones microbianas. Este amplio intervalo de uso, en consecuencia, convierte la dextranasa de acuerdo con la invención en muy atractiva para usos industriales.

Según una realización particular, se puede preparar una proteína con actividad según la invención mediante técnicas conocidas de recombinación genética.

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 a los resultados experimentales posteriores.

La expresión "sistema de expresión" comprende una célula hospedadora y un vector compatible en condiciones apropiadas, es decir, condiciones que permitan la expresión del gen que codifica la proteína de interés, contenido en el vector e introducido en la célula hospedadora. Normalmente, la secuencia de los ácidos nucleicos que codifican

una proteína con actividad dextranasa de acuerdo con la invención, puede insertarse en un vector de expresión apropiado que después se introducirá en una célula hospedadora procarionte o eucariota adecuada.

Se puede utilizar cualquier vector de expresión adecuado y conocido del experto en la materia de acuerdo con la invención. Un vector de expresión es normalmente un plásmido, un cósmido, un episoma, un cromosoma artificial, un fago o un vector vírico. De manera ventajosa, el vector de expresión utilizado es pET-53-DEST, pET-55-DEST, pET-60-DEST o pBAD- DEST49.

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 sp.* como *Saccharomyces cerevisiae* o *pombe*, *Pichia pastoris* etc.

Preferentemente, se utilizan células hospedadoras procariontes. Según una 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, BL21-AI, BL21 Star DE3, Arctic Express DE3.

Según una realización particular en la que la dextranasa de acuerdo con la invención es una dextranasa troncada tal como se ha definido anteriormente, la secuencia de los ácidos nucleicos que codifican una dextranasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 tal como se ha descrito anteriormente, se inserta en un vector de expresión pET-55-DEST, introducido a continuación en una célula hospedadora procarionte de tipo *Escherichia coli* BL21 Star DE3. Esta realización permite producir la dextranasa, y permite obtener aproximadamente 10.000 unidades de actividad enzimática por litro de cultivo.

Una dextranasa según la invención puede prepararse cultivando células hospedadoras que contengan una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una dextranasa de acuerdo con la invención, en condiciones que permitan la expresión de una dextranasa, y por aislamiento de dicha dextranasa del medio de cultivo según las técnicas conocidas por el experto en la materia.

Después, dichas dextranasas 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 una realización preferida, la dextranasa obtenida mediante el cultivo de las células hospedadoras se purifica por cromatografía de afinidad.

De manera ventajosa, una dextranasa de acuerdo con la invención también se puede inmovilizar por técnicas conocidas del experto en la materia, por ejemplo, mediante la formación de enlaces iónicos y/o hidrófobos entre el soporte y la proteína (adsorción), formación de enlaces covalente entre el soporte y la proteína, inclusión de la proteína en el soporte o encapsulación de la proteína en el soporte. La inmovilización de una dextranasa de acuerdo con la invención supone una realización especialmente ventajosa de acuerdo con la invención, como se apreciará más adelante.

Debido a sus propiedades dextranasas notables, las proteínas con actividad dextranasa de acuerdo con la invención permiten además la síntesis de dextranos. El experto en la materia sabrá cómo adaptar las condiciones experimentales a aplicar para tener una producción optimizada de dextrano. De manera general, la dextranasa debe incubarse en un medio de síntesis que contenga sacarosa.

En consecuencia, un objeto de la invención se refiere a un procedimiento de síntesis de dextranos, en el que:

- se suministra sacarosa en un medio de síntesis,
- se pone en contacto una dextranasa de acuerdo con la invención con dicha sacarosa de dicho medio de síntesis para formar dextranos,
- opcionalmente, se aíslan los dextranos obtenidos.

De manera ventajosa, el pH utilizado en el procedimiento de síntesis está comprendido entre 4 y 7, preferentemente entre 4,5 y 5,75 para una dextranasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, y entre 5 y 7 para una dextranasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. Normalmente, el pH utilizado en el procedimiento de fabricación es de aproximadamente 5,75.

El medio de síntesis puede ser cualquier medio conocido del experto en la materia y adaptado a la síntesis de dextranos de acuerdo con la invención. Preferentemente, el medio de síntesis es un medio líquido que comprende un disolvente. Sin embargo, el experto podrá utilizar cualquier disolvente que permite conseguir el pH deseado para la síntesis. De este modo, dicho disolvente podrá, de forma ilustrativa, seleccionarse entre agua, o una solución

tampón adecuada (por ejemplo, acetato de sodio).

El experto en la materia sabrá adaptar la duración de la síntesis, especialmente en función de la cantidad de proteína con actividad dextranasa añadida al medio de síntesis y en función de la temperatura. De este modo, será necesaria una duración de síntesis más larga cuando se utilicen concentraciones elevadas de sacarosa en el medio de síntesis, por ejemplo, de aproximadamente 400 g.l⁻¹ a 600 g.l⁻¹. Normalmente, a una concentración enzimática de 1 U.ml⁻¹, la síntesis se realiza durante un período comprendido entre 4 horas y 24 horas, preferentemente entre 8 horas y 16 horas, preferentemente durante un período de aproximadamente 14 horas.

De una manera especialmente ventajosa, se pueden utilizar amplios intervalos de temperatura y concentraciones iniciales de sustrato, permitiendo estas además el control preciso de la masa molar de los dextranos obtenidos.

De manera general, la concentración de sacarosa en el medio de síntesis puede estar comprendida entre 50 y 600 g.l⁻¹, preferentemente entre 50 y 400 g.l⁻¹. Normalmente, se utilizarán concentraciones de sacarosa en el medio de síntesis comprendidas entre 50 y 200 g.l⁻¹ para los dextranos de masa molar más elevada, y se utilizarán concentraciones de sacarosa en el medio de síntesis comprendidas entre 200 y 600 g.l⁻¹, preferentemente entre 200 y 400 g.l⁻¹ para los dextranos de masa molar más baja. Efectivamente, ya es sabido que la masa molar promedio en peso del dextrano sintetizado podrá ser más elevada si se utilizan una concentración inicial de sacarosa baja en el medio de síntesis.

Por otro lado, de manera general, la síntesis se puede realizar a una temperatura comprendida entre 20 °C y 50 °C, preferentemente comprendida entre 25 °C y 45 °C. Como se ha indicado anteriormente, el uso de una enzima en una amplia gama de temperaturas, especialmente hasta 45 °C, es muy raro en las enzimas de la familia 70 de las glucosidohidrolasas. Sin embargo, la puesta en práctica de la síntesis de dextranos a temperaturas elevadas, por ejemplo de aproximadamente 45 °C, permite limitar ciertas contaminaciones microbianas.

Por otro lado, se ha comprobado en anteriores trabajos que un aumento de la temperatura permite la obtención de dextranos de masas molares superiores (5,6). Sin embargo, se ha puesto de manifiesto en el presente documento de forma sorprendente que, al contrario, durante la síntesis de dextranos mediante una dextranasa de acuerdo con la invención, una disminución de la temperatura induce dextranos de masas molares más altas.

Normalmente, se utilizarán temperaturas comprendidas entre 20 °C y 35 °C, preferentemente entre 25 °C y 35 °C, para los dextranos de masa molar más alta, se utilizarán temperaturas comprendidas entre 35 °C y 50 °C, preferentemente entre 35 °C y 45 °C para los dextranos de masa molar más baja. De esta forma, la temperatura de la reacción tiene gran influencia sobre la masa molar de los productos formados con la enzima de la presente invención.

Por otro lado, se utilizarán preferentemente concentraciones de sacarosa elevadas, especialmente de 200 a 600 g.l⁻¹, preferentemente entre 200 y 400 g.l⁻¹, para reacciones realizadas a temperaturas elevadas, especialmente superiores o iguales a 45 °C.

La masa molar de un dextrano sintetizado se puede controlar de forma muy precisa mediante la elección de la temperatura y la concentración de sacarosa, lo que resulta especialmente ventajoso ya que esto permite proporcionar de manera precisa una amplia gama de dextranos en términos de masa molar.

En efecto, como se pone de manifiesto en la parte experimental, se ha observado aquí de forma sorprendente una variación lineal de la masa molar de los dextranos obtenidos cuando se fija la temperatura de síntesis (o la concentración de sacarosa), y que se hace variar la concentración de sacarosa (o la temperatura de síntesis). Este resultado es muy sorprendente y, según el conocimiento de los inventores, nunca se había observado anteriormente, es una característica especialmente ventajosa de la invención ya que permite obtener, mediante temperaturas comprendidas de 20 °C a 50 °C y a concentraciones iniciales de sacarosa comprendidas de 50 g.l⁻¹ a 600 g.l⁻¹, dextranos con una masa molar comprendida de 2.10³ a 40.10³ g.mol⁻¹.

Según una realización particular de la invención, en la que se utiliza una dextranasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, los dextranos tienen una masa molar comprendida de 7.10³ a 25.10³ g.mol⁻¹.

De este modo, a modo de ejemplo, si se fija la temperatura a 25 °C, el procedimiento de síntesis de dextranos de acuerdo con la invención permite obtener, a partir de una dextranasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, un dextrano que tiene una masa molar media 25.10³ g.mol⁻¹ a partir de 50 g.l⁻¹ de sacarosa y un dextrano de masa molecular media de 8.10³ g.mol⁻¹ a partir de 400 g.l⁻¹ de sacarosa. Análogamente, para una concentración inicial de sacarosa fijada en 200 g.l⁻¹, es posible obtener un dextrano cuya masa molar media es de 17.10³ g.mol⁻¹ a 25 °C y un dextrano cuya masa molar media es de 8,5.10³ g.mol⁻¹ a 45 °C.

Por tanto, un objeto de la divulgación se refiere a un dextrano que se puede obtener mediante el procedimiento descrito anteriormente.

Normalmente, un dextrano de acuerdo con la divulgación se caracteriza porque presenta un 100 % de enlaces glucosídicos α -1,6, una masa molar media en peso M_w comprendida entre $2 \cdot 10^3$ y $40 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹, preferentemente entre $6,5 \cdot 10^3$ y $32 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹, aún más preferentemente entre $7 \cdot 10^3$ y $25 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹ y un índice de dispersidad D_i menor de 1,5. Una realización particular se refiere a un dextrano tal que se puede obtener mediante el procedimiento de acuerdo con la invención y descrito como antecede.

De este modo, los dextranos según la divulgación son completamente lineales, puesto que no presenten ninguna ramificación, como se puede poner de manifiesto con un método de medición por RMN de protón con el espectrómetro Bruker Avance (500 MHz) (véanse los resultados experimentales). Por otro lado, los dextranos de acuerdo con la divulgación presentan de forma típica una masa molar media baja ($2 \cdot 10^3$ a $40 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹, preferentemente entre $6,5 \cdot 10^3$ y $32 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹, preferentemente entre $7 \cdot 10^3$ y $25 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹, determinada por análisis HPSEC, y son poco polidispersos. Este resultado es muy sorprendente, ya que se obtiene mediante una dextranasa de acuerdo con la invención, puesto que las glucanosas de la familia GH-70 son conocidas por sintetizar generalmente α -glucanos con masas molares muy altas, de 10^6 a 10^8 Da (7-11).

Una realización particular de la invención se refiere también a una dextranasa que se ha inmovilizado.

Por tanto, un objeto de la invención se refiere a un complejo que comprende un soporte y una proteína con actividad dextranasa de acuerdo con la invención, caracterizada porque dicha proteína con actividad dextranasa se ha inmovilizado sobre dicho soporte.

A continuación, dicho complejo obtenido se podría denominar, a veces "proteína con actividad dextranasa inmovilizada" o "dextranasa inmovilizada".

Como se ha indicado anteriormente, una dextranasa de acuerdo con la invención se puede inmovilizar sobre el soporte por técnicas conocidas del experto en la materia, por ejemplo, mediante la formación de enlaces iónicos y/o hidrófobos entre el soporte y la proteína (adsorción), formación de enlaces covalente entre el soporte y la proteína, inclusión de la proteína en el soporte o encapsulación de la proteína en el soporte. Una dextranasa de acuerdo con la invención que se ha inmovilizado sobre un soporte presentará varias ventajas, entre ellas, aumentar la estabilidad de dicha dextranasa inmovilizada con respecto de la temperatura, el pH etc., permitir la reutilización de dicha dextranasa durante varias síntesis sucesivas, permitir el desarrollo de procesos semicontinuos y/o continuos, etc.

Preferentemente, se podrá utilizar un método de inmovilización mediante adsorción o formación de enlaces covalente entre el soporte y la proteína.

Una realización particular de la invención se refiere, por tanto, a un complejo tal como se ha definido anteriormente, caracterizado porque dicha dextranasa se ha inmovilizado sobre dicho soporte por formación de enlaces covalentes, iónicos y/o hidrófobos entre el soporte y la proteína.

El experto en la materia sabrá determinar el soporte más adecuado según el método de inmovilización empleado, que permita especialmente obtener buenos rendimientos de inmovilización así como una actividad de la enzima inmovilizada elevada.

Por ejemplo, se puede utilizar como soporte para un método de inmovilización por adsorción, un polimetacrilato de alta porosidad que tenga como grupo funcional un grupo amino de separador corto (por ejemplo Sprinbeads AA130® comercializado por Sprin Technologies), polimetacrilato que tenga como grupo funcional un grupo octadecilo (por ejemplo Sprinbeads AO110® comercializado por Sprin Technologies), poliestireno -DVB (DiVinil-Benceno) (por ejemplo Sprinbeads SN110® comercializado por Sprin Technologies) o metacrilato de epoxi que tiene como grupo funcional un grupo epoxi (por ejemplo Purolite ECR8214® comercializado por Purolite).

Por ejemplo, se puede utilizar como soporte para un método de inmovilización mediante enlaces iónicos entre el soporte y la proteína, polimetacrilato que tiene como grupo funcional un grupo de amino cuaternario (por ejemplo Sepabeads ECQ1A® comercializado por Resindion) o de estireno que tiene como grupo funcional un grupo amino cuaternario (por ejemplo Purolite ECR1604® comercializado por Purolite).

Preferentemente, dicha inmovilización se realiza usando el metacrilato de epoxi que tiene como grupo funcional un grupo epoxi, especialmente Purolite ECR8214® comercializado por Purolite.

De una manera especialmente ventajosa, la masa molar de un dextrano sintetizado a partir de una dextranasa inmovilizada de acuerdo con la invención puede, análogamente a una dextranasa de acuerdo con la invención no inmovilizada, controlarse de forma muy precisa mediante la elección de la temperatura y la concentración de sacarosa. Esto permite suministrar de forma precisa una gama más amplia de dextranos en términos de masa molar, produciendo ventajosamente una dextranasa inmovilizada de acuerdo con la invención dextranos de masas más bajas que las producidas mediante una dextranasa de acuerdo con la invención no inmovilizada en condiciones idénticas (véanse los resultados experimentales).

De este modo, una realización particular de la invención se refiere a un procedimiento de síntesis de dextranos, en el que:

- 5 - se suministra sacarosa en un medio de síntesis,
 - se pone en contacto un complejo de acuerdo con la invención con dicha sacarosa en dicho medio de síntesis para formar dextranos,
 - opcionalmente, se aíslan los dextranos obtenidos.

- 10 Un objeto de la divulgación también se refiere a un dextrano que se puede obtener mediante dicho procedimiento de síntesis de dextranos.

Preferentemente, un dextrano así obtenido se caracteriza por que presenta un 100 % de enlaces glucosídicos α -1,6, una masa molar media en peso M_w comprendida entre $3 \cdot 10^3$ y $10 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹, preferentemente entre $4,2 \cdot 10^3$ y $7,3 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹ y un índice de dispersidad D_i menor de 1,5.

- 15

Normalmente, a una temperatura fijada en 30 °C, una dextranasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 inmovilizada sobre un soporte de Purolite ECR8214® produce un dextrano de masa molar $7,3 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹ a partir de 50 g.l⁻¹ de sacarosa y un dextrano de masa molecular media de $4,2 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹ a partir de 450 g.l⁻¹ de sacarosa.

- 20

La invención también se refiere a la síntesis de glucooligosacáridos. Los glucooligosacáridos son oligosacáridos constituidos por una cadena de unidades glucosilo asociadas mediante enlaces osídicos (por ejemplo, en α -1,6, α -1,2, α -1,3 y/o α -1,4). Las reacciones del aceptor realizadas consisten en una transferencia de restos de glucosilo desde la sacarosa a otras moléculas aceptoras glucídicas agregadas al medio de síntesis.

- 25

De esta forma, un objeto de la invención se refiere a un procedimiento de síntesis de glucooligosacáridos, en el que:

- 30 - se suministra sacarosa y al menos un aceptor glucídico a un medio de síntesis,
 - se pone en contacto una dextranasa o un complejo de acuerdo con la invención con dicha sacarosa y dicho al menos un aceptor glucídico en dicho medio de síntesis para formar glucooligosacáridos,
 - opcionalmente, se aíslan los glucooligosacáridos obtenidos.

- 35 El experto en la materia sabe qué aceptor glucídico utilizar dependiendo del tipo de glucooligosacáridos que se desea obtener.

Por ejemplo, dicho al menos un aceptor glucídico se selecciona entre glucosa, maltosa, isomaltosa, maltooligosacáridos y glucooligosacáridos y, preferentemente, se selecciona entre glucosa, maltosa y/o isomaltosa.

- 40 Las mismas condiciones de síntesis que se han descrito anteriormente (medio de síntesis, temperatura, pH, concentraciones iniciales de sacarosa etc.) se aplican al presente procedimiento de síntesis de glucooligosacáridos.

Un objeto de la divulgación también se refiere a un glucooligosacáridos que se puede obtener mediante el procedimiento de síntesis de glucooligosacáridos anteriormente descrito.

- 45

Según una realización particular de la invención, los glucooligosacáridos obtenidos son isomaltooligosacáridos. Por "isomaltooligosacáridos" se entienden oligómeros de glucosas unidas solamente por enlaces α -1,6. Dichos isomaltooligosacáridos se pueden obtener mediante un procedimiento de síntesis de glucooligosacáridos tal como se ha definido anteriormente, en el que dicho al menos un aceptor glucídico es, por ejemplo, glucosa o isomaltosa, preferentemente glucosa.

- 50

Un glucooligosacárido según la divulgación tiene, de forma general, una masa molar comprendida entre $0,4 \cdot 10^3$ y $5 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹, preferentemente entre $0,7 \cdot 10^3$ y $3,4 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹.

- 55 Normalmente, a una temperatura fijada en 30 °C, el procedimiento de síntesis de glucooligosacáridos de acuerdo con la invención permite obtener, a partir de una proteína con actividad dextranasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, un glucooligosacárido de masa molar media de $6,8 \cdot 10^2$ g.mol⁻¹ a partir de 315 g.l⁻¹ de glucosa y de 60 g.l⁻¹ de sacarosa y un glucooligosacárido de masa molar media de $3,4 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹ a partir de 88 g.l⁻¹ de glucosa y 110 g.l⁻¹ de sacarosa.

- 60

Normalmente, a una temperatura fijada en 30 °C, el procedimiento de síntesis de glucooligosacáridos de acuerdo con la invención permite obtener, a partir de una proteína con actividad dextranasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 inmovilizada sobre el soporte Purolite ECR8214®, un glucooligosacárido de masa molar media de $7 \cdot 10^2$ g.mol⁻¹ a partir de 333 g.l⁻¹ de glucosa y de 166 g.l⁻¹ de sacarosa y un glucooligosacárido de masa molar media de $2,4 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹ a partir de 88 g.l⁻¹ de glucosa y 110 g.l⁻¹ de sacarosa.

- 65

La invención también se refiere a la síntesis de glucoconjugados. Así, las glucansacarosas se pueden utilizar en la síntesis de glucoconjugados mediante reacción del aceptor, introduciendo además de la sacarosa, una molécula hidroxilada en el medio de síntesis.

- 5 La glucosilación de moléculas hidroxiladas puede ser interesante para la síntesis de nuevos compuestos, o para modificar propiedades fisicoquímicas tales como, por ejemplo, la solubilidad.

10 Por "molécula hidroxilada" se entiende cualquier tipo de molécula no glucídica que contiene al menos un grupo hidroxilo libre. Normalmente, una molécula hidroxilada es un flavonoide, poliol, aminoácido. Por ejemplo, se pueden glicosilar las catequinas, polifenoles o alquilpoliglucósidos.

Por tanto, un objeto de la invención se refiere a un procedimiento de síntesis de compuestos glucoconjugados, en el que:

- 15 - se suministra sacarosa y al menos una molécula hidroxilada en un medio de síntesis,
- se pone en contacto una dextranacarasa o un complejo de acuerdo con la invención con dicha sacarosa y dicha al menos una molécula hidroxilada en dicho medio de síntesis para formar compuestos glucoconjugados,
- opcionalmente, se aíslan los componentes glucoconjugados obtenidos.

- 20 Las mismas condiciones de síntesis que se han descrito anteriormente (medio de síntesis, temperatura, pH, concentraciones iniciales de sacarosa etc.) se aplican al presente procedimiento de síntesis de glucoconjugados.

Un objeto de la divulgación se refiere a un glucoconjugado que se puede obtener mediante el procedimiento de síntesis de glucoconjugados anteriormente descrito.

- 25 Los productos de acuerdo con la divulgación, especialmente los dextranos, los glucooligosacáridos o los glucoconjugados según la divulgación, se podrán utilizar en cualquier tipo de aplicaciones en las que sus características funcionales, especialmente su tamaño y su tipo de enlaces osídicos, sean adecuadas.

- 30 Un dextrano, glucooligosacárido o glucoconjugado de acuerdo con la divulgación se puede utilizar en aplicaciones farmacéuticas, cosméticas o alimentarias. Se puede, para las posibles aplicaciones, citar la publicación Vettori et al. (12). De manera ilustrativa, pero no limitativa, un dextrano de acuerdo con la invención se puede utilizar como soporte o base (por ejemplo, en una vacuna o en una composición farmacéutica) (13) como agente nutracéutico (13,14), como agente estabilizante (por ejemplo, estabilizante de un antígeno en una vacuna, o estabilizante de proteínas o de productos liofilizados), como agente inmunoestimulador o prebiótico (15), como agente de prevención de la cristalización de los azúcares, como sustituto de plasma sanguíneo, como transportador de hierro en el tratamiento de anemias importantes (14), como anticoagulante, como extensor del plasma sanguíneo, en la prevención de complicaciones postoperatorias, en el tratamiento de quemaduras y en la reducción del riesgo de trombosis o embolias, como principio activo o excipiente en soluciones oftálmicas, como excipiente en la liofilización como diluyente y/o modificador de la temperatura de colapso, como crioprotector, Como agente de almacenamiento de órganos para trasplantes.

- 45 Un objeto de la divulgación se refiere a una composición farmacéutica, cosmética o alimentaria que comprende un dextrano según la divulgación, un glucooligosacárido según la divulgación o un glucoconjugado según la divulgación como principio activo o como excipiente aceptable.

- La invención también se refiere finalmente a derivados de los dextranos de la invención. En el presente documento, por "*derivado de dextrano*", se entiende un dextrano de la invención y que se ha sometido a una o varias etapas de modificaciones químicas 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-(dimetilamino)etilo). Dichas técnicas de modificación química, así como las aplicaciones para las que son adecuados los dextranos así obtenidos, son muy conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo, puede hacerse referencia al documento de Heinze et al (16) y a la tesis de Ndegwa Henry Maina (17).

- 60 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 una o más etapas de modificación química.

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

- 65 **Descripción de las figuras**

Figura 1: Representación esquemática de la estructura primaria de DsrM (basada en el alineamiento de proteínas con la enzima GFT180 de *Lactobacillus reuteri* 180). Se diferencian cinco dominios: dominio V en blanco, dominio IV en gris claro, dominio B rayado, dominio A en esferas y dominio C en negro. Los motivos repetidos YG según la definición de Giffard y Jacques se han representado con motivos de tipo mosaico.

Figura 2: Representación esquemática de las estructuras primarias de DsrM, DsrM Δ PS Δ C-APY y DsrM Δ 174-1317. Se diferencian cinco dominios: dominio V en blanco, dominio IV en gris claro, dominio B rayado, dominio A en esferas y dominio C en negro. Los motivos repetidos YG según la definición de Giffard y Jacques se han representado con motivos de tipo mosaico.

Figura 3: Características de los soportes de inmovilización comerciales y utilizados para la inmovilización de la enzima DsrM Δ PS Δ C-APY.

Figura 4: Representación gráfica de la actividad enzimática de la dextranasa troncada DsrM Δ PS Δ C-APY en función de la temperatura en condiciones normalizadas, a partir de 100 g.l⁻¹ de sacarosa en acetato de sodio 50 mM, pH 5,75.

Figura 5: Representación gráfica de la actividad enzimática de la dextranasa completa DsrM en función de la temperatura en condiciones normalizadas, a partir de 100 g.l⁻¹ de sacarosa en acetato de sodio 50 mM, pH 5,75.

Figura 6: Representación gráfica de la actividad enzimática de la dextranasa troncada DsrM Δ PS Δ C-APY en función del pH en condiciones normalizadas, a partir de 100 g.l⁻¹ de sacarosa, a 30 °C.

Figura 7: Representación gráfica de la actividad enzimática de la dextranasa completa DsrM en función del pH en condiciones normalizadas, a partir de 100 g.l⁻¹ de sacarosa, a 30 °C.

Figura 8: Representación de la masa molar de los dextranos sintetizados mediante DsrM a 25 °C, pH 5,75 en función de la concentración inicial de sacarosa.

Figura 9: Perfil HPSEC-RI de los productos sintetizados mediante DsrM (forma completa), tras 24 h de reacción a partir de 100 g.l⁻¹ de sacarosa a 30 °C, pH 5,75.

Figura 10: Gráficas de la derecha: Control de la masa molecular de los dextranos sintetizados mediante la enzima DsrM Δ PS Δ C-APY a temperatura fija: 25 °C (A), 30 °C (B), 35 °C (C), 40 °C (D), variando la concentración inicial del sustrato (sacarosa).

Gráficas de la izquierda: Perfiles HPSEC-RI de las reacciones enzimáticas a t=24h a partir de 50 g.l⁻¹, 100 g.l⁻¹, 200 g.l⁻¹, 300 g.l⁻¹ y 400 g.l⁻¹ de sacarosa (respectivamente, curvas de abajo hacia arriba) con temperatura fija: 25 °C (A), 30 °C (B), 35 °C (C), 40 °C (D).

Figura 11: Gráficas de la derecha: Control de la masa molecular de los dextranos sintetizados mediante la enzima DsrM Δ PS Δ C-APY a concentración inicial de sacarosa fija: 50 g.l⁻¹ (A), 100 g.l⁻¹ (B), 200 g.l⁻¹ (C), 300 g.l⁻¹ (D) y 400 g.l⁻¹ (E), haciendo variar la temperatura.

Gráficas de la izquierda: Perfiles HPSEC-RI de las reacciones enzimáticas a t=24h a 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C y 45 °C (respectivamente, curvas de abajo hacia arriba) con concentración inicial de sacarosa fija: 50 g.l⁻¹ (A), 100 g.l⁻¹ (B), 200 g.l⁻¹ (C), 300 g.l⁻¹ (D) y 400 g.l⁻¹ (E).

Figura 12: Perfil HPSEC-RI de los dextranos sintetizados mediante DsrM Δ PS Δ C-APY al finalizar la reacción a partir de 100 g.l⁻¹ de sacarosa a 30 °C, pH 5,75, con a: polímero de masa molecular media de 17,5 kDa, b: disacáridos (leucrosa presente en la mezcla de síntesis final) y c: monosacáridos (fructosa y glucosa).

Figura 13: A: Comparación de la masa molar media de los dextranos sintetizados mediante la enzima DsrM Δ PS Δ C-APY libre (marcador negro) e inmovilizada sobre el soporte Purolite ECR8214® (marcador blanco) a 30 °C y en función de concentraciones iniciales de sacarosa crecientes (50 g.l⁻¹, 100 g.l⁻¹, 200 g.l⁻¹, 300 g.l⁻¹ y 400 g.l⁻¹)

B: Perfiles HPSEC-RI de las reacciones enzimáticas catalizadas mediante DsrM Δ PS Δ C-APY inmovilizada a t=24 h a partir de 50 g.l⁻¹, de 100 g.l⁻¹, de 200 g.l⁻¹, de 300 g.l⁻¹ y de 400 g.l⁻¹ de sacarosa (respectivamente, curvas de abajo hacia arriba).

Figura 14: Espectro H¹ RMN de los productos sintetizados mediante DsrM tras 24 h de reacción a partir de 100 g.l⁻¹ de sacarosa a 30 °C, pH 5,75 con a) enlaces α -1,6, b) leucrosa.

Figura 15: Espectro H¹ RMN de los productos sintetizados mediante DsrM Δ PS Δ C-APY al finalizar la reacción a partir de 100 g.l⁻¹ de sacarosa a 30 °C, pH 5,75 con a) leucrosa, b) enlaces α -1,6.

Descripción detallada de la invención

Ejemplo 1: Identificación del gen *dsrm* en el genoma de *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 y análisis de la estructura primaria de la proteína correspondiente.

El gen *dsrm* se ha identificado en el genoma de *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 por blast nucleotídico contra una base de datos constituida por secuencias nucleotídicas de glucansacarosas clasificadas en la familia 70 de las glucosidohidrolasas según la clasificación CAZY (Carbohydrate Active enZYme database, www.cazy.org/GH70_all.html).

El gen se introdujo en la secuencia proteica mediante el programa informático Transeq de EMBOSS (www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/).

Una secuencia que codifica un péptido de señalización fue identificada mediante el programa informático SignalP server 4.1 (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/).

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 DsrM y cortar la enzima en diferentes dominios proteicos (A, B, C, IV y V).

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 (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) y utilizando los parámetros predeterminados propuestos por el sitio.

Ejemplo 2: Clonación del gen *dsrm*

El gen *dsrm* se amplificó mediante PCR a partir del ADN genómico de *Leuconostoc citreum* NRRL B-1299 y usando los dos cebadores mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1

Cebador	Secuencia (de 5' a 3')
Cebador directo	CACCATGAAAATAAAAGAAACAATTACCCGAAA (SEQ ID NO:3)
Cebador inverso	AAGCTTGCAAAGCAGCCTTATCAATC (SEQ ID NO:4)

La adición de las 4 bases "CACC" en la posición 5' del cebador directo (subrayados en la Tabla 1) 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. 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-55-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).

Ejemplo 3: Clonación del gen *dsrm* Δps Δc -*apy*.

El gen *dsrm* Δps Δc -*apy* se amplificó mediante PCR a partir del plásmido pET-55/DsrM anteriormente construido en el Ejemplo 2 y usando los dos cebadores presentados en la Tabla 2.

Tabla 2

Cebador	Secuencia (de 5' a 3')
Cebador directo	CACCCAAACGCCGTTGGTACAACACAG (SEQ ID NO:5)
Cebador inverso	TTTTGCCATCGTACCATCGTTATT (SEQ ID NO:6)

La adición de las 4 bases "CACC" en la posición 5' del cebador directo (subrayados en la Tabla 2) 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. 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-55-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).

Ejemplo 4: Expresión heteróloga de *dsrm* y *dsrm* Δps Δc -*apy* en *Escherichia coli*

Para la producción de enzimas recombinantes, células d'*Escherichia coli* BL21 star DE3 se transformaron con los

plásmidos correspondientes (pET-55/dsrm o pET-55/ *dsrm* Δps Δc -apy) contruidos según los ejemplos 2 y 3. Se inocularon 300 μ l de la mezcla de transformación en 30 ml de medio LB (caldo lisogénico), complementado con 100 μ g.ml⁻¹ de ampicilina e incubado durante la noche a 37 °C para preparar un precultivo.

Los cultivos de IL en medio ZYM5052 modificado (glicerol al 1 %, glucosa al 0 %, lactosa al 0.1 %, Studier, 2005) se sembraron a una densidad óptica DO_{600 nm} inicial de 0,05 a partir del precultivo del día anterior, y después se incubaron durante 26 horas a 21 °C y a 150 rpm. Al final de la fermentación, los medios de cultivo se centrifugaron (15 min, 6500 rpm, 4 °C) y los sedimentos se concentraron a una DO de 80 en tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 5,75.

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

Ejemplo 5: Método de determinación de la actividad enzimática según el método del DNS.

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

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 μ l 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 hielo, se diluyen a la mitad en agua, y la absorbancia se lee a 540 nm. Un intervalo patrón 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 6: Inmovilización de la dextranacarasa truncada ΔPS ΔC -APY

Se realizó la inmovilización haciendo reaccionar las masas comprendidas entre 0,1 g y 0,6 g de diferentes soportes comerciales con 2,5 ml de sobrenadante de sonicación que contiene la enzima recombinante DsrM ΔPS ΔC -APY. El pH de esta solución enzimática se controla y debe estar comprendido entre 5,75 y 7,5. La reacción se realiza a 4 °C con agitación suave (100 rpm). La inmovilización se detiene después de 16 horas de reacción mediante filtración y lavado con tres volúmenes sucesivos (10 ml) de tampón acetato de sodio, pH 5,75 a 50 mM. La enzima inmovilizada se conserva a 4 °C antes de su uso.

Las características de los soportes estudiados se proporcionan en la Figura 3.

A continuación, dicha enzima inmovilizada se denomina como "DsrM ΔPS ΔC -APY inmovilizada".

Los diferentes soportes de inmovilización se analizaron para determinar su capacidad de fijar la enzima DsrM ΔPS ΔC -APY. La selección consistió en poner en contacto masas de 250 mg de cada soporte con 2,5 ml de sobrenadante de sonicación (actividad libre inicial: 16,5 U/ml).

La actividad fijada después de la reacción y lavado de los diferentes soportes se midió sobre alícuotas obtenidas de cada lote de producto enzimático y de masa controlada. El volumen de reacción también se ha adaptado a la actividad de cada lote, permitiendo los volúmenes más grandes la medición de las enzimas más activas. Los resultados de la selección se presentan en la Tabla 3 siguiente.

Tabla 3

Soporte	Masa de enzima inmovilizada durante la reacción (mg)	Volumen de reacción (ml)	Producción de azúcares reductores (μ mol/min/reacción)	Actividad (U/g)
Purolite ECR8214®	39,5	3	1,03	77,94
Sprinbeads AO110®	35,8	3	0,93	77,77
Sepabeads ECQ1A®	36,7	3	0,43	35,34
Purolite ECR1604®	44,4	3	0,46	31,19
Purolite ECR4204®	56,5	1	1,71	30,27
Sprinbeads AA130®	54,4	1	1,32	24,26

Sprinbeads SN110®	43,4	3	0,32	21,88
----------------------	------	---	------	-------

Los diferentes soportes, según su actividad medida, pueden agruparse en dos categorías:

- los 2 soportes Purolite ECR8214® y Sprinbeads AO110® que presentan las mejores actividades, de aproximadamente 78 U/g;
- 5 soportes que tienen actividades medianas pero buenas, comprendidas entre 22 y 35 U/g;

Solamente el soporte Purolite ECR8214® se utilizó a continuación para optimizar la inmovilización, especialmente mediante optimización de los rendimientos de inmovilización, de las actividades fijadas etc.

La optimización de la inmovilización de DsrM ΔPS ΔC-APY sobre Purolite ECR8214® consistió en hacer variar la masa de soporte entre 100 mg y 600 mg puesta en contacto con una cantidad de enzima libre fija (2,5 ml de sobrenadante de sonicación con una actividad inicial de 45 U/ml).

El cálculo de tres rendimientos diferentes permite caracterizar la inmovilización:

- el rendimiento de fijación $R_{fijación}$, que cuantifica la parte total de la enzima fijada en los soportes

$$R_{fijación}(\%) = \left(1 - \frac{\text{Actividad libre inicial}}{\text{Actividad libre final}}\right) \times 100$$

- el rendimiento de inmovilización $R_{inmovilización}$, que cuantifica la enzima inmovilizada activa en función de la cantidad total de la enzima utilizada para la inmovilización

$$R_{inmovilización}(\%) = \frac{\text{Actividad inmovilizada}}{\text{Actividad libre introducida}} \times 100$$

- eficacia de inmovilización, que cuantifica la cantidad de enzima inmovilizada activa en función de la cantidad total de la enzima inmovilizada eficazmente

$$\text{Eficacia}(\%) = \frac{\text{Actividad inmovilizada}}{(\text{Actividad libre inicial} - \text{Actividad libre final})} \times 100$$

Los resultados de la inmovilización se presentan en la Tabla 4 siguiente.

Tabla 4

masa para inmovilización (mg)	Actividad inmovilizada U/g	Rendimiento de fijación %	Rendimiento de inmovilización %	Eficacia %
105,5	144,3	44	14	31
248,7	147,2	58	33	56
355,6	146,0	80	46	58
456,7	148,2	92	60	66
604,0	132,3	97	71	73

La mejor condición de inmovilización se define como el resultado de un compromiso entre los diferentes rendimientos y la actividad del biocatalizador inmovilizado obtenido.

En primer lugar se observa que el uso de una solución de DsrM ΔPS ΔC-APY libre de actividad más alta (45 U/ml vs 16U/ml utilizada durante la selección de los soportes) permite aumentar significativamente la actividad fijada sobre el soporte. En efecto, las actividades medidas aumentaron en un factor de 2 (véase la Tabla 4, actividades de aproximadamente 140 U/ml).

Por otro lado, las masas del soporte Purolite ECR8214® comprendidas entre 100 y 450 mg permiten obtener una actividad fijada de aproximadamente 140 U/g. Sin querer quedar vinculado por teoría alguna, los inventores piensan que, en estas condiciones, el soporte está completamente saturado de proteína. Esto se confirma además por los rendimientos de fijación y de inmovilización obtenidos que tienden a aumentar con la masa de soporte utilizada.

Más allá de 600 mg puestos en contacto con 2,5 ml de sobrenadante de sonicación, la actividad comienza a disminuir (aproximadamente 132 U/g).

La mejor condición de inmovilización para el soporte Purolite ECR8214® es, por tanto, la puesta en contacto de una cantidad comprendida entre 450 y 600 mg de soporte, típicamente de aproximadamente 500 mg, con 2,5 ml de sobrenadante de sonicación. Estas condiciones permiten obtener la mejor actividad (aproximadamente 140 U/g) limitando a la vez las pérdidas de enzimas (rendimientos elevados).

A continuación, "DsrM ΔPS ΔC-APY inmovilizada" es una dextranasa DsrM ΔPS ΔC-APY inmovilizada sobre el soporte Purolite ECR8214®.

Ejemplo 7: Determinación de los rendimientos de producción de la dextranasa completa DsrM y de la dextranasa troncada DsrM ΔPS ΔC-APY

Los rendimientos de producción se determinan por cromatografía de intercambio aniónico (HPAEC-PAD, High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection) y mediante cromatografía de exclusión por tamaño (HPSEC, High Performance Size Exclusion Chromatography).

Análisis HPAEC-PAD

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 patrón de 5, 10, 15 y 20 mg.kg⁻¹ de estos azúcares y se permite su cuantificación.

Los rendimientos de producción, es decir, la parte de glucosa procedente de la sacarosa incorporada a la formación de glucosa libre, de leucrosa y dextrano se calculan de la siguiente forma:

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

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

Análisis HPSEC

Los azúcares se separaron según su tamaño en dos columnas de permeación en gel puestas en serie (Shodex OH Pack 805 y 802.5) en un horno cuya temperatura se mantiene a 70 °C. El caudal de la fase móvil (NaNO₃ 0,45 M, etilenglicol al 1 %) es de 0,3 ml.min⁻¹. Las muestras se diluyeron en el mismo disolvente que el eluyente a 10 g.l⁻¹ máximo de los azúcares totales.

El análisis de los productos de la reacción mediante cromatografía de exclusión molecular permite calcular la parte de unidades de glucosilo derivadas de sacarosa, utilizadas en la producción de dextrano:

$$\%G_{\text{dextrano}} = \frac{Aire_{\text{dextrano}}}{Aire_{\text{sacarosa}} \times \frac{162}{342}}$$

Dextranasa completa DsrM

En el presente documento se ha puesto de manifiesto que DsrM es una polimerasa muy buena. 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, a 30 °C, pH 5,75, muestran que el 81 % de las unidades de glucosilo derivadas del sustrato se utilizan en la producción de dextrano. Solo se incorpora entre el 4 % y el 15 % de estas unidades a la síntesis de glucosa y leucrosa libres, respectivamente.

Dextranasa troncada DsrM ΔPS ΔC-APY

En el presente se ha puesto de manifiesto que la dextranasa troncada DsrM ΔPS ΔC-APY es también 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, a 30 °C, pH 5,75, muestran que el 85 % de las unidades de glucosilo derivadas del sustrato se utilizan en la producción del polímero. Solo se pierde el 3 % y el 12 % de estas unidades al incorporarse en la síntesis de glucosa y leucrosa libres, respectivamente.

Ejemplo 8: Método de determinación de la masa molar de los dextranos mediante análisis HPSEC

Una gama de patrón realizada con los dextranos comerciales de 503000, 68400, 34100, 11300 g.mol⁻¹, así como maltopheptosa, sacarosa y fructosa ha permitido determinar la masa molar de los dextranos sintetizados mediante DsrM, DsrM ΔPS ΔC-APY o DsrM ΔPS ΔC-APY inmovilizada.

Ejemplo 9: Determinación de las condiciones óptimas de trabajo de la dextranasa completa DsrM y de la dextranasa troncada DsrM ΔPS ΔC-APY

Efecto de la temperatura

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

Como se puede observar en las figuras 4 y 5, la dextranasa troncada DsrM ΔPS ΔC-APY y la dextranasa completa DsrM mostraron una temperatura óptima comprendida entre 30 y 45 °C, que ofrece la posibilidad de trabajar en intervalos de temperatura amplios, y especialmente a temperaturas elevadas.

Efectos del pH

El efecto del pH sobre la actividad enzimática del extracto 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).

Como se observa en la figura 6, la dextranasa troncada DsrM ΔPS ΔC-APY a un pH óptimo comprendido entre 4,5 y 5,5.

Como se observa en la figura 7, la dextranasa completa DsrM a un pH óptimo comprendido entre 5 y 7.

Ejemplo 10: Producción de dextranos de distintas masas molares

Las reacciones enzimáticas con DsrM, DsrM ΔPS ΔC-APY y DsrM ΔPS ΔC-APY inmovilizada se han aplicado a 1 U/ml, a partir de diferentes concentraciones iniciales de sacarosa (50, 100, 200, 300 y 400 g.l⁻¹) y opcionalmente a diferentes temperaturas (25, 30, 35, 40 y 45 °C), en tampón de acetato de sodio, 50 mM, pH 5,75.

Las tomas de muestra en los momentos iniciales y finales (24 h) se realizaron (la reacción enzimática se detuvo por calentamiento a 95 °C durante 5 minutos) y se conservaron a -20 °C antes de analizarse mediante HPAEC-PAD, como se explica en el ejemplo 7, para controlar los rendimientos de producción, y mediante cromatografía de exclusión molecular (HPSEC), como se explica en el ejemplo 8, para determinar la masa molecular de los dextranos sintetizados.

En lo que respecta a los ensayos realizados sobre DsrM ΔPS ΔC-APY inmovilizada, los medios de reacción se centrifugan para eliminar los residuos sólidos de enzima inmovilizada.

Dextranasa completa DsrM

Se observa una variación lineal del tamaño de los productos en función de la concentración inicial de sacarosa (fijación de la temperatura).

De esta forma, es posible controlar la masa molar del dextrano sintetizado por la forma completa de DsrM haciendo variar la concentración inicial de sustrato, a temperatura fija.

De este modo, por ejemplo a 25 °C, es posible obtener un panel de dextranos cuya masa molar media está comprendida entre 32.10³ y 6,5.10³ g.mol⁻¹ para una gama de concentraciones iniciales de sustrato comprendida de 100 a 500 g.l⁻¹ (Figura 8).

La figura 9 pone de manifiesto que un dextrano, sintetizado a partir de 100 g.l⁻¹ de sacarosa sola, a 30 °C y pH 5,75, que presenta una baja masa molar promedio de 27.10³ Da, y es poco polidispersa.

Dextranasa troncada DsrM ΔPS ΔC-APY

Como se puede observar en las figuras 10 y 11, se observa una variación lineal del tamaño de los productos en función de la temperatura (fijación de la concentración inicial de sacarosa) o de la concentración inicial de sacarosa (fijación de la temperatura).

De esta forma, es también posible controlar de forma muy precisa la masa molar del dextrano sintetizado por la dextranasa troncada DsrM ΔPS ΔC-APY haciendo variar la concentración inicial de sustrato, a temperatura fija.

(o a la inversa).

De este modo, a modo de ejemplo, si se fija la temperatura a 25 °C, la dextranasa troncada DsrM Δ PS Δ C-APY produce un dextrano de masa molar media de $25 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹ a partir de 50 g.l⁻¹ de sacarosa y un dextrano de masa molecular media de $8 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹ a partir de 400 g.l⁻¹ de sacarosa.

Por otro lado, se resalta que los dextranos sintetizados son poco polidispersos, salvo los polímeros producidos a partir de altas concentraciones de sacarosa (400 g.l⁻¹).

Igualmente se observa, que es posible explorar un espectro más amplio de productos, en términos de masas moleculares, temperaturas bajas o a partir de pequeñas concentraciones de sacarosa.

Análogamente, para una concentración inicial de sacarosa fijada en 50 g.l⁻¹, es posible obtener dextranos cuya masa molar media está comprendida entre $25 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹ y $7 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹ para una gama de temperaturas comprendida de 25 a 45 °C.

Además, los balances de producción varían poco en función de las condiciones experimentales. Los análisis HPAEC-PAD realizados indican que, para todas las reacciones analizadas, más del 81 % de las unidades de glucosilo derivadas del sustrato se utilizan para la producción del polímero durante el uso de la dextranasa troncada DsrM Δ PS Δ C-APY.

La figura 12 pone de manifiesto que un dextrano, sintetizada a partir de 100 g.l⁻¹ de sacarosa sola, a 30 °C y pH 5,75, que presenta una baja masa molar promedio de $17,5 \cdot 10^3$ Da, y es poco polidispersa.

Dextranasa DsrM Δ PS Δ C-APY inmovilizada

Como se observa en la figura 13, la enzima inmovilizada conserva su capacidad de producir dextranos de masas molares diferentes según la concentración inicial de sacarosa. La variación lineal de la masa molar de los dextranos producidos también se conserva.

Por otro lado, la dispersidad de los dextranos es similar entre las dos formas de la enzima (dextranasa DsrM Δ PS Δ C-APY y dextranasa DsrM Δ PS Δ C-APY inmovilizada) (figura 13).

Finalmente, la dextranasa DsrM Δ PS Δ C-APY inmovilizada sobre el soporte Purolite ECR8214® tiene la particularidad de producir dextranos de masas molares más bajas que las producidas mediante la dextranasa DsrM Δ PS Δ C-APY en condiciones idénticas. Por ejemplo, para una concentración inicial de 100 g.l⁻¹ de sacarosa, se obtiene un dextrano de masa molar $9,4 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹ con la dextranasa DsrM Δ PS Δ C-APY no inmovilizada mientras que se obtiene un dextrano de masa molar $4,7 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹ con la dextranasa DsrM Δ PS Δ C-APY inmovilizada (figura 13). La inmovilización de una dextranasa de acuerdo con la invención presenta por tanto la ventaja de ampliar la gama de dextranos producidos.

Ejemplo 11: Análisis de la naturaleza de los enlaces de los dextranos producidos mediante la dextranasa DsrM y mediante la dextranasa troncada DsrM Δ PS Δ C-APY

Después de la liofilización, 20 mg de medio de reacción en bruto (tras el consumo total de sacarosa) 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.

Dextranasa completa DsrM

Se ha puesto de manifiesto mediante análisis RMN que el producto sintetizado mediante DsrM y 100 g.l⁻¹ de sacarosa sola, a 30 °C en acetato de sodio 50 mM, pH 5,75, es un polímero de unidades de glucosilo unidas exclusivamente t (100 %) en α -1,6 (Figura 14).

El producto sintetizado a partir de DsrM es, por tanto, un dextrano perfectamente lineal, y DsrM es una dextranasa muy específica de la polimerización mediante enlaces osídicos de tipo α -1,6.

Dextranasa troncada DsrM Δ PS Δ C-APY

Se ha puesto de manifiesto mediante los análisis RMN que, análogamente a la dextranasa DsrM, el producto sintetizado a partir de la forma troncada DsrM Δ PS Δ C-APY y 100 g.l⁻¹ de sacarosa sola, a 30 °C y pH 5,75 es un polímero de unidades de glucosilo unidas exclusivamente (100 %) en α -1,6 (Figura 15).

El producto sintético a partir de la forma troncada DsrM Δ PS Δ C-APY es por tanto igualmente un dextrano perfectamente lineal, y DsrM Δ PS Δ C-APY es una dextranasa muy específica de la polimerización mediante enlaces osídicos de tipo α -1,6.

Ejemplo 12: Producción de glucooligosacáridos por reacción del aceptor

Las reacciones de aceptor se han puesto de manifiesto usando 1 U.mL⁻¹ de DsrM ΔPS ΔC-APY y DsrM ΔPS ΔC-APY inmovilizada, a partir de concentraciones iniciales de sacarosa comprendidas de 60 a 333 g.l⁻¹ y de concentraciones de glucosa (que tiene el papel de aceptor glucídico) comprendido de 83 a 333 g.l⁻¹. Las síntesis se realizaron a una temperatura de 30 °C y en un tampón de acetato de sodio, 50 mM, pH 5,75. Las reacciones enzimáticas se detuvieron mediante calentamiento a 95 °C durante 5 minutos después de 24 horas.

Posteriormente, las diferentes muestras se analizaron mediante HPSEC como se explica en el ejemplo 8 para determinar la masa molar media de los productos sintetizados.

Los resultados obtenidos mediante DsrM ΔPS ΔC-APY, es decir, la proteína de actividad dextranasa que tiene por secuencia de aminoácidos la secuencia SEQ ID NO: 2, a partir de diferentes concentraciones de sacarosa y glucosa aceptor se presentan en la Tabla 5 siguiente:

Tabla 5

Relación [Glucosa]/[Sacarosa] ^a	Masa seca total (g.l ⁻¹)	Glucosa (g.l ⁻¹)	Sacarosa (g.l ⁻¹)	Masa molar de glucooligosacáridos (g.mol ⁻¹)
1,25	375	167	208	1,9.10 ³
2,31	375	113	262	2,7.10 ³
1,25	198	88	110	3,4.10 ³
0,50	500	333	167	0,8.10 ³
1,25	375	167	208	1,9.10 ³
0,19	375	315	60	0,7.10 ³
1,25	552	245	307	1,1.10 ³
2,00	500	167	333	1,6.10 ³
1,25	375	167	208	1,9.10 ³
0,50	250	167	83	1,6.10 ³
2,00	250	83	167	1,6.10 ³
1,25	375	167	208	1,9.10 ³

^aRelación calculada a partir de concentraciones másicas

Los resultados obtenidos mediante DsrM ΔPS ΔC-APY inmovilizada, es decir, la proteína con actividad dextranasa que tiene por secuencia de aminoácidos la secuencia SEQ ID NO:2 inmovilizada sobre el soporte ECR8214® como se describe en el ejemplo 6, a partir de diferentes concentraciones de sacarosa y glucosa aceptor se presentan en la Tabla 6 siguiente:

Tabla 6

Relación [Glc]/[Sacarosa] ^a	Masa seca total (g.l ⁻¹)	[Glucosa] (g.l ⁻¹)	[Sacarosa] (g.l ⁻¹)	Masa molar de glucooligosacáridos (g.mol ⁻¹)
1,25	375	167	208	1,5.10 ³
2,31	375	113	262	2,0.10 ³
1,25	198	88	110	2,4.10 ³
0,50	500	333	167	0,7.10 ³
1,25	375	167	208	1,6.10 ³
0,19	375	315	60	0,7.10 ³
1,25	552	245	307	1,0.10 ³
2,00	500	167	333	1,4.10 ³
1,25	375	167	208	1,6.10 ³
1,25	375	167	208	1,5.10 ³
0,50	250	167	83	1,5.10 ³
2,00	250	83	167	2,3.10 ³
1,25	375	167	208	1,6.10 ³

^aRelación calculada a partir de concentraciones másicas

Por tanto, se ha demostrado en el presente documento que, con las condiciones de síntesis aplicadas, la utilización de las dextranastas de acuerdo con la invención permite al menos sintetizar glucooligosacáridos de masa molar media comprendida 0,7.10³ a 3,4.10³ g.mol⁻¹.

Ejemplo 13:

El dextrano comercial de 11 300 g/mol suministrado por Sigma (ref D-9260 lote 74H0764) se comparó con el dextrano sintetizado según el procedimiento de la invención a partir de sacarosa 300 g/l en tampón de acetato de sodio a pH 5,75 y una temperatura de 30 °C para obtener una masa molar de 11 300 g/mol. Un análisis mediante

cromatografía de exclusión en columnas Shodex SB-805 y SB-802.5 en serie muestra que la población de dextranos obtenida mediante el procedimiento de la invención es netamente menos polidisperso que el dextrano comercial.

REFERENCIAS

- (1) Mage y Kabat, Immunochemical studies on dextrans; III. The specificities of rabbit antidextrans. Further findings on antidextrans with 1,2- and 1,6-specificities; 1963; Vol. 91, pág. 634-640
- (2) De Belder, Dextran; Amersham Biosciences; 2003
- (3) Glucansucrases: 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 163, volumen 2, 250-272
- (4) A method for détermination of invertase activity, Sumner & Howell, Journal of biological chemistry, 1935, vol 108, volumen 51
- (5) Moulis C, Vaca Medina G, Suwannarangsee S, Monsan P, Remaud-Simeon M, Potocki-Veronese G (2008) One-step synthesis of isomalto-oligosaccharide syrups and dextrans of controlled size using engineered dextran-sucrase. Biocatal. Biotransformation. Taylor & Francis, pág. 141-151
- (6) Kim et al., Dextran molecular size and degree of branching as a function of sucrose concentration, pH, and temperature of reaction of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM dextran-sucrase; Carbohydrate Research 338 (2003) 1183-1189
- (7) High-level production and purification of a fully active recombinant dextran-sucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, Moulis et al, FEMS Microbiology Letters, agosto de 2006, vol 261, volumen 2, 203-210
- (8) Kothari et al, Structural Characterization of Enzymatically Synthesized Dextran and Oligosaccharides from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1426 Dextran-sucrase. ISSN 0006-2979, Biochemistry (Moscú), 2013, Vol. 78, N.º 10, pág. 1164-1170.
- (9) Amari et al, Characterization of a novel dextran-sucrase from *Weissella confusa* isolated from sourdough. Appl Microbiol Biotechnol (2013) 97:5413-5422
- (10) Kralj et al, Glucan synthesis in the genus *Lactobacillus*: isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six différent strains; Microbiology (2004), 150, 3681-3690.
- (11) Striegel et al, An SEC/MALS study of alternan degradation during size-exclusion chromatographic analysis; Anal Bioanal Chem (2009) 394:1887-1893
- (12) Dextran: effect of process parameters on production, purification and molecular weight and recent applications, Vettori et al., Diálogos & Ciência, ISSN 1678-0493, n.º 31, septiembre de 2012
- (13) GOULAS, A. K. et al. Synthesis of isomaltoligosaccharides and oligodextrans by the combined use of dextran-sucrase and dextranase. Enzyme Microb. Technol., 35, 2004. 327-338.
- (14) Naessens et al., M. et al. *Leuconostoc* dextran-sucrase and dextran: production, properties and applications. J. Chem. Technol. Biotechnol., 80, 2005. 845-860.
- (15) EGGLESTON AND COTE, G. L. Oligosaccharides in food and agriculture. Washington, DC: ACS symposium series 849, 2003. p. 1-15.
- (16) 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.
- (17) 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.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Institut National de la Recherche Agronomique
- <120> Proteína con actividad dextran-sacarasa y aplicaciones
- <130> BCT150203 QT <160> 6
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 2065
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Dextran-sacarasa
- <400> 1

ES 2 759 320 T3

Met	Lys	Ile	Lys	Glu	Thr	Ile	Thr	Arg	Lys	Lys	Leu	Tyr	Lys	Ser	Gly	1	5	10	15
Lys	Ser	Trp	Val	Ala	Ala	Ala	Thr	Ala	Phe	Ala	Val	Met	Gly	Val	Ser	20	25	30	
Ala	Val	Thr	Thr	Val	Ser	Ala	Asp	Thr	Gln	Thr	Pro	Val	Gly	Thr	Thr	35	40	45	
Gln	Ser	Gln	Gln	Asp	Leu	Thr	Gly	Gln	Thr	Gly	Gln	Asp	Lys	Pro	Thr	50	55	60	
Thr	Lys	Glu	Val	Ile	Asp	Lys	Lys	Glu	Pro	Val	Pro	Arg	Val	Ser	Ala	65	70	75	80
Gln	Asn	Ala	Gly	Asp	Leu	Ser	Ala	Asp	Ala	Lys	Thr	Thr	Lys	Ala	Asp	85	90	95	
Asp	Lys	Gln	Asp	Thr	Gln	Pro	Thr	Asn	Ala	Gln	Leu	Pro	Asp	Gln	Gly	100	105	110	
Asn	Lys	Gln	Thr	Asn	Ser	Asn	Ser	Asp	Lys	Gly	Val	Lys	Glu	Ser	Thr	115	120	125	
Thr	Ala	Pro	Val	Lys	Thr	Thr	Asp	Val	Pro	Ser	Lys	Ser	Val	Ala	Pro	130	135	140	
Glu	Thr	Asn	Thr	Ser	Ile	Asn	Ala	Ser	Asp	Ala	Ile	Ser	Lys	Ser	Gln	145	150	155	160
Glu	Lys	Gln	Phe	Glu	Lys	Ala	Pro	Asp	Ser	Val	Pro	Glu	Thr	Ile	Thr				

ES 2 759 320 T3

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

ES 2 759 320 T3

Gly Leu Thr Ser Gln Asn Ser Val Ala Thr Ser His Asn Ala Ala Lys
 420 425 430
 Ser Tyr Asp Thr Lys Ser Phe Thr Asn Val Asp Gly Phe Leu Thr Ala
 435 440 445
 Asn Ser Trp Tyr Arg Pro Thr Asp Ile Leu Arg Asn Gly Thr Lys Trp
 450 455 460
 Glu Pro Ser Thr Glu Thr Asp Phe Arg Pro Leu Leu Met Thr Trp Trp
 465 470 475 480
 Pro Asp Lys Glu Val Gln Ala Asn Tyr Leu Asn Tyr Met Ser Ala Leu
 485 490 495
 Gly Leu Gly Asp Gln Lys Ile Tyr Thr Gly Ala Ser Ser Gln Leu Asp
 500 505 510
 Leu Asn Asn Ala Ala Leu Ile Val Gln Glu Ala Ile Glu Lys Lys Ile
 515 520 525
 Ser Leu Glu Lys Ser Thr Lys Trp Leu Asp Asp Ser Ile Lys Ser Phe
 530 535 540
 Ile Lys Ser Lys Arg Lys Asp Ile Gln Gly Asn Leu Val Asp Thr Asn
 545 550 555 560
 Pro Gly Trp Thr Ile Asp Ser Glu Thr Gly Ser Thr Asn His Leu Gln
 565 570 575
 Asn Gly Ala Phe Ile Phe Thr Asn Ser Pro Leu Val Pro Glu Ala Asn
 580 585 590
 Ala Ala Glu Gly Asn Arg Leu Ile Asn Arg Thr Pro Ser Gln Gln Thr
 595 600 605
 Gly Asn His Ile Ser Tyr Ala Ser Gln Pro Tyr Ser Gly Asp Asp Trp
 610 615 620
 Gly Tyr Glu Leu Leu Leu Gly Asn Asp Val Asp Asn Ser Asn Pro Ile
 625 630 635 640
 Val Gln Ala Glu Gln Leu Asn Trp Ile His Tyr Leu Met Asn Phe Gly
 645 650 655
 Thr Ile Thr Ala Pro Gln Asp Pro Asp Ala His Leu Ala Asn Phe Asp
 660 665 670

ES 2 759 320 T3

Ser Ile Arg Ile Asp Ala Val Asp Asn Val Asp Ala Asp Leu Leu Gln
 675 680 685
 Ile Ala Gly Asp Tyr Phe Lys Ala Ala Tyr Gln Val Gly Glu Asn Asp
 690 695 700
 Lys Asn Ala Asn Gln His Ile His Ile Leu Glu Asp Trp Ser Pro Asn
 705 710 715 720
 Asp Val Trp Tyr Asn Gln Gln Val Asn Gly Asn Ser Gln Leu Thr Met
 725 730 735
 Asp Ala Thr Met Gln Asn Gln Leu Leu Ala Ser Leu Thr Arg Pro Ile
 740 745 750
 Thr Ser Arg Asp Ser Met Lys Ser Phe Thr Lys Asp Ala Leu Leu Val
 755 760 765
 His Arg Thr Ala Asp Asn Ser Tyr Asn Gln Ala Val Pro Asn Tyr Ser
 770 775 780
 Phe Ile Arg Ala His Asp Ser Glu Val Gln Thr Ile Ile Ala Lys Ile
 785 790 795 800
 Ile Ser Asp Lys His Pro Asp Leu Tyr Pro Thr Val Asp Lys Ala Leu
 805 810 815
 Leu Ala Lys Asp Ser Ala Leu Tyr Asp Glu Ala Phe Thr Glu Tyr Asn
 820 825 830
 Ala Asp Met Gln Lys Ile Ser Ser Gln Lys Gln Tyr Thr His Asn Asn
 835 840 845
 Met Pro Ser Ala Tyr Ala Ile Leu Leu Thr Asn Lys Asp Thr Val Pro
 850 855 860
 Arg Val Tyr Tyr Gly Asp Leu Phe Thr Asp Asn Gly Glu Tyr Met Ala
 865 870 875 880
 Asn Lys Thr Pro Tyr Tyr Asp Ala Ile Thr Ser Leu Leu Thr Ala Arg
 885 890 895
 Thr Lys Phe Val Ser Gly Gly Gln Ser Leu Ser Val Asp Lys Asn Asp
 900 905 910
 Val Leu Thr Ser Val Arg Tyr Gly Lys Gly Ala Leu Ser Ala Thr Asp
 915 920 925

ES 2 759 320 T3

Asn	Gly	Ser	Ser	Asp	Thr	Arg	Asn	Gln	Gly	Ile	Gly	Val	Ile	Val	Ser
930						935					940				
Asn	Asn	Pro	Asn	Leu	Asp	Leu	Asn	Asn	Asp	Lys	Val	Thr	Leu	Ser	Met
945					950					955					960
Gly	Ile	Ser	His	Ala	His	Gln	Ala	Tyr	Arg	Pro	Leu	Leu	Leu	Thr	Asn
				965					970					975	
Ser	Gln	Gly	Ile	Val	Ala	Tyr	Ala	Thr	Asp	Ser	Glu	Val	Pro	Gln	Asn
			980					985					990		
Leu	Tyr	Lys	Thr	Thr	Asn	Asp	Lys	Gly	Glu	Leu	Thr	Phe	Asp	Ala	Ser
		995					1000					1005			
Glu	Ile	Lys	Gly	Tyr	Asp	Thr	Val	Gln	Thr	Ser	Gly	Tyr	Leu	Ala	
1010						1015					1020				
Val	Trp	Val	Pro	Val	Gly	Ala	Ser	Asp	Glu	Gln	Asp	Ala	Arg	Thr	
1025						1030					1035				
Ile	Ala	Ser	Thr	Glu	Lys	Asn	Asn	Gly	Asn	Ser	Val	Tyr	His	Ser	
1040						1045					1050				
Asn	Ala	Ala	Leu	Asp	Ser	Gln	Leu	Ile	Tyr	Glu	Gly	Phe	Ser	Asn	
1055						1060					1065				
Phe	Gln	Thr	Val	Pro	Ser	Lys	Asn	Ala	Ser	Ala	Asp	Glu	Tyr	Ala	
1070						1075					1080				
Asn	Val	Ile	Ile	Ala	Lys	His	Ala	Ala	Asp	Phe	Asn	Lys	Trp	Gly	
1085						1090					1095				
Val	Thr	Ser	Phe	Gln	Met	Ala	Pro	Gln	Tyr	Arg	Ser	Ser	Thr	Asp	
1100						1105					1110				
Gly	Ser	Phe	Leu	Asp	Ala	Val	Asp	Thr	Val	Gln	Asn	Gly	Tyr	Ala	
1115						1120					1125				
Phe	Thr	Asp	Arg	Tyr	Asp	Leu	Gly	Phe	Asn	Ala	Ala	Asp	Gly	Ser	
1130						1135					1140				
Lys	Asn	Pro	Thr	Lys	Tyr	Gly	Thr	Asp	Glu	Asp	Leu	Arg	Asn	Ala	
1145						1150					1155				
Ile	Lys	Ser	Leu	His	Ala	Gln	Lys	Thr	Tyr	Asp	Gly	Ser	Ser	Ile	

ES 2 759 320 T3

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

ES 2 759 320 T3

Asn Thr	Tyr Tyr Phe Asp	Ala	Arg Gly Glu Met	Val	Thr Ser Gln
1400		1405		1410	
Tyr Ile	Ser Asp Asp Thr	Gln	Asn Ile Tyr Tyr	Phe	Asn Asn Asp
1415		1420		1425	
Gly Thr	Met Ala Lys Gly	Leu	Ile Gln Leu Asn	Thr	Asn Leu Gln
1430		1435		1440	
Tyr Phe	Gly Thr Asn Gly	Ala	Gln Leu Lys Gly	Ala	Tyr Val His
1445		1450		1455	
Asp Ile	Ser Ser Asp Lys	Trp	Tyr Gln Phe Asp	Ala	Gly Ser Gly
1460		1465		1470	
Asn Gly	Arg Gln Leu Thr	Gln	Arg Pro Asp Asp	Val	Asn Ala Asn
1475		1480		1485	
Asn Tyr	Ile Ser Ile Asp	Ser	Ser Ser Asn Ile	Gly	Val Asn Thr
1490		1495		1500	
Asp Tyr	Thr Ala Tyr Ile	Thr	Ser Ser Leu Arg	Glu	Asp Gly Leu
1505		1510		1515	
Phe Ala	Asn Ala Pro Tyr	Gly	Val Val Thr Lys	Asp	Gln Asn Gly
1520		1525		1530	
Asn Asp	Leu Lys Trp Gln	Tyr	Ile Asn His Thr	Lys	Gln Tyr Glu
1535		1540		1545	
Gly Gln	Gln Val Gln Val	Thr	Arg Gln Tyr Thr	Asp	Ser Lys Gly
1550		1555		1560	
Val Ser	Trp Asn Leu Ile	Thr	Phe Ala Gly Gly	Asp	Leu Gln Gly
1565		1570		1575	
Gln Lys	Leu Trp Val Asp	Ser	Arg Ala Leu Thr	Met	Thr Pro Phe
1580		1585		1590	
Lys Thr	Met Asn Gln Ile	Ser	Phe Ile Ser Tyr	Ala	Asn Arg Asn
1595		1600		1605	
Asp Gly	Leu Phe Leu Asn	Ala	Pro Tyr Gln Val	Lys	Gly Tyr Gln
1610		1615		1620	
Leu Ala	Gly Met Ser Asn	Gln	Tyr Lys Gly Gln	Gln	Val Thr Ile
1625		1630		1635	

ES 2 759 320 T3

Ala Gly 1640	Val Ala Asn Val Ser 1645	Gly Lys Asp Trp Ser 1650	Leu Ile Ser
Phe Asn 1655	Gly Thr Gln Tyr Trp 1660	Ile Asp Ser Gln Ala 1665	Leu Asn Thr
Asn Phe 1670	Thr His Asp Met Asn 1675	Gln Lys Val Phe Val 1680	Asn Thr Thr
Ser Asn 1685	Leu Asp Gly Leu Phe 1690	Leu Asn Ala Pro Tyr 1695	Arg Gln Pro
Gly Tyr 1700	Lys Leu Ala Gly Leu 1705	Ala Lys Asn Tyr Asn 1710	Asn Gln Thr
Val Thr 1715	Val Ser Gln Gln Tyr 1720	Phe Asp Asp Gln Gly 1725	Thr Val Trp
Ser Gln 1730	Val Val Leu Gly Gly 1735	Gln Thr Val Trp Val 1740	Asp Asn His
Ala Leu 1745	Ala Gln Met Gln Val 1750	Arg Asp Thr Asn Gln 1755	Gln Leu Tyr
Val Asn 1760	Ser Asn Gly Arg Asn 1765	Asp Gly Leu Phe Leu 1770	Asn Ala Pro
Tyr Arg 1775	Gly Gln Gly Ser Gln 1780	Leu Ile Gly Met Thr 1785	Ala Asp Tyr
Asn Gly 1790	Gln His Val Gln Val 1795	Thr Lys Gln Gly Gln 1800	Asp Ala Tyr
Gly Ala 1805	Gln Trp Arg Leu Ile 1810	Thr Leu Asn Asn Gln 1815	Gln Val Trp
Val Asp 1820	Ser Arg Ala Leu Ser 1825	Thr Thr Ile Met Gln 1830	Ala Met Asn
Asp Asp 1835	Met Tyr Val Asn Ser 1840	Ser Gln Arg Thr Asp 1845	Gly Leu Trp
Leu Asn 1850	Ala Pro Tyr Thr Met 1855	Ser Gly Ala Lys Trp 1860	Ala Gly Asp
Thr Arg 1865	Ser Ala Asn Gly Arg 1870	Tyr Val His Ile Ser 1875	Lys Ala Tyr

ES 2 759 320 T3

Ser	Asn	Glu	Val	Gly	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Leu	Thr	Asn	Leu	Asn	Gly
1880						1885					1890			
Gln	Ser	Thr	Trp	Ile	Asp	Lys	Arg	Ala	Phe	Thr	Ala	Thr	Phe	Asp
1895						1900					1905			
Gln	Val	Val	Ala	Leu	Asn	Ala	Thr	Ile	Val	Ala	Arg	Gln	Arg	Pro
1910						1915					1920			
Asp	Gly	Met	Phe	Lys	Thr	Ala	Pro	Tyr	Gly	Glu	Ala	Gly	Ala	Gln
1925						1930					1935			
Phe	Val	Asp	Tyr	Val	Thr	Asn	Tyr	Asn	Gln	Gln	Thr	Val	Pro	Val
1940						1945					1950			
Thr	Lys	Gln	His	Ser	Asp	Ala	Gln	Gly	Asn	Gln	Trp	Tyr	Leu	Ala
1955						1960					1965			
Thr	Val	Asn	Gly	Thr	Gln	Tyr	Trp	Ile	Asp	Gln	Arg	Ser	Phe	Ser
1970						1975					1980			
Pro	Val	Val	Thr	Lys	Val	Val	Asp	Tyr	Gln	Ala	Lys	Ile	Val	Pro
1985						1990					1995			
Arg	Thr	Thr	Arg	Asp	Gly	Val	Phe	Ser	Gly	Ala	Pro	Tyr	Gly	Glu
2000						2005					2010			
Val	Asn	Ala	Lys	Leu	Val	Asn	Met	Ala	Thr	Ala	Tyr	Gln	Asn	Gln
2015						2020					2025			
Val	Val	His	Ala	Thr	Gly	Glu	Tyr	Thr	Asn	Ala	Ser	Gly	Ile	Thr
2030						2035					2040			
Trp	Ser	Gln	Phe	Ala	Leu	Ser	Gly	Gln	Glu	Asp	Lys	Leu	Trp	Ile
2045						2050					2055			
Asp	Lys	Arg	Ala	Leu	Gln	Ala								
2060						2065								

<210> 2
 <211> 1392
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Dextranacarasa troncada

<400> 2

ES 2 759 320 T3

Gln	Thr	Pro	Val	Gly	Thr	Thr	Gln	Ser	Gln	Gln	Asp	Leu	Thr	Gly	Gln	
1				5					10					15		
Thr	Gly	Gln	Asp	Lys	Pro	Thr	Thr	Lys	Glu	Val	Ile	Asp	Lys	Lys	Glu	
			20					25					30			
Pro	Val	Pro	Arg	Val	Ser	Ala	Gln	Asn	Ala	Gly	Asp	Leu	Ser	Ala	Asp	
		35					40					45				
Ala	Lys	Thr	Thr	Lys	Ala	Asp	Asp	Lys	Gln	Asp	Thr	Gln	Pro	Thr	Asn	
	50					55					60					
Ala	Gln	Leu	Pro	Asp	Gln	Gly	Asn	Lys	Gln	Thr	Asn	Ser	Asn	Ser	Asp	
65					70					75					80	
Lys	Gly	Val	Lys	Glu	Ser	Thr	Thr	Ala	Pro	Val	Lys	Thr	Thr	Asp	Val	
				85					90					95		
Pro	Ser	Lys	Ser	Val	Ala	Pro	Glu	Thr	Asn	Thr	Ser	Ile	Asn	Ala	Ser	
			100					105					110			
Asp	Ala	Ile	Ser	Lys	Ser	Gln	Glu	Lys	Gln	Phe	Glu	Lys	Ala	Pro	Asp	
		115					120					125				
Ser	Val	Pro	Glu	Thr	Ile	Thr	Gly	Gly	Arg	Tyr	Ser	Leu	Lys	Asp	Gly	
	130					135					140					
Tyr	Tyr	Val	Tyr	Leu	Asp	Lys	Gln	Gly	Lys	Gln	Val	Val	Gly	Pro	Lys	
145					150					155					160	
Asn	Ile	Asp	Asn	His	Leu	Gln	Tyr	Phe	Asp	Glu	Thr	Thr	Gly	Lys	Gln	
				165					170					175		
Val	Lys	Gly	Asp	Phe	Arg	Ser	Val	Asn	Gly	Lys	Arg	Ile	Tyr	Phe	Asn	
			180					185					190			
Ala	Asn	Leu	Gly	Tyr	Ala	Asp	Asp	Tyr	Thr	Thr	Asp	Val	Ala	Gly	Lys	
		195					200					205				
Leu	Val	Gly	Tyr	Asp	Ser	Asn	Gly	Asn	Gln	Val	Lys	Ala	Gly	Tyr	Val	
	210					215					220					
Thr	Asn	Ser	Gln	Gly	Lys	Thr	Tyr	Tyr	Phe	Asn	Asn	Gln	Gly	Glu	Ala	
225					230					235					240	
Ile	Ile	Gly	Leu	Lys	Thr	Asp	Asn	Asn	Lys	Thr	Gln	Tyr	Phe	Gly	Pro	
				245					250					255		

ES 2 759 320 T3

Asp Gly Ala Gln Val Lys Gly Ala Phe Gln Gln Val Asn Gly Lys Asn
 260 265 270
 Ile Tyr Phe Asp Ala Gln Thr Gly Tyr Ala Arg Gln Asn Val Gly Phe
 275 280 285
 Leu Asp Gly Thr Ala Lys Gly Phe Asp Glu Gln Gly Asn Gln Ile Lys
 290 295 300
 Ser Gly Ile Ala Thr Asp Leu Ser Gly Asn Val Tyr Tyr Phe Asp Ala
 305 310 315 320
 Ser Gly Lys Met Leu Thr Gly Val Gln Asn Ile Asp Gly Lys Lys Tyr
 325 330 335
 Tyr Phe Asp Glu Gln Gly His Arg Arg Arg Asn Tyr Ala Gly Val Phe
 340 345 350
 Asn Asn Glu Phe Ile Tyr Phe Gly Leu Asp Gly Val Gly Gln Ser Ala
 355 360 365
 Ile Glu Tyr Gln Phe Glu Lys Gly Leu Thr Ser Gln Asn Ser Val Ala
 370 375 380
 Thr Ser His Asn Ala Ala Lys Ser Tyr Asp Thr Lys Ser Phe Thr Asn
 385 390 395 400
 Val Asp Gly Phe Leu Thr Ala Asn Ser Trp Tyr Arg Pro Thr Asp Ile
 405 410 415
 Leu Arg Asn Gly Thr Lys Trp Glu Pro Ser Thr Glu Thr Asp Phe Arg
 420 425 430
 Pro Leu Leu Met Thr Trp Trp Pro Asp Lys Glu Val Gln Ala Asn Tyr
 435 440 445
 Leu Asn Tyr Met Ser Ala Leu Gly Leu Gly Asp Gln Lys Ile Tyr Thr
 450 455 460
 Gly Ala Ser Ser Gln Leu Asp Leu Asn Asn Ala Ala Leu Ile Val Gln
 465 470 475 480
 Glu Ala Ile Glu Lys Lys Ile Ser Leu Glu Lys Ser Thr Lys Trp Leu
 485 490 495
 Asp Asp Ser Ile Lys Ser Phe Ile Lys Ser Lys Arg Lys Asp Ile Gln

ES 2 759 320 T3

500					505					510					
Gly	Asn	Leu	Val	Asp	Thr	Asn	Pro	Gly	Trp	Thr	Ile	Asp	Ser	Glu	Thr
		515					520					525			
Gly	Ser	Thr	Asn	His	Leu	Gln	Asn	Gly	Ala	Phe	Ile	Phe	Thr	Asn	Ser
	530					535					540				
Pro	Leu	Val	Pro	Glu	Ala	Asn	Ala	Ala	Glu	Gly	Asn	Arg	Leu	Ile	Asn
545					550					555					560
Arg	Thr	Pro	Ser	Gln	Gln	Thr	Gly	Asn	His	Ile	Ser	Tyr	Ala	Ser	Gln
				565					570					575	
Pro	Tyr	Ser	Gly	Asp	Asp	Trp	Gly	Tyr	Glu	Leu	Leu	Leu	Gly	Asn	Asp
			580					585					590		
Val	Asp	Asn	Ser	Asn	Pro	Ile	Val	Gln	Ala	Glu	Gln	Leu	Asn	Trp	Ile
		595					600					605			
His	Tyr	Leu	Met	Asn	Phe	Gly	Thr	Ile	Thr	Ala	Pro	Gln	Asp	Pro	Asp
	610					615					620				
Ala	His	Leu	Ala	Asn	Phe	Asp	Ser	Ile	Arg	Ile	Asp	Ala	Val	Asp	Asn
625					630					635					640
Val	Asp	Ala	Asp	Leu	Leu	Gln	Ile	Ala	Gly	Asp	Tyr	Phe	Lys	Ala	Ala
				645					650					655	
Tyr	Gln	Val	Gly	Glu	Asn	Asp	Lys	Asn	Ala	Asn	Gln	His	Ile	His	Ile
			660					665					670		
Leu	Glu	Asp	Trp	Ser	Pro	Asn	Asp	Val	Trp	Tyr	Asn	Gln	Gln	Val	Asn
		675					680					685			
Gly	Asn	Ser	Gln	Leu	Thr	Met	Asp	Ala	Thr	Met	Gln	Asn	Gln	Leu	Leu
	690					695					700				
Ala	Ser	Leu	Thr	Arg	Pro	Ile	Thr	Ser	Arg	Asp	Ser	Met	Lys	Ser	Phe
705					710					715					720
Thr	Lys	Asp	Ala	Leu	Leu	Val	His	Arg	Thr	Ala	Asp	Asn	Ser	Tyr	Asn
				725					730					735	
Gln	Ala	Val	Pro	Asn	Tyr	Ser	Phe	Ile	Arg	Ala	His	Asp	Ser	Glu	Val
			740					745					750		

ES 2 759 320 T3

Gln Thr Ile Ile Ala Lys Ile Ile Ser Asp Lys His Pro Asp Leu Tyr
 755 760 765
 Pro Thr Val Asp Lys Ala Leu Leu Ala Lys Asp Ser Ala Leu Tyr Asp
 770 775 780
 Glu Ala Phe Thr Glu Tyr Asn Ala Asp Met Gln Lys Ile Ser Ser Gln
 785 790 795 800
 Lys Gln Tyr Thr His Asn Asn Met Pro Ser Ala Tyr Ala Ile Leu Leu
 805 810 815
 Thr Asn Lys Asp Thr Val Pro Arg Val Tyr Tyr Gly Asp Leu Phe Thr
 820 825 830
 Asp Asn Gly Glu Tyr Met Ala Asn Lys Thr Pro Tyr Tyr Asp Ala Ile
 835 840 845
 Thr Ser Leu Leu Thr Ala Arg Thr Lys Phe Val Ser Gly Gly Gln Ser
 850 855 860
 Leu Ser Val Asp Lys Asn Asp Val Leu Thr Ser Val Arg Tyr Gly Lys
 865 870 875 880
 Gly Ala Leu Ser Ala Thr Asp Asn Gly Ser Ser Asp Thr Arg Asn Gln
 885 890 895
 Gly Ile Gly Val Ile Val Ser Asn Asn Pro Asn Leu Asp Leu Asn Asn
 900 905 910
 Asp Lys Val Thr Leu Ser Met Gly Ile Ser His Ala His Gln Ala Tyr
 915 920 925
 Arg Pro Leu Leu Leu Thr Asn Ser Gln Gly Ile Val Ala Tyr Ala Thr
 930 935 940
 Asp Ser Glu Val Pro Gln Asn Leu Tyr Lys Thr Thr Asn Asp Lys Gly
 945 950 955 960
 Glu Leu Thr Phe Asp Ala Ser Glu Ile Lys Gly Tyr Asp Thr Val Gln
 965 970 975
 Thr Ser Gly Tyr Leu Ala Val Trp Val Pro Val Gly Ala Ser Asp Glu
 980 985 990
 Gln Asp Ala Arg Thr Ile Ala Ser Thr Glu Lys Asn Asn Gly Asn Ser
 995 1000 1005

ES 2 759 320 T3

Val Tyr	His Ser Asn Ala	Ala	Leu Asp Ser Gln Leu	Ile Tyr Glu
1010		1015		1020
Gly Phe	Ser Asn Phe Gln Thr	Val Pro Ser Lys Asn	Ala Ser Ala	
1025		1030		1035
Asp Glu	Tyr Ala Asn Val Ile	Ile Ala Lys His Ala	Ala Asp Phe	
1040		1045		1050
Asn Lys	Trp Gly Val Thr Ser	Phe Gln Met Ala Pro	Gln Tyr Arg	
1055		1060		1065
Ser Ser	Thr Asp Gly Ser Phe	Leu Asp Ala Val Asp	Thr Val Gln	
1070		1075		1080
Asn Gly	Tyr Ala Phe Thr Asp	Arg Tyr Asp Leu Gly	Phe Asn Ala	
1085		1090		1095
Ala Asp	Gly Ser Lys Asn Pro	Thr Lys Tyr Gly Thr	Asp Glu Asp	
1100		1105		1110
Leu Arg	Asn Ala Ile Lys Ser	Leu His Ala Gln Lys	Thr Tyr Asp	
1115		1120		1125
Gly Ser	Ser Ile Gln Val Met	Ala Asp Phe Val Pro	Asp Gln Leu	
1130		1135		1140
Tyr Asn	Met Pro Leu Glu Gln	Ala Val Ser Val Ile	Arg Thr Asp	
1145		1150		1155
Lys Tyr	Gly Val Asn Ser Glu	Asn Pro Asp Ile Gln	Asn Ile Ile	
1160		1165		1170
Tyr Ala	Ala Asn Ile Lys Ser	Ser Gly Thr Asp Tyr	Gln Ser Ile	
1175		1180		1185
Tyr Gly	Gly Lys Tyr Leu Ala	Glu Leu Gln Lys Asn	Pro Leu Phe	
1190		1195		1200
Lys Ser	Leu Phe Asp Arg Ile	Gln Ile Ser Thr Lys	Lys Thr Ile	
1205		1210		1215
Asp Pro	Asn Thr Arg Ile Thr	Gln Trp Ser Ala Lys	Tyr Phe Asn	
1220		1225		1230
Gly Ser	Asn Ile Gln Gly Lys	Gly Ile Asn Tyr Val	Leu Lys Asp	
1235		1240		1245

ES 2 759 320 T3

Trp	Ala	Ser	Asn	Lys	Tyr	Phe	Asn	Val	Ser	Ser	Asn	Asp	Asp	Met
	1250					1255					1260			
Tyr	Ser	Arg	Leu	Pro	Lys	Gln	Leu	Met	Asn	Gln	Glu	Ser	Asn	Thr
	1265					1270					1275			
Gly	Phe	Ile	Val	Asp	Asp	Ile	Gly	Val	Lys	Tyr	Tyr	Ser	Ile	Ser
	1280					1285					1290			
Gly	Tyr	Gln	Ala	Lys	Asn	Thr	Phe	Val	Glu	Asp	Gly	Asn	Gly	Glu
	1295					1300					1305			
Trp	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Asn	Asp	Gly	Tyr	Met	Val	Lys	Ser	Thr	Glu
	1310					1315					1320			
Glu	Ser	Gly	Pro	Leu	Arg	Thr	Val	Asn	Ala	Ser	Ser	Lys	Lys	Tyr
	1325					1330					1335			
Tyr	Ile	Leu	Pro	Asn	Gly	Val	Glu	Ile	Arg	Asn	Ser	Phe	Gly	Gln
	1340					1345					1350			
Asp	Ile	Gln	Gly	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Ala	Arg	Gly	Glu	Met
	1355					1360					1365			
Val	Thr	Ser	Gln	Tyr	Ile	Ser	Asp	Asp	Thr	Gln	Asn	Ile	Tyr	Tyr
	1370					1375					1380			
Phe	Asn	Asn	Asp	Gly	Thr	Met	Ala	Lys						
	1385					1390								

5 <210> 3
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 3
 caccatgaaa ataaaagaaa caattacccg aaa 33

15 <210> 4
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cebador

<400> 4
 aagcttgcaa agcacgctta tcaatc 26

25 <210> 5

ES 2 759 320 T3

	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 5	
10	cacccaaacg ccggttgga caacacag	28
	<210> 6	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 6	
20	tttgccatc gtaccatcgt tatt	24

REIVINDICACIONES

1. Proteína de actividad dextranasa que tiene por secuencia de aminoácidos la secuencia SEQ ID NO: 1, o que comprende al menos un 80 %, preferentemente un 85 %, aún más preferentemente un 90 %, aún más preferentemente un 95 %, aún más preferentemente un 98 % de identidad en las posiciones 563 a 1282 de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, preferentemente en las posiciones 563 a 1282 y 1316 a 1433 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, aún más preferentemente en las posiciones 563 a 1282, 1316 a 1433 y 174 a 421 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, aún más preferentemente en las posiciones 563 a 1282, 1316 a 1433 y 42 a 421 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, la actividad dextranasa que permite la síntesis de dextranos de masa molar media en peso M_w comprendida entre $2 \cdot 10^3$ y $40 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹, y un índice de dispersidad D_i menor de 1,5, a temperaturas comprendidas de 20 °C a 50 °C y a concentraciones iniciales de sacarosa comprendidas de 50 g.l⁻¹ a 600 g.l⁻¹.
2. Proteína de actividad dextranasa que tiene por secuencia de aminoácidos la secuencia SEQ ID NO: 2, o que comprende al menos un 80 %, preferentemente un 85 %, aún más preferentemente un 90 %, aún más preferentemente un 95 %, aún más preferentemente a un 98 % de identidad en las posiciones 522 a 1241 de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, preferentemente en las posiciones 522 a 1241 y 1275 a 1392 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, aún más preferentemente en las posiciones 522 a 1241, 1275 a 1392 y 133 a 380 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, aún más preferentemente en las posiciones 522 a 1241, 1275 a 1392 y 1 a 380 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, la actividad dextranasa que permite la síntesis de dextranos de masa molar media en peso M_w comprendida entre $2 \cdot 10^3$ y $40 \cdot 10^3$ g.mol⁻¹, y un índice de dispersidad D_i menor de 1,5, a temperaturas comprendidas de 20 °C a 50 °C y a concentraciones iniciales de sacarosa comprendidas de 50 g.l⁻¹ a 600 g.l⁻¹.
3. Proteína con actividad dextranasa según la reivindicación 2, **caracterizada porque** tiene por secuencia de aminoácidos la secuencia SEQ ID NO: 2.
4. Complejo que comprende un soporte y una proteína con actividad dextranasa tal como se ha definido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada porque** dicha proteína con actividad dextranasa se ha inmovilizado sobre dicho soporte.
5. Procedimiento de síntesis de dextranos, en el que:
 - se suministra sacarosa en un medio de síntesis,
 - se pone en contacto una dextranasa tal como se ha definido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 con dicha sacarosa de dicho medio de síntesis para formar dextranos, y
 - opcionalmente, se aíslan los dextranos obtenidos.
6. Procedimiento de síntesis de dextranos, en el que:
 - se suministra sacarosa en un medio de síntesis,
 - se pone en contacto un complejo tal como se ha definido según la reivindicación 4 con dicha sacarosa en dicho medio de síntesis para formar dextranos, y
 - opcionalmente, se aíslan los dextranos obtenidos.
7. Procedimiento de síntesis según las reivindicaciones 5 o 6, **caracterizado porque** la síntesis se realiza a una temperatura comprendida entre 20 °C y 50 °C, preferentemente comprendida entre 25 °C y 45 °C.
8. Procedimiento de síntesis según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, **caracterizado por que** la concentración de sacarosa en el medio de síntesis está comprendida entre 50 y 600 g.l⁻¹, preferentemente comprendida entre 50 y 400 g.l⁻¹.
9. Procedimiento de síntesis según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, **caracterizado por que** el pH de la reacción está comprendido entre 4 y 7, preferentemente de aproximadamente 5,75.
10. Proceso de síntesis de glucooligosacáridos en el que:
 - se suministra sacarosa y al menos un aceptor glucídico a un medio de síntesis,
 - se pone en contacto una dextranasa tal como se ha definido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un complejo tal como se ha definido según la reivindicación 4 con dicha sacarosa y dicho al menos un aceptor glucídico en dicho medio de síntesis para formar glucooligosacáridos, y
 - opcionalmente, se aíslan los glucooligosacáridos obtenidos.
11. Procedimiento de síntesis de compuestos glucoconjugados, en el que:
 - se suministra sacarosa y al menos una molécula hidroxilada en un medio de síntesis,

- se pone en contacto una dextran-sacarasa tal como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un complejo tal como se ha definido según la reivindicación 4 con dicha sacarosa y dicha al menos una molécula hidroxilada en dicho medio de síntesis para formar compuestos glucoconjugados, y
- opcionalmente, se aíslan los componentes glucoconjugados obtenidos.

5

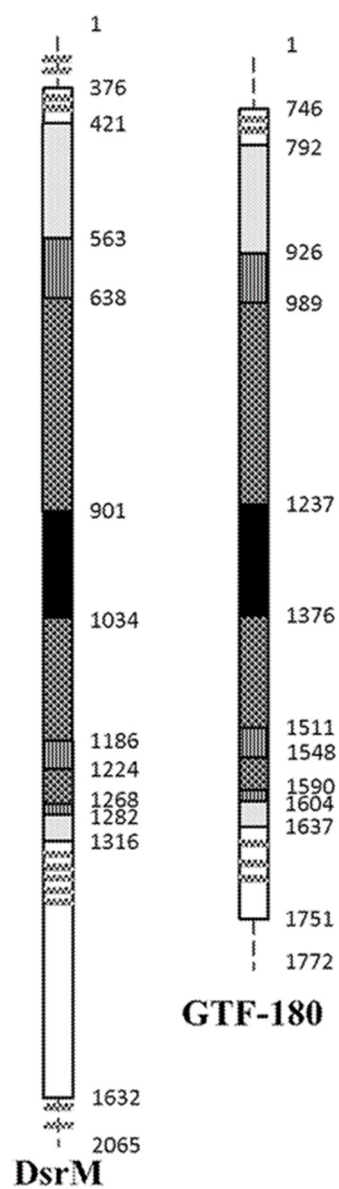


Figura 1

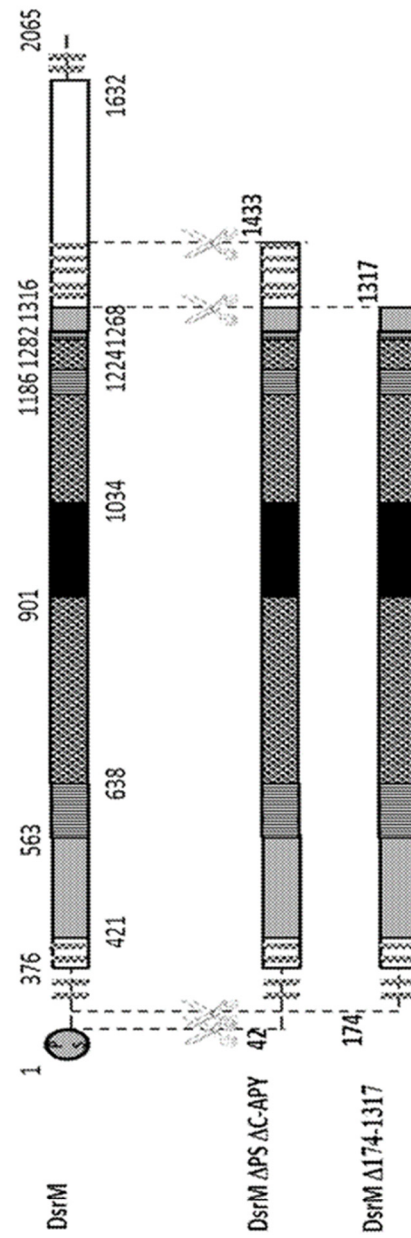


Figura 2

SopORTE	Proveedor	Naturaleza soporte	Grupo funcional	Tipo de enlace
Sprinbeads AA130	Sprin Technologies	Polimetacrilato de alta porosidad	Grupo amino – (separador corto)	Enlaces iónicos
Sprinbeads AO110	Sprin Technologies	Polimetacrilato poliestireno – divinilbenceno	Grupo octadecilo	Enlaces hidrófobos
Sprinbeads SN110	Sprin Technologies		--	Enlaces hidrófobos
Sepabeads ECQ1A	Resindion	Polimetacrilato	Grupo amonio cuaternario -NR ³⁺	Enlaces iónicos
Purolite ECR1604	Purolite	Estireno	Grupo amonio cuaternario -NR ³⁺	Enlaces iónicos
Purolite ECR8214	Purolite	Epoxi metacrilato	Grupo epoxi-	Enlaces covalentes
Purolite ECR4204	Purolite	Epoxi metacrílico/Estireno	Grupo epoxi-	Enlaces covalentes

Figura 3

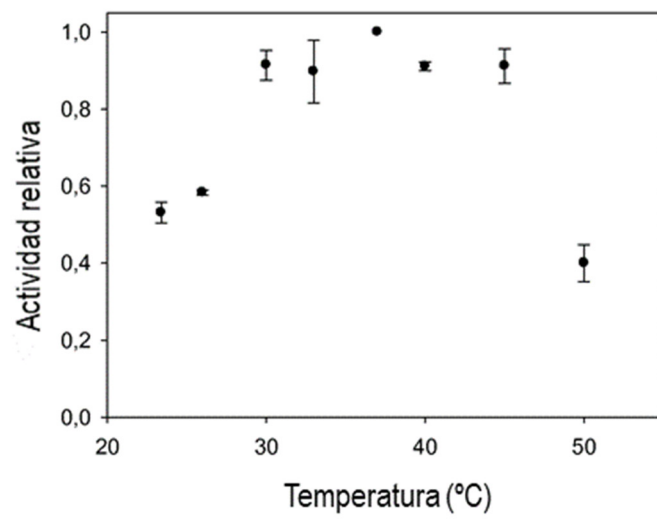


Figura 4

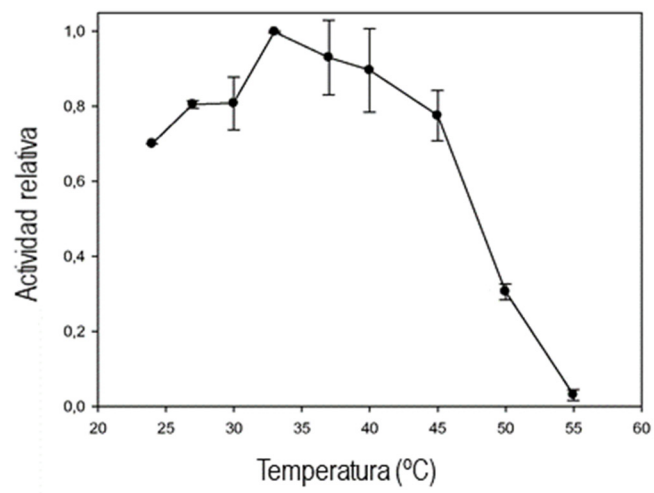


Figura 5

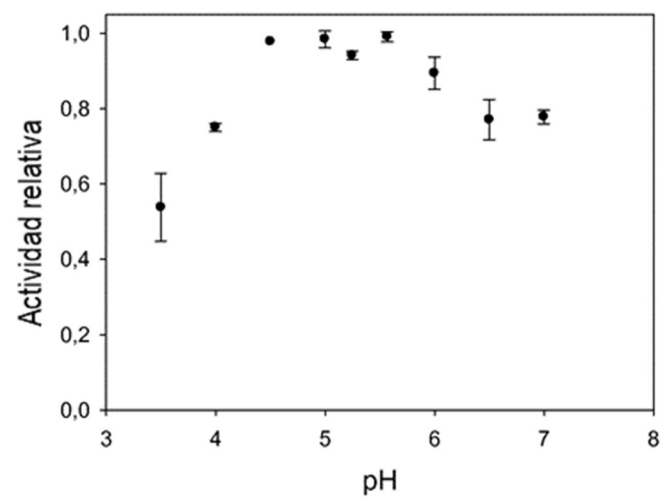


Figura 6

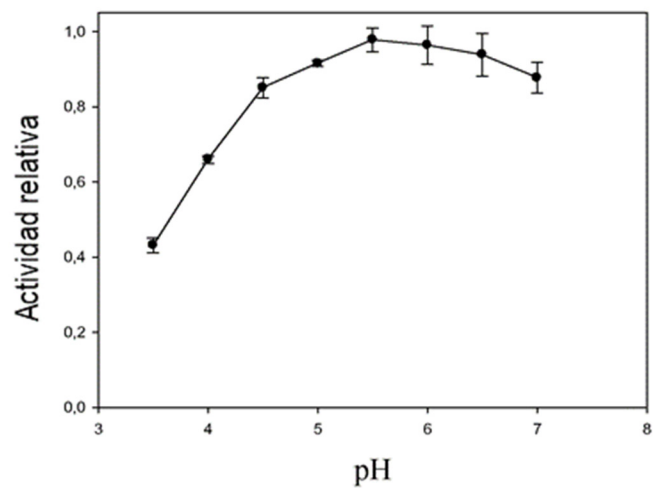


Figura 7

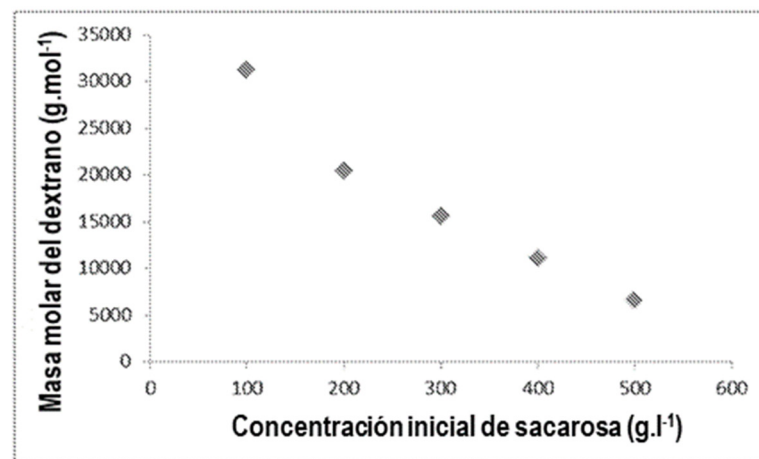


Figura 8

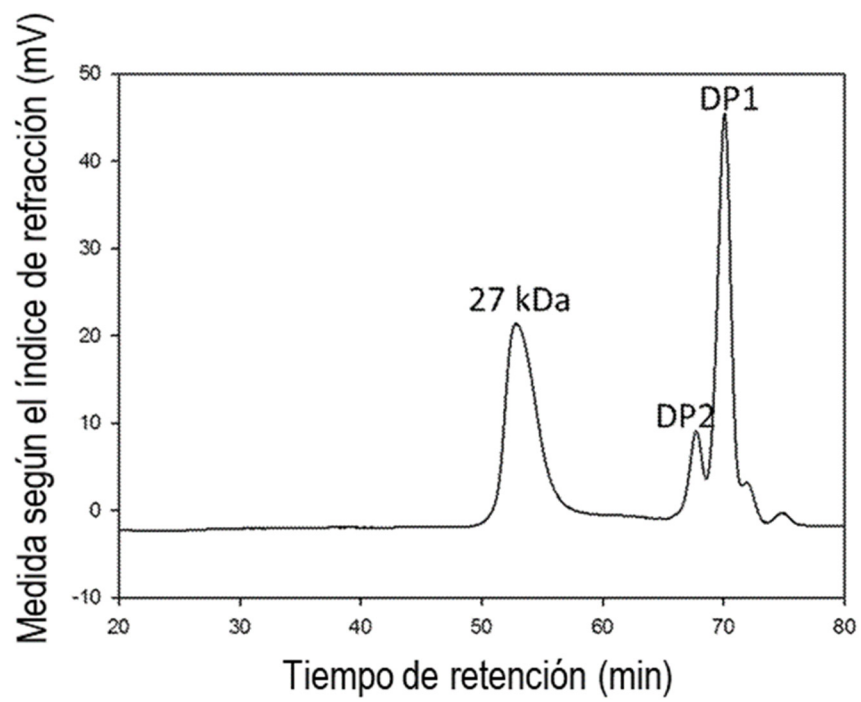


Figura 9

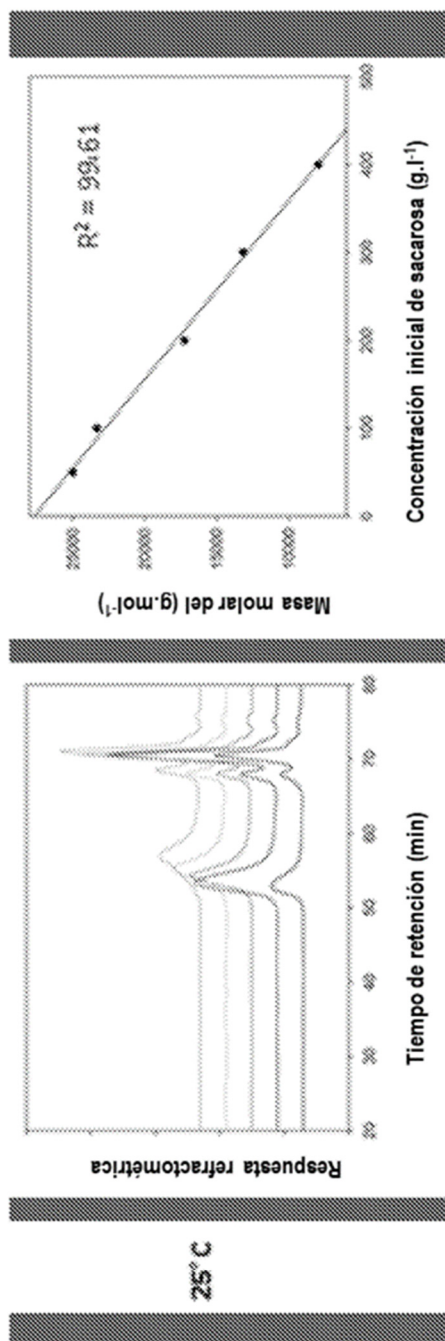


Figura 10A

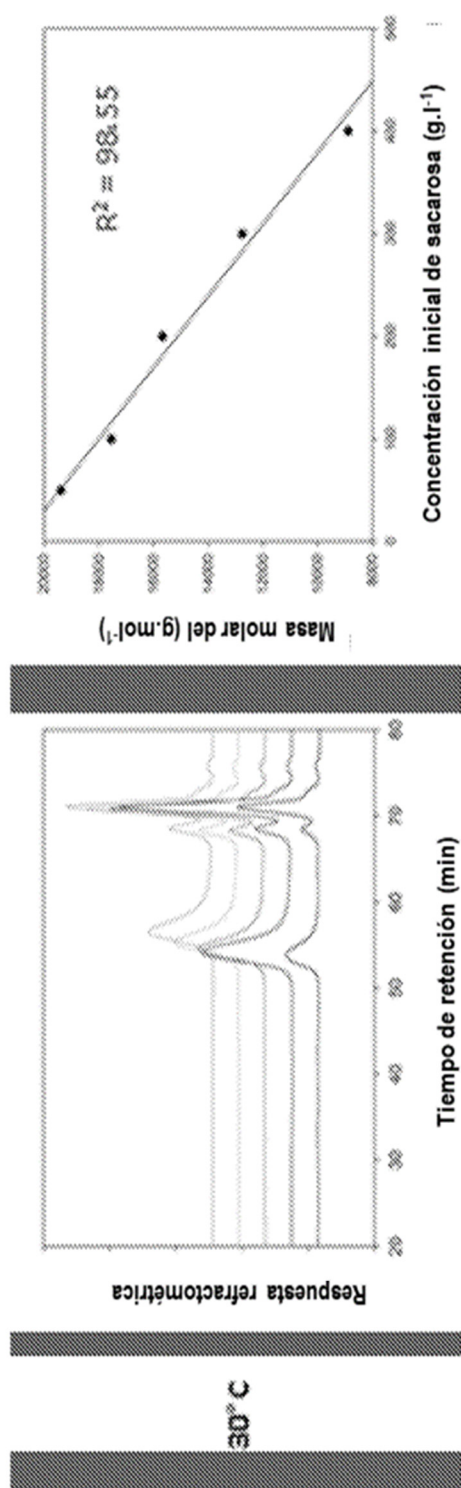


Figura 10B

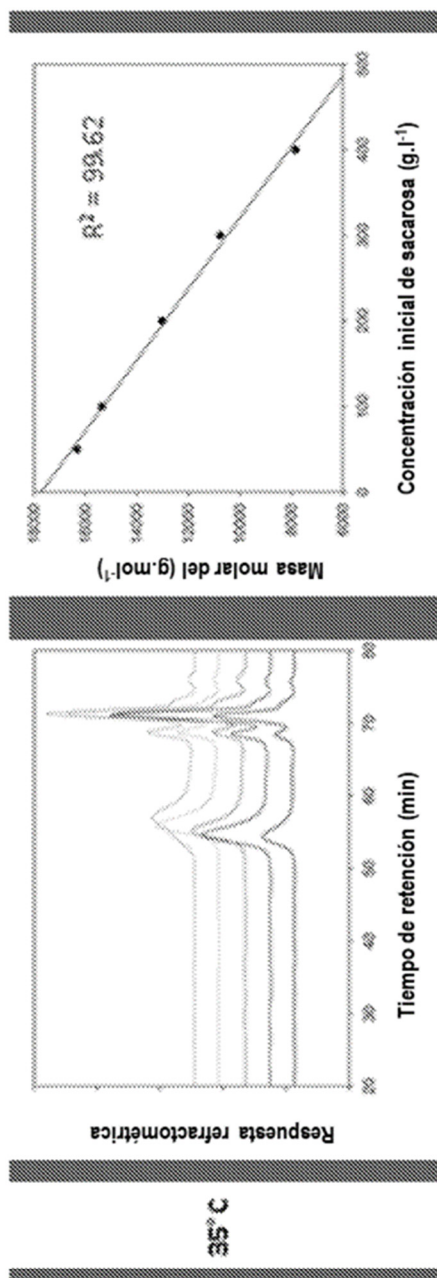


Figura 10C

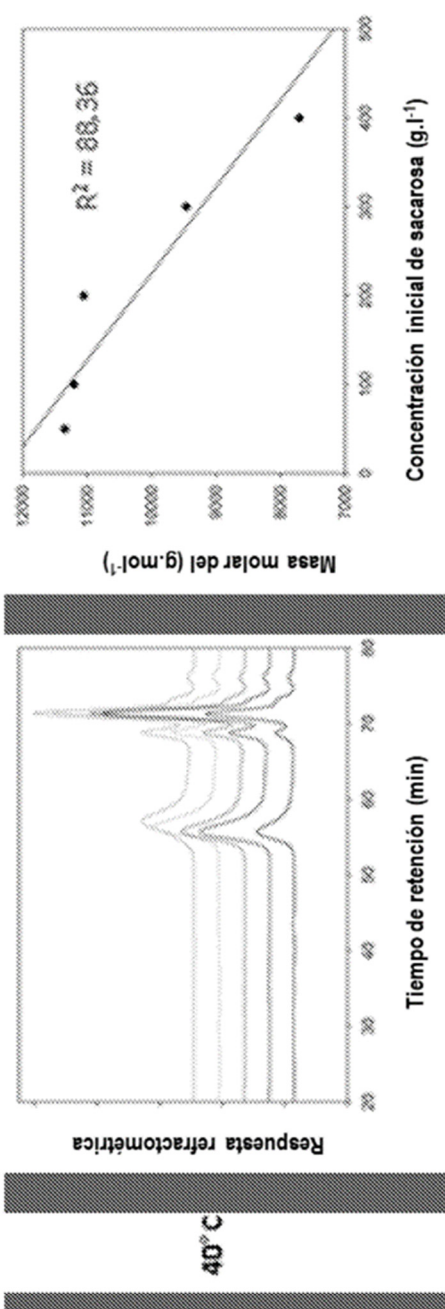


Figura 10D

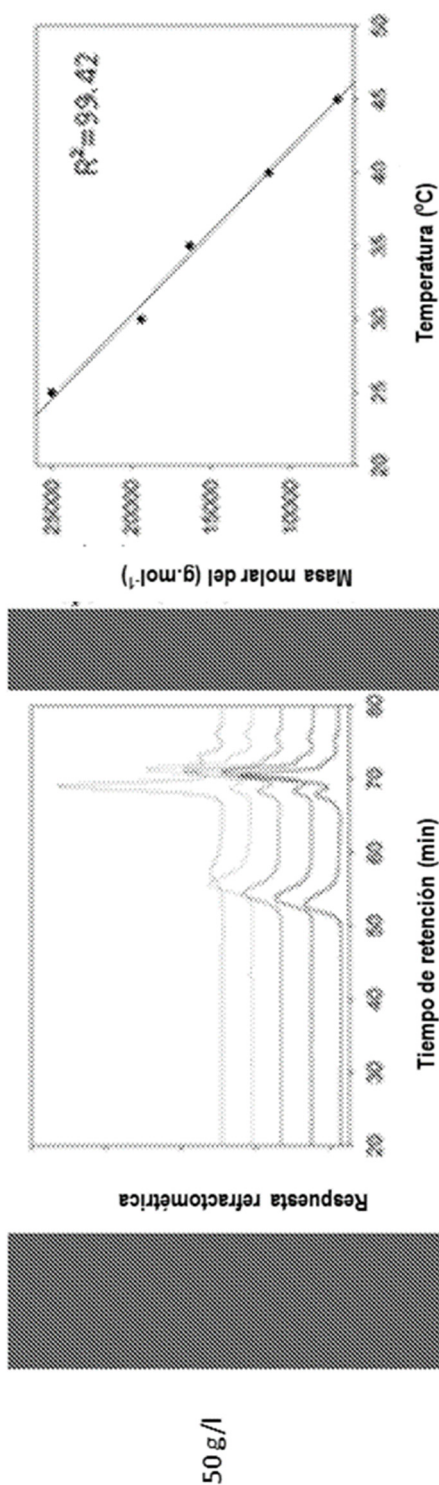


Figura 11A

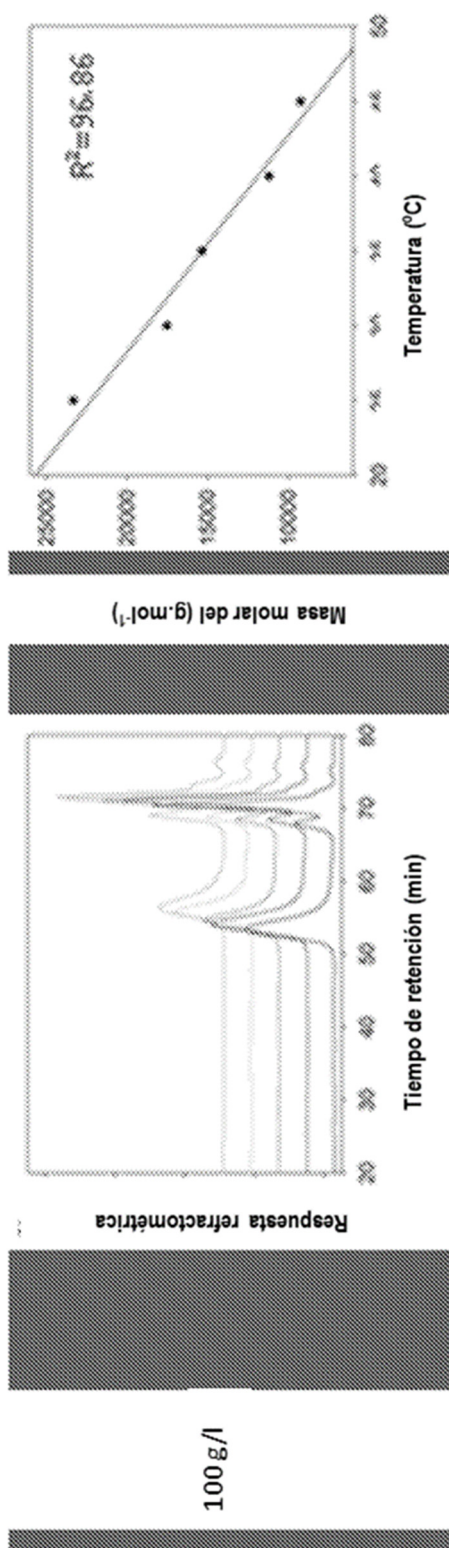


Figura 11 B

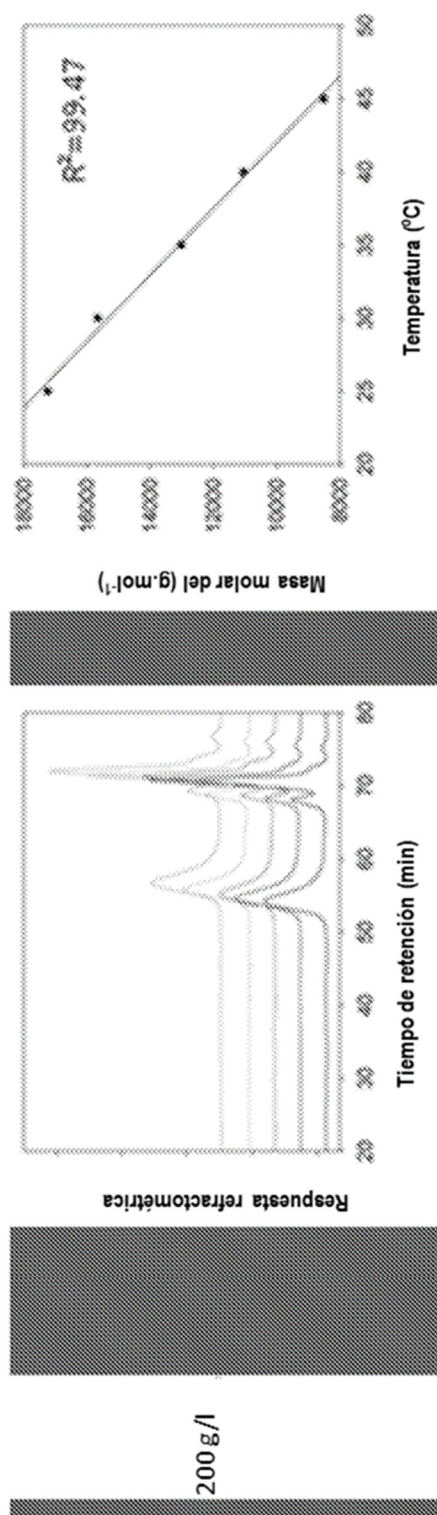


Figura 11C

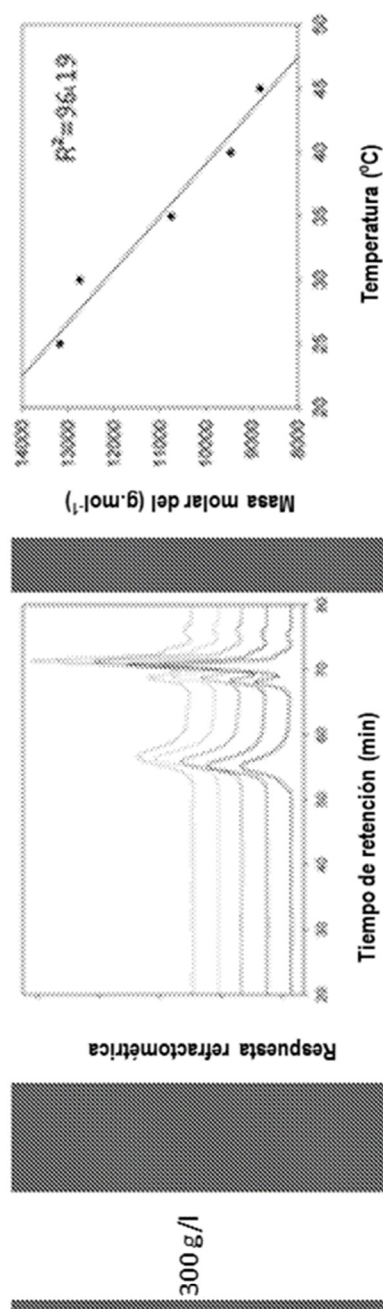


Figura 11D

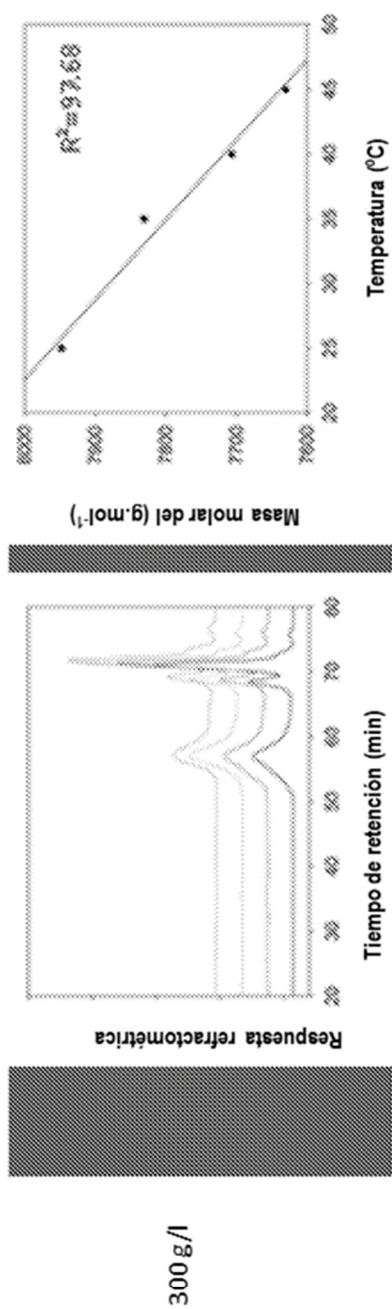


Figura 11E

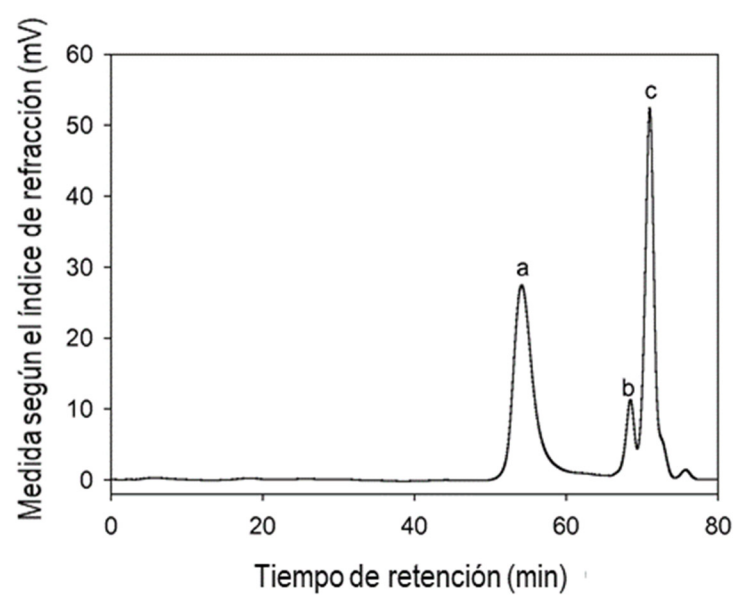


Figura 12

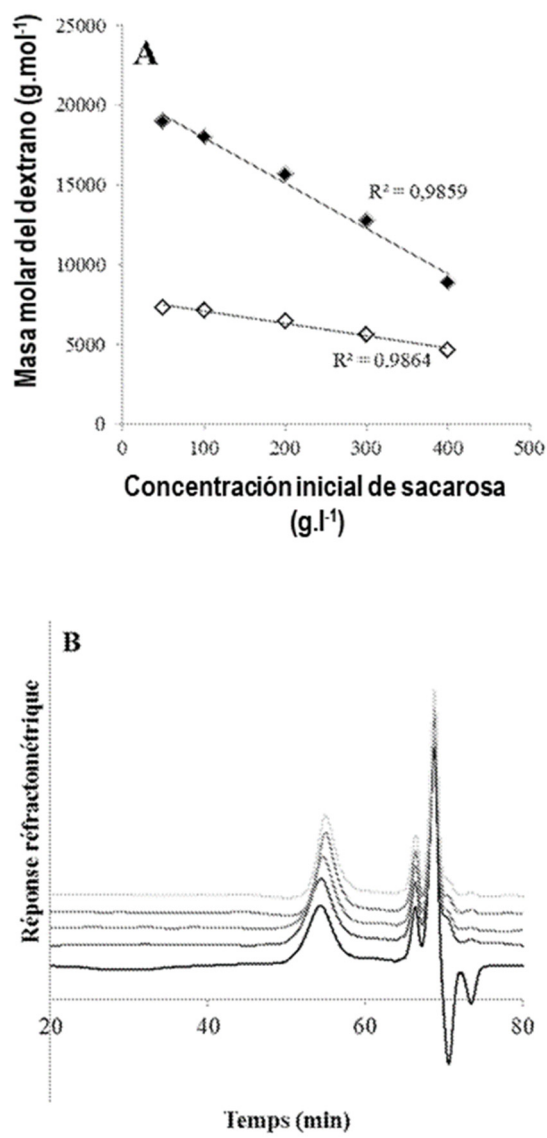


Figura 13

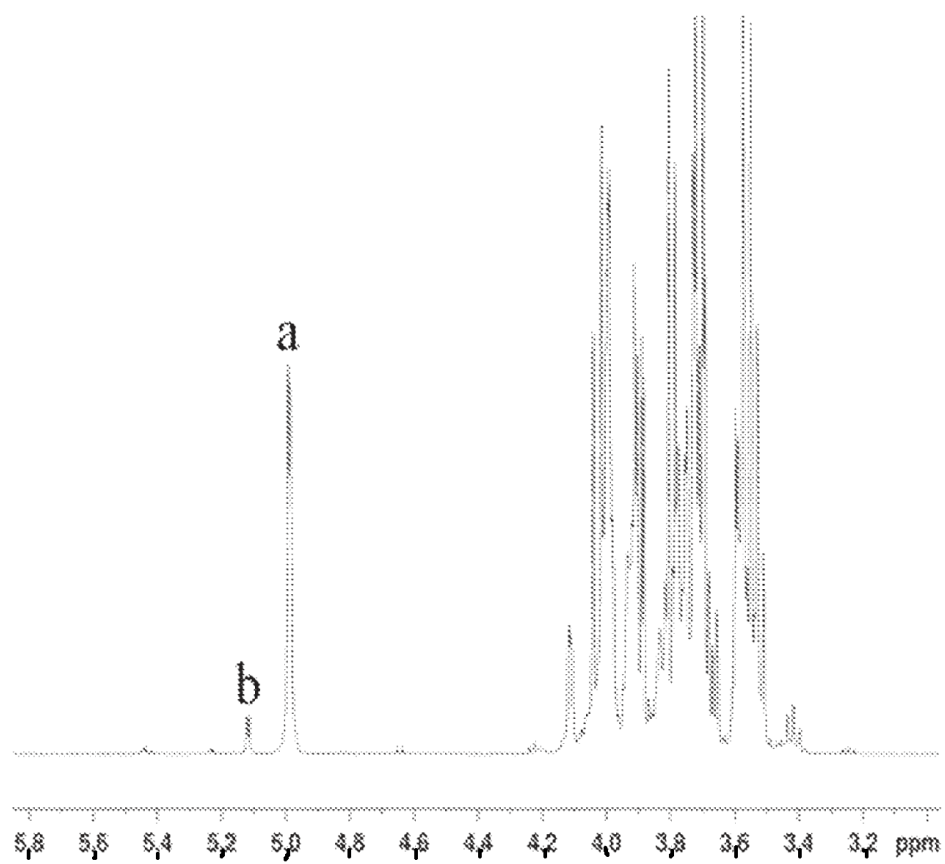


Figura 14

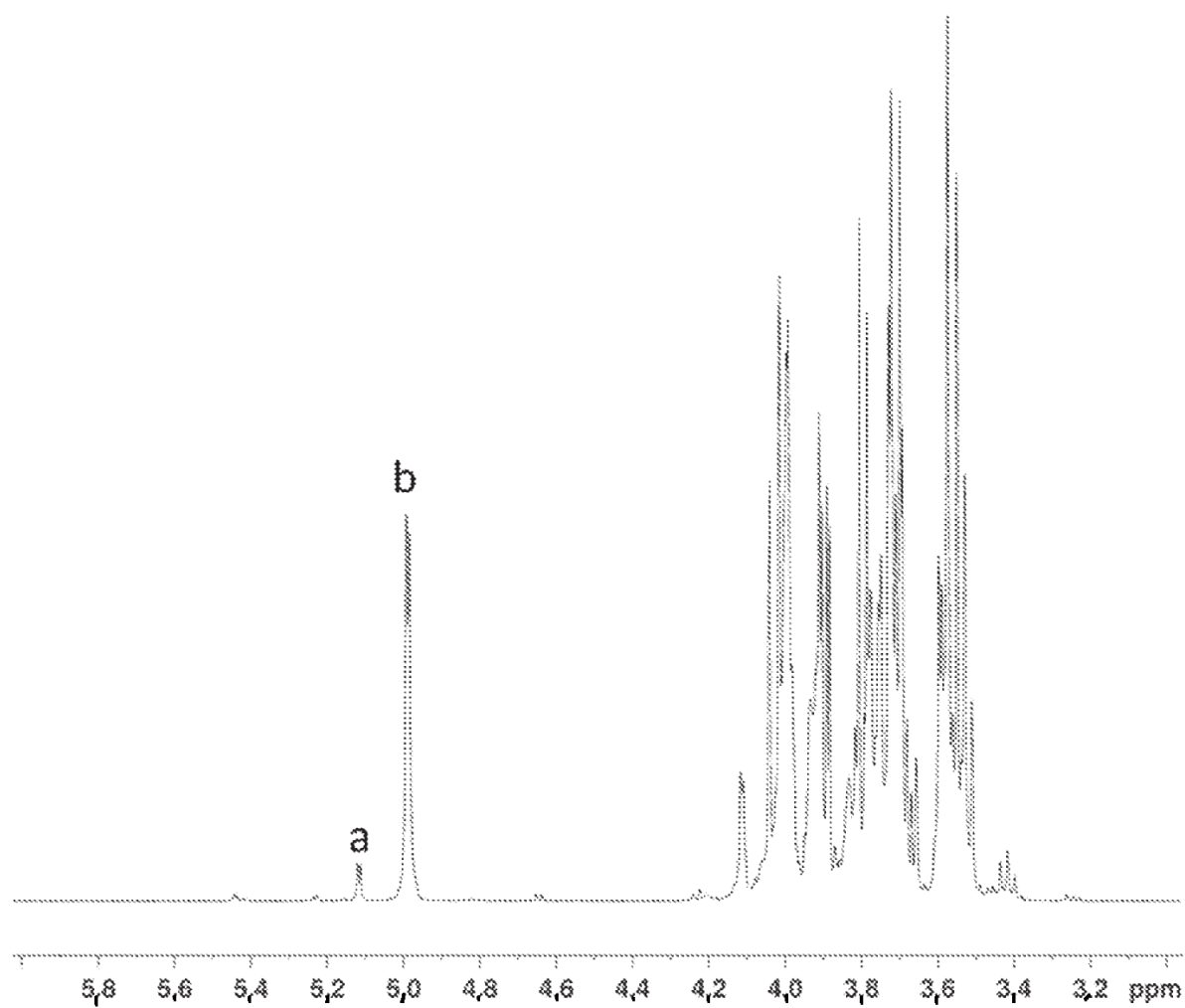


Figura 15