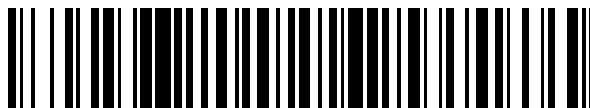


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 264**

21 Número de solicitud: 201330831

51 Int. Cl.:

C12N 9/00

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

05.06.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

08.01.2015

Fecha de la concesión:

25.11.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

02.12.2015

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2014/070464

Fecha de publicación de la mención al informe de
búsqueda internacional:

13.01.2015

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS (CSIC) (70.0%)**

Serrano nº 117

28006 MADRID (Madrid) ES y

UNIVERSITAT DE VALENCIA (30.0%)

72 Inventor/es:

NACHER VAZQUEZ, Montserrat;

LOPEZ GARCIA, Paloma;

PRIETO ORZANO, Alicia;

PEREZ PRIETO, Sara Isabel;

RODRIGUEZ SAINT-JEAN, Sylvia;

MOHEDANO BONILLA, Maria De La Luz y

AZNAR NOVELLA, Rosa

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS CODIFICANTE DE UNA ENZIMA CON ACTIVIDAD
DEXTRANSACARASA, CÉLULAS QUE LA EXPRESAN Y SU USO PARA LA OBTENCIÓN DE
EXOPOLISACÁRIDOS CON ACTIVIDAD ANTIVIRAL Y COMPOSICIONES QUE LOS
CONTIENEN**

57 Resumen:

Secuencia de nucleótidos codificante de una enzima con actividad dextran sacarasa, células que la expresan y su uso para la obtención de exopolisacáridos con actividad antiviral y composiciones que los contienen.

La presente invención trata de una nueva secuencia de nucleótidos que codifica para una enzima con actividad dextran sacarasa aislada a partir de una cepa bacteriana de *Lactobacillus sakei*, más concretamente de fiambre de magro de cerdo, que presenta capacidad para producir un exopolisacárido. La invención se refiere también al procedimiento de obtención y purificación de dicho exopolisacárido así como al uso del exopolisacárido como agente antiviral en el tratamiento de especies piscícolas, principalmente salmónidos. La invención también protege composiciones farmacéuticas veterinarias o alimentarias que contienen dicho exopolisacárido.

ES 2 526 264 B1

DESCRIPCIÓN

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS CODIFICANTE DE UNA ENZIMA CON ACTIVIDAD DEXTRANSACARASA, CÉLULAS QUE LA EXPRESAN Y SU USO PARA LA
5 OBTENCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS CON ACTIVIDAD ACTIVIRAL Y COMPOSICIONES QUE LOS CONTIENEN

SECTOR Y OBJETO DE LA INVENCION

10 La presente invención se circunscribe dentro del sector de la biotecnología y se refiere a una nueva cepa bacteriana y a una secuencia de nucleótidos codificante de una enzima con actividad dextranasa, con capacidad para producir un exopolisacárido con actividad antivírica y a un procedimiento para producir dicha enzima y dicho compuesto. Esta invención se refiere, además, a composiciones alimentarias o farmacéuticas veterinarias que
15 contienen el exopolisacárido y que son de aplicación en el sector de la acuicultura para combatir enfermedades infecciosas virales, principalmente en salmónidos.

ESTADO DE LA TECNICA

20 Las bacterias ácido lácticas son microorganismos considerados GRAS (*Generally Recognized as Safe*) y algunas de estas bacterias son capaces de sintetizar polisacáridos extracelulares (EPS) tanto heteropolisacáridos como homopolisacáridos. Las propiedades de dichos EPS están determinadas por: (i) el tipo de enlace y unidades de monosacáridos que lo formen, (ii) su grado y tipo de ramificación, y (iii) tanto su masa molecular como su
25 conformación.

Los α -glucanos son homopolisacáridos y se clasifican en función del tipo de enlace α -glicosídico que une las diferentes moléculas de glucosa. Los dextranos, presentan principalmente uniones α -(1→6) (Robyt y Walseth (1979) Carbohydr. Res. 68:95–111). Los reuteranos poseen uniones α -(1→4) (Kralj, van Geel-Schutten, Dondorff, Kirsanovs, van der Maarel y Dijkhuizen (2004) Microbiology 150: 3681–3690). Los mutanos, contienen uniones α -(1→3) (Shiroza, Ueda, y Kuramitsu (1987) J. Bacteriol. 169:4263–4270) y los alternanos, como su nombre indica, alternan uniones α -(1→3) y uniones α -(1→6) (Arguello-Morales, Remaud-Simeon, Pizzut, Sarçabal, Willemot y Monsan (2000) FEMS Microbiol. Lett. 182:81–
35 85). Las especies bacterianas capaces de sintetizarlos son bacterias lácticas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Weissella* (Amari, Gomez Arango,

Gabriel, Robert, Morel, Moulis, Gabriel, Remaun-Siméon y Fontagné-Faucher (2012) Appl. Microbiol. Biotechnol. DOI 10.1007/s00253-012-4447-8) (Rühmkorf, Bork, Mischnick, Rübsam, Becker y Vogel (2013) Food Microbiol. 34 (2013) 52-61).

5 Los α -glucanos son sintetizados por glucansacararasas también conocidas como glucosiltransferasas. Estas enzimas pertenecen a la familia de las glicosil-hidrolasas (GH70) con cuatro tipos de dominios estructurales en base a su secuencia de aminoácidos: (i) un péptido señal en su extremo amino terminal, (ii) una región variable, (iii) un dominio catalítico y (d) una región carboxilo terminal (van Hijum, Kralj, Ozimek, Dijkhuizen y van Geel-Schutten
10 (2006) Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70:157–176).

Las dextranacararasas (EC 2.4.1.5) son enzimas secretadas al medio o que permanecen unidas a la superficie de la célula. Estas enzimas sintetizan dextrano utilizando como sustrato sacarosa y catalizando la siguiente reacción química: sacarosa+(1,6- α -D-glucosil)_n→D-fructosa+(1,6- α -D-glucosil)_{n+1}. Los dextranos presentan diferentes tipos de ramificaciones: α -(1→3); α -(1→2) o α -(1→4) y presentan un elevado peso molecular (superior a 10⁶ Da). En presencia de aceptores eficientes, como la maltosa, la reacción se desplaza hacia la síntesis de oligosacáridos de interés como prebióticos (Ruiz-Matute, Brokl, Sanz, Soria, Côté, Collins y Rastal (2011) J. Agric. Food Chem., 59:3693-3700). Las
15 dextranacararasas de las especies de *Streptococcus* en general se producen de forma constitutiva, mientras que las de las especies de *Leuconostoc* son inducidas por sacarosa, aunque se han conseguido mutantes constitutivos.

El dextrano sintetizado por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F fue uno de los
25 primeros biopolímeros producidos a escala industrial con varias aplicaciones en biotecnología y medicina. El dextrano se lleva empleando hace mucho tiempo como espesante, como sustituto de plasma sanguíneo y como matriz en columnas de Sephadex® (Naessens, Cerdobbel, Soetaert y Vandamme (2005) J. Chem. Technol. Biotechnol. 80:845–860). En la actualidad, el número de bacterias productoras de dextrano ha ido en aumento
30 junto a nuevas aplicaciones del mismo como prebiótico, agente bioactivo y/o agente anticorrosión, en cosmética y en productos horneados (US0059633; US6399119; US8263380; US0165290).

Ciertos tipos de dextrano, como el dextrano sulfatado, también se han empleado para
35 combatir ciertos virus como son el del dengue (Alen y Schols (2012) J. Tropical Medicine

doi:10.1155/2012/628475) ó el virus de la influenza (Yamada, Moriishi, Haredy, Takenaka, Mori, Yamanishi y Okamoto (2012) Antiviral Res. 96:344–352).

Por otra parte, actualmente en acuicultura las enfermedades infecciosas de origen vírico provocan grandes pérdidas económicas. Entre los virus de salmónidos más relevantes se encuentran, el virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) y el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI) que son capaces de inducir persistencia, y en animales supervivientes a la infección se produce un estado de portador asintomático, que implica mayor dificultad para la erradicación del virus. Además, el VNPI se está aislando últimamente en el medio marino en especies de alto valor comercial, como el salmón del Atlántico, al que causa altas mortalidades. El impacto económico es aún mayor si además se producen coinfecciones con otro virus, como por ejemplo el de la anemia infecciosa del salmón (VAIS), un orthomixovirus emergente en países productores.

Aunque existen vacunas de ácido desoxirribonucleico (ADN) probadas a nivel de laboratorio que han mostrado ser eficaces (de las Heras, Rodríguez Saint-Jean y Pérez-Prieto (2010) Fish Shellfish Immunol. 27:120-129), en la actualidad sólo se está utilizando en piscifactorías una vacuna de ADN en Canadá contra el VNHI (Salonius, Simard, Harland y Ulmer (2007) Curr. Opin. Invest. Drugs 8:635–641).

En base a lo anterior, la invención que aquí se presenta tiene gran interés dentro de la búsqueda de estrategias para combatir las infecciones víricas, como son las vacunas y los suplementos dietéticos incluyendo prebióticos, que ayuden a mejorar la resistencia contra las enfermedades infecciosas en acuicultura.

EXPLICACION DE LA INVENCION

Breve descripción de la invención

Un objeto de la invención lo constituye una secuencia de nucleótidos, en adelante secuencia de nucleótidos de la invención, caracterizada por que se corresponde con la secuencia SEQ ID NO: 4.

Una realización particular de la invención la constituye una secuencia de nucleótidos caracterizada por que presenta una identidad del 80% con la secuencia de nucleótidos SEQ

ID NO: 4 y por que codifica una enzima dextransacarasa útil para la obtención de exopolisacáridos.

5 Otro objeto de la invención la constituye un vector de expresión tipo procariota o eucariota, en adelante vector de expresión de la invención, que comprende la SEQ ID NO: 4, o una secuencia de nucleótidos caracterizada por que presenta una identidad del 80% con la SEQ ID NO: 4 y que codifica una enzima dextransacarasa útil para la obtención de exopolisacáridos.

10 Una realización particular de la invención la constituye el vector de expresión de la invención, que comprende la SEQ ID NO: 6.

Otro objeto de la invención lo constituye una enzima con actividad dextransacarasa útil para la obtención de un exopolisacárido, en adelante enzima dextransacarasa de la invención,
15 que está codificada por la secuencia de nucleótidos de la invención, o por una secuencia de nucleótidos caracterizada por que presenta una identidad del 80% con la SEQ ID NO: 4.

Otra realización particular de la invención la constituye la enzima dextransacarasa de la invención constituida por la SEQ ID NO: 5.

20 Otro objeto de la invención lo constituye una célula útil para obtener exopolisacáridos, en adelante célula de la invención, que comprende una secuencia de nucleótidos de la invención, preferentemente la SEQ ID NO: 4, o un vector de expresión de la invención.

25 Otra realización particular de la invención la constituye la célula de la invención que se corresponde con la cepa *Lactobacillus sakei* MN1 con CECT 8329.

Otro objeto de la invención lo constituye el uso de la célula de la invención para la obtención de una enzima con actividad dextransacarasa que comprende la SEQ ID NO: 5.

30 Otro objeto de la invención lo constituye el uso de la célula de la invención en un procedimiento útil para la obtención de un exopolisacárido.

Otro objeto de la invención lo constituye un procedimiento de obtención de un
35 exopolisacárido celular, en adelante procedimiento de obtención de un exopolisacárido

celular de la invención, donde se usa la célula de invención y que comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar una bacteria *L. sakei* en medio de cultivo suplementado con al menos un azúcar, seleccionado de entre sacarosa y maltosa, hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento del exopolisacárido;
- b) eliminar las bacterias por centrifugación y separar el sobrenadante;
- c) añadir un alcohol, preferentemente etanol, o una cetona, preferentemente acetona, para obtener un precipitado del exopolisacárido; y
- d) centrifugar el precipitado del paso (c) para eliminar el sobrenadante, y obtener un exopolisacárido precipitado.

Otro objeto de la invención lo constituye un procedimiento de obtención de un exopolisacárido mediante una enzima dextranasa, en adelante procedimiento de obtención de un exopolisacárido enzimático de la invención, donde se utiliza una enzima de actividad dextranasa de la invención.

Otro objeto de la invención lo constituye un exopolisacárido, en adelante exopolisacárido de la invención, que se obtiene por cualquiera de los procedimientos de obtención un exopolisacárido de la invención.

Otro objeto de la invención lo constituye el uso del exopolisacárido de la invención, en adelante uso del exopolisacárido de la invención, como agente antiviral frente a virus de especies piscícolas, preferentemente salmónidos.

Otro objeto de la invención lo constituye el uso del exopolisacárido de la invención para la elaboración de una composición farmacéutica veterinaria o alimentaria útil para la prevención o tratamiento de infecciones virales de especies piscícolas.

Otro objeto de la invención lo constituye una composición veterinaria o alimentaria útil para la prevención o tratamiento de infecciones virales de especies piscícolas, en adelante composición de la invención, que comprende un exopolisacárido de la invención.

Descripción detallada

La presente invención se basa en la identificación de una nueva enzima con actividad dextranasa, obtenida a partir que una nueva cepa de *Lactobacillus sakei* aislada de

productos cárnicos (ver Ejemplo 1), que puede ser utilizada en un procedimiento para producir un exopolisacárido (ver Ejemplo 4), que sorprendentemente se ha observado que presenta actividad antiviral frente a virus de especies piscícolas (ver Ejemplo 7). La detección de la producción del exopolisacárido por la cepa bacteriana de la invención en placas conteniendo sacarosa indica que el enzima de secuencia SEQ ID NO: 5, que es responsable de la síntesis u obtención de dicho exopolisacárido, es una dextranasa.

Las ventajas técnicas de la invención se describen a continuación:

a) con respecto al procedimiento de obtención y purificación del exopolisacárido:

- resulta económico, sencillo y presenta un alto rendimiento (2 g L^{-1} de cultivo);

b) con respecto al exopolisacárido:

- no presenta toxicidad en líneas celulares de peces,

- posee una elevada solubilidad en agua (superior a 10 mg mL^{-1}),

- posee un alto grado de pureza (superior al 95%),

- posee una elevada masa molecular (superior a $2 \times 10^6 \text{ Da}$);

c) con respecto al uso como antiviral del exopolisacárido:

- presenta un efecto antiviral *in vitro* frente a VNHI significativamente superior al que producen otros dextranos producidos por otras bacterias lácticas y algún dextrano comercial,

- su alta solubilidad permite una fácil administración a través de la incorporación como

aditivos en alimentos funcionales para los peces o como productos veterinarios.

Las técnicas de cultivo en medio sólido permiten el crecimiento de determinadas bacterias. Más concretamente, la utilización de productos cárnicos, medios de cultivo CDM y sacarosa y el uso de microscopia electrónica de transmisión, han permitido el crecimiento de determinadas colonias mucosas bacterianas en dichos medios, la detección de productos derivados de su metabolismo como exopolisacáridos y la identificación de la bacteria de la invención (ver Ejemplo 1 y Figura 1).

Por el término “exopolisacárido” se entiende un polímero compuesto de subunidades mayoritariamente monosacáridicas secretado por un organismo.

Por el término “medio de cultivo” se entiende un alimento sólido o líquido conteniendo los nutrientes requeridos para el crecimiento de la bacteria.

Por el término “sacarosa” se entiende un disacárido $\alpha\text{-D-glucopiranosil-(1-2)-}\beta\text{-D-fructofuranósido}$.

Por el término “dextransacarasa o DsrLS” se entiende un enzima capaz de catalizar la síntesis de un exopolisacárido utilizando sacarosa como sustrato.

5 Como punto de partida de la presente invención, se sitúa en primer lugar una secuencia de nucleótidos, en adelante secuencia de nucleótidos de la invención, caracterizada por que se corresponde con la secuencia SEQ ID NO: 4.

10 La secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 4 del gen *dsrLS* de la cepa *Lactobacillus sakei* MN1 con CECT 8329 es sustancialmente diferente a los genes de otras bacterias incluyendo el gen *gtfKg15* (Kralj, van Geel-Schutten, Dondorff, Kirsanovs, van der Maarel y Dijkhuizen (2004) Microbiology 150:3681-3690) de la cepa productora de dextrano *Lactobacillus sakei* Kg15.

15 Una realización particular la constituye cualquier secuencia de nucleótidos que comprende una identidad del 80% con la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 4 y que codifica una enzima dextransacarasa útil para la obtención de exopolisacáridos.

20 Es de esperar que la identidad global de los genes que codifican una enzima dextransacarasa útil para la obtención de exopolisacáridos, sea igual o mayor de un 50%, y más concretamente al nivel de la secuencia polinucleotídica correspondiente a la SEQ ID NO: 4 sea del 80% o mayor. Además, el grado de identidad o la homología existente entre las secuencias de aminoácidos de la invención y otras secuencias de aminoácidos pueden determinarse por métodos conocidos en estado de la técnica.

25 El término “homología”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la semejanza entre dos estructuras debida a una ascendencia evolutiva común, y más concretamente a la semejanza o identidad entre los nucleótidos de posiciones equivalentes en dos o más polinucleótidos.

30 El término “identidad”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos idénticos entre dos polinucleótidos que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa BLASTP o BLASTN, ClustalW y FASTA. Puesto que dos proteínas se consideran homólogas si tienen el mismo origen evolutivo, en general, se
35 asume que valores superiores de similitud o identidad del 80% indican estructuras

homólogas. Podemos considerar, por tanto, que porcentajes de identidad de, al menos, un 80% mantendrán las mismas propiedades de dicho polipéptido.

Con la información suministrada en la presente invención un experto en la materia es capaz de identificar secuencias de nucleótidos homólogas a las descritas en la presente invención. Por tanto, la secuencia de nucleótidos de la invención, constituye la secuencia codificante de cualquier variante modificada con las características anteriormente descritas, cuya secuencia de nucleótidos se corresponde a:

a) moléculas de ácido nucleico de la secuencia polinucleotídica aislada o en su cadena complementaria,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria es capaz de hibridar con una secuencia polinucleotídica de (a), o

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de (a) y/o (b) debido a la degeneración del código genético.

Otro objeto de la invención la constituye un vector de expresión tipo procariota o eucariota, en adelante vector de expresión de la invención, que comprende la SEQ ID NO: 4, o una secuencia de nucleótidos caracterizada por que presenta una Identidad del 80% con la SEQ ID NO: 4 y que codifica una enzima dextransacarasa útil para la obtención de exopolisacáridos.

Una realización particular de la invención la constituye el vector de expresión de la invención, que comprende la SEQ ID NO: 6.

Una realización particular del vector procariota se refiere al vector de expresión de la invención constituido por el plásmido denominado pMN1, en adelante plásmido de la invención, presente en la cepa bacteriana de la invención (cepa *Lactobacillus sakei* MN1 con CECT 8329) y detectado mediante la técnica de hibridación de Southern. El plásmido es portador del gen *dsrLS* y se caracteriza por poseer una masa molecular de 15 kDa y un replicón caracterizado por comprender la SEQ ID NO: 6 y que incluye los genes *repA* y *repB*. Sus productos génicos RepA y RepB se caracterizan por comprender las secuencias SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, y están implicados en la replicación del plásmido.

El replicón de pMN1 es sustancialmente diferente de otros replicones plasmídicos y pertenece a la familia del plásmido pUCL287 (Benachour, Frère, Flahaut, Novel y Auffray (1997) Mol. Gen. Genet. 255: 504-513).

Por el término “replicón” se entiende la región mínima requerida para la replicación del plásmido e incluye el origen de replicación y los genes que codifican las proteínas RepA y RepB.

- 5 La secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 4 de la invención puede obtenerse a partir de la cepa bacteriana de la invención o de otras cepas bacterianas por procedimientos biotecnológicos de obtención y síntesis de secuencias de nucleótidos ampliamente conocidos en el estado de la técnica, así como secuencias de nucleótidos de elevada homología a la secuencia de nucleótidos de la invención que codifiquen enzimas con
10 actividad dextransacarasa.

El análisis de secuencias de varios nucleótidos de genes codificantes de dextrancarasas bacterianas, permite la detección de una región conservada en la secuencia codificante del centro catalítico de las enzimas que permite el diseño de oligonucleótidos que se utilizan
15 para amplificar fragmentos de ADN y detectar genes *dsr*. Concretamente, el uso de una preparación de ADN genómico o de ADN plasmídico de la cepa bacteriana de la invención permite el diseño de los oligonucleótidos *dsrF* y *dsrR* que pueden ser utilizados para detectar genes *dsr*.

20 En bacterias lácticas – por ejemplo, bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* y preferentemente *Lactobacillus plantarum* MMB2 y *Leuconostoc mesenteroides* RTF10- podrían identificarse estas secuencias mediante un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- i. obtener preparaciones de ADN genómico de la bacteria objeto de estudio;
- 25 ii. generar un amplicón utilizando el oligonucleótido *dsrF* que comprende la secuencia SEQ ID NO: 2 y el oligonucleótido *dsrR* que comprende la secuencia SEQ ID NO: 3 y los ADN obtenidos en (i) mediante la reacción de polimerización en cadena;
- iii. determinar la secuencia de nucleótidos del amplicón;
- iv. fraccionar los ADN obtenidos en (i) en gel de agarosa;
- 30 v. transferir los ADN fraccionados en (iv) a una membrana, y
- vi. realizar una hibridación de Southern utilizando los amplicones generados en (ii).

Otro objeto de la invención lo constituye una enzima con actividad dextransacarasa útil para la obtención de un exopolisacárido, en adelante enzima dextransacarasa de la invención,
35 que está codificada por la secuencia de nucleótidos de la invención, o por una secuencia de nucleótidos caracterizada por que presenta una identidad del 80% con la SEQ ID NO: 4.

Otra realización particular de la invención la constituye la enzima dextransacarasa de la invención constituida por la SEQ ID NO: 5.

5 Otro objeto de la invención lo constituye una célula útil para obtener exopolisacáridos, en adelante célula de la invención, que comprende una secuencia de nucleótidos de la invención, preferentemente la SEQ ID NO: 4, o un vector de expresión de la invención.

Otro objeto particular lo constituye la célula de la invención que se corresponde con una cepa *Lactobacillus sakei* con capacidad para producir un exopolisacárido, preferentemente
10 una cepa bacteriana *Lactobacillus sakei* que se aísla de fiambre de magro de cerdo.

Otra realización particular de la invención lo constituye la célula de la invención que se corresponde con la cepa *Lactobacillus sakei* MN1 con CECT 8329. Esta cepa bacteriana *Lactobacillus sakei* MN1 ha sido depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo
15 (CECT 8329) siguiendo el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en materia de Patentes, en fecha 22 de abril de 2013.

Estas células son útiles herramientas biotecnológicas para la producción del vector de
20 expresión de la invención así como de la proteína de SEQ ID NO: 5 de la invención.

Otro objeto de la invención lo constituye el uso de la célula de la invención para la obtención de una enzima con actividad dextransacarasa que comprende la SEQ ID NO: 5.

25 Otro objeto de la invención lo constituye el uso de la célula de la invención en un procedimiento útil para la obtención de un exopolisacárido.

Otro objeto de la invención lo constituye un procedimiento de obtención de un exopolisacárido celular, en adelante procedimiento de obtención de un exopolisacárido
30 celular de la invención, donde se usa la célula de invención y que comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar una bacteria *L. sakei* en medio de cultivo suplementado con al menos un azúcar, seleccionado de entre sacarosa y maltosa, hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento del exopolisacárido;
- 35 b) eliminar las bacterias por centrifugación y separar el sobrenadante;

c) añadir un alcohol, preferentemente etanol, o una cetona, preferentemente acetona, para obtener un precipitado del exopolisacárido; y

d) centrifugar el precipitado del paso (c) para eliminar el sobrenadante, y obtener un exopolisacárido precipitado.

5

Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de obtención de un exopolisacárido de la invención celular que incluye una fase de purificación posterior a la etapa (d) y que comprende las siguientes etapas:

i. resuspender el exopolisacárido precipitado según la etapa (d) en agua ultrapura;

10 ii. someter al exopolisacárido a una diálisis utilizando membranas de 12-13 kDa, con cambios de agua; y

iii. congelar a una temperatura entre -60 y -80 °C y liofilizar.

Otra realización particular de la invención la constituye el procedimiento de obtención de un
15 exopolisacárido de la invención celular donde la cepa *L. sakei* de la etapa (a) es la cepa *Lactobacillus sakei* MN1 con CECT 8329.

Por el término “alcohol” se entiende una molécula que contiene un grupo hidroxilo unido a un radical alifático o a alguno de sus derivados.

20

Por el término “cetona” se entiende una molécula caracterizada por poseer un grupo funcional carbonilo unido a dos átomos de carbono.

Para el experto en la materia resultará obvio que el uso de la célula de la invención en el
25 procedimiento de síntesis u obtención de la invención o de la enzima dextranasa de la invención, con las modificaciones pertinentes, permitirá de igual manera la obtención de un exopolisacárido.

Para la obtención del dextrano (exopolisacárido), resulta necesaria la presencia de sacarosa
30 (ver Figura 1A, derecha) en el medio de cultivo, ya que en ausencia de dicho azúcar las bacterias muestran un fenotipo no mucoso (ver Figura 1A, izquierda).

En una realización preferida del procedimiento de obtención de exopolisacárido celular de la invención, se utiliza sacarosa como azúcar en la etapa (a), se añade etanol en la etapa (b) y se obtiene un exopolisacárido que es un dextrano (la eficiencia es buena, en cantidades
35 superiores a 2 g L⁻¹, y tras el proceso de purificación descrito se obtiene una cantidad de 0,7 g L⁻¹).

Por el término “dextrano” se entiende un homopolisacárido formado por moléculas de glucosa unidas mediante enlaces α -(1,6) en su cadena principal y con un bajo porcentaje de ramificación α -(1,2), α -(1,3) ó α -(1,4). Ejemplo de un dextrano, aunque sin limitarse, es aquel que comprende cadenas prácticamente lineales de α -(1,6)-glucopiranososa (90%) con ramificaciones α -(1,3) (10%) y una masa molecular superior a 2×10^6 Da, y que presenta una gran diferencia de tamaño con otros productos de similar naturaleza como el dextrano comercial T2000 y el dextrano de *Lactobacillus sakei* MN1.

La caracterización del exopolisacárido obtenido a través del procedimiento de obtención de un exopolisacárido celular de la invención, presenta un espectro de infrarrojos en el que se observan dos bandas de absorción más intensa, una a 849 cm^{-1} y otra a 916 cm^{-1} , ambas características de α -anómeros, así como una composición exclusivamente compuesta por moléculas de glucosa. Adicionalmente, genera derivados parcialmente metilados y acetilados de un (1 \rightarrow 6)-glucano con aproximadamente 10% de sustituciones en la posición O-3 con cadenas laterales compuestas por un residuo único de glucosa.

Otro objeto de la invención lo constituye un procedimiento de obtención de un exopolisacárido mediante una enzima dextranasa, en adelante procedimiento de obtención de un exopolisacárido enzimático de la invención, donde se utiliza una enzima de actividad dextranasa de la invención.

Otro objeto de la invención lo constituye el exopolisacárido, en adelante exopolisacárido de la invención, obtenido a través del procedimiento de obtención de la invención, ya sea celular o enzimático, donde preferentemente el exopolisacárido es un dextrano.

El exopolisacárido de la invención consigue un 50% de inhibición, frente a una dosis infectiva viral 50% ($\text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$) de 1000, con un tiempo de infección de 3 días a 15°C con VNPI, utilizando una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Estos resultados contrastan con los obtenidos con otros exopolisacáridos, ensayados en paralelo, como el dextrano comercial T2000 o el dextrano MMB2, que necesitan el triple y el doble de concentración, respectivamente, para obtener resultados iguales (Tabla 1).

Además, el exopolisacárido de la invención consigue un 50% de inhibición, frente a una dosis infectiva viral 50% ($\text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$) de 1000, con un tiempo de infección de 7 días a 20°C con VNHI, utilizando una concentración de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Estos resultados contrastan con los

obtenidos por otros dextranos como el comercial T2000 o el MMB2 que necesitan entre 1,5 y 10 veces más concentración, respectivamente, para obtener resultados iguales (Tabla 2).

Así, otro objeto de la invención lo constituye el uso del exopolisacárido de la invención, en
5 adelante uso del exopolisacárido de la invención, como agente antiviral frente a virus de especies piscícolas, preferentemente salmónidos.

Ejemplos de especies piscícolas con aprovechamiento comercial, sobre las que puede ser de aplicación el exopolisacárido de la invención, son aunque sin limitarse, *Salmo trutta*,
10 *Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus aguabonita*, *Oncorhynchus clarkii henshawi*, *Oncorhynchus clarkii clarkii*, *Salmo salar*, *Psetta maxima*, *Argyrosomus regius*, *Sciaena umbra*, *Dicentrarchus labrax*, *Dicentrarchus punctatus* o *Sparus aurata*.

Por el término “agente antiviral” se entiende el compuesto o sustancia capaz de inhibir el
15 ciclo de replicación viral.

Otro objeto particular de la invención lo constituye el uso del exopolisacárido de la invención donde el virus pertenece a los géneros Birnavirus o Rhabdovirus, y preferentemente es el virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) o el virus de la necrosis hematopoyética
20 infecciosa (VNHI).

Otro objeto de la invención lo constituye el uso del exopolisacárido de la invención para la elaboración de una composición farmacéutica veterinaria o alimentaria útil para la prevención o tratamiento de infecciones virales de especies piscícolas.

25 Otro objeto de la invención lo constituye una composición farmacéutica veterinaria o alimentaria útil para la prevención o tratamiento de infecciones virales de especies piscícolas, en adelante composición de la invención, que comprende un exopolisacárido de la invención.

30 Otro objeto particular de la invención lo constituye la composición de la invención donde el virus pertenece a los géneros Birnavirus o Rhabdovirus, y preferentemente es el virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) o el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI).

35

El exopolisacárido de la invención puede utilizarse como un aditivo alimentario de los alimentos o piensos que se utilizan para la alimentación de los peces en piscifactorías, principalmente salmónidos, o elaborarse como composiciones farmacéuticas veterinarias para su administración para prevenir o tratar infecciones virales.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1.- Identificación de una bacteria productora de exopolisacáridos. (A) Fotografía de las colonias de la cepa bacteriana de la invención, en adelante *L. sakei* MN1, crecidas en placas de medio definido CDM suplementadas con 0,8% glucosa (izquierda) o con 0,8% sacarosa (derecha) condición óptima para la producción de exopolisacárido. **(B)** Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión de las bacterias contenidas en las colonias mostradas en (A). Se muestran secciones ultrafinas de las bacterias teñidas con rojo de rutenio.

Figura 2.- Detección de genes codificantes de dextransacarasas en bacterias lácticas mediante hibridación de Southern. Preparaciones de ADN plasmídico de *Leuconostoc mesenteroides* RTF10 (RTF10), *Lactobacillus plantarum* MMB2 (MMB2), *Lactobacillus sakei* MN1 (MN1) y de *Escherichia coli* V517 (C, estirpe utilizada como estándar de peso molecular, porque contiene varios plásmidos) teñidas con bromuro de etidio **(A)** o hibridadas con un fragmento de ADN de 696 pb, producto de amplificación del gen *dsrLS* con los oligonucleótidos *dsrR* y *dsrF* **(B)**. Se indica la migración electroforética, expresada en kilo pares de bases (kb), de los plásmidos presentes en la estirpe control *Escherichia coli* V517 y de los plásmidos de las bacterias lácticas detectados por hibridación y portadores de los genes codificantes de las enzimas productoras de dextrano.

25

Figura 3.- Análisis de la producción de exopolisacárido por *L. sakei* MN1 durante su crecimiento en medio CDM. Se muestra el crecimiento detectado espectrofotométricamente ($DO_{600\text{ nm}}$, ●) y los niveles de exopolisacárido (barras grises).

Figura 4.- Caracterización fisicoquímica del dextrano producido por *L. sakei* MN1. (A) Espectro de infrarrojos. **(B)** Tipo de enlaces deducidos por análisis de metilación. **(C)** Estructura del dextrano.

Figura 5.- Análisis por resonancia magnética nuclear del dextrano producido por *L. sakei* MN1. (A) Se muestra una comparación de los espectros 2D-DOSY del dextrano producido por MN1 (MN1) y del dextrano comercial T2000 (T2000). El alineamiento se

35

realizó superponiendo los espectros y utilizando como referencia el agua deuterada (D_2O) presente en las muestras. **(B)** Superposición de las proyecciones mostradas en (A) de las señales en la dimensión de difusión. Se indican los coeficientes de dispersión de MN1, T2000 y D_2O .

5

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos o pasos. Para el experto en la materia, otros aspectos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

10

MODO DE REALIZACION DE LA INVENCION

Los siguientes ejemplos se incluyen con fines ilustrativos y no limitativos.

15 EJEMPLO 1: Identificación y caracterización de la bacteria productora de exopolisacárido aislada de fiambre magro de cerdo denominada *L. sakei* MN1.

1.1. Identificación

20 Para la identificación de bacterias productoras de exopolisacárido aisladas de productos cárnicos se utilizó la técnica de cultivo en medio sólido. Se realizó la siembra en placas de Petri conteniendo medio de cultivo CDM (Sánchez et al. (2008) Appl. Environ. Microbiol. 74:1136-1144) y agar al 1,5%, en el cual dichas bacterias generan colonias con aspecto mucoso. Los resultados indicaron que para que dicha detección tuviese lugar, fue necesaria
25 la presencia de sacarosa (ver Figura 1A, derecha) en el medio de cultivo, ya que en ausencia de dicho azúcar las bacterias mostraron un fenotipo no mucoso (ver Figura 1A, izquierda). La producción fue confirmada mediante el análisis a nivel celular de las bacterias contenidas en las colonias por microscopia electrónica de transmisión (Notararigo et al. (2013) Carbohydr. Polym. 93:57-64). Sólo se detectó la presencia de moléculas de
30 exopolisacárido asociadas a la pared bacteriana o rodeando las células en los cultivos crecidos en presencia de sacarosa (ver Figura 1B).

1.2. Caracterización

35 Las bacterias contenidas en las colonias fueron identificadas molecularmente mediante: (i) la extracción del ADN genómico; (ii) la amplificación del ADN codificante del ARNr 16S utilizando oligonucleótidos que contienen las secuencias flanqueantes conservadas; y (iii) la

determinación de la secuencia de nucleótidos del amplicón (SEQ ID NO: 1). La caracterización fue realizada por la empresa SECUGEN S.L. (Madrid). Los resultados obtenidos permitieron determinar que la bacteria pertenecía al género *Lactobacillus* y a la especie *Lactobacillus sakei* y se la denominó *Lactobacillus sakei* MN1.

5

EJEMPLO 2: Diseño de oligonucleótidos capaces de detectar genes codificantes de dextran sacarasa, e identificación y caracterización del gen *dsrLS* de *L. sakei* MN1.

2.1. Diseño de oligonucleótidos capaces de detectar genes codificantes de dextran sacarasa

10

La detección de la producción de EPS por *L. sakei* MN1 en placas conteniendo sacarosa indicaba que el enzima responsable de la síntesis era una dextran sacarasa. Por este motivo se analizaron las secuencias de nucleótidos de 14 genes codificantes de dextran sacarasa bacterianas depositadas en el banco de datos GenBank del *National Center for Biotechnology* (NCBI, USA) utilizando el programa BLAST (NCBI, USA). La detección de una región conservada incluida en la secuencia codificante del centro catalítico de los enzimas permitió diseñar los oligonucleótidos *dsrF* (SEQ ID NO: 2) y *dsrR* (SEQ ID NO: 3), que fueron utilizados para amplificar un fragmento de ADN de 696 pb. Se empleó como molde una preparación de ADN genómico o de ADN plasmídico de *L. sakei* MN1 y el enzima *Phusion Hot Start High Fidelity Polymerase* (Finnzymes). Las condiciones de la reacción de amplificación fueron las siguientes: (i) una desnaturalización inicial de 30 segundos a 98 °C; (ii) 35 ciclos de desnaturalización 10 segundos a 98°C, hibridación 20 segundos a 64,4 °C y extensión 30 segundos a 72 °C; y (iii) una extensión final de 10 minutos a 72 °C. En las dos amplificaciones se detectó el amplicón esperado indicando que el gen poseía una localización plasmídica. Además, también se obtuvo el amplicón cuando se analizó el genoma de dos bacterias lácticas, *Lactobacillus plantarum* MMB2 y *Leuconostoc mesenteroides* RTF10, productoras de exopolisacáridos y aisladas de productos cárnicos. Estos resultados mostraron la utilidad de los oligonucleótidos *dsrR* y *dsrF* para detectar genes *dsr* de igual modo que los oligonucleótidos degenerados descritos por Kralj y cols. (Kralj, Van Geel-Schutten, Van der Maarel y Dijkhuizen (2003) *Biocatalysis and Biotransformation*, 21:181-187) utilizados para la detección de genes codificantes de dextran sacarasa de bacterias lácticas pertenecientes al género *Lactobacillus*. La determinación de la secuencia de nucleótidos de los tres amplicones reveló una identidad total de los genes de MMB2 y RTF10 y tan sólo una homología del 56,5% con su homónimo de MN1.

35

2.2. Identificación y caracterización

Se identificó y determinó la secuencia de nucleótidos del gen codificante de la dextranasa de *L. sakei* MN1. El gen fue denominado *dsrLS* y contuvo 5.304 nucleótidos (SEQ ID NO: 1). También a partir de dicha secuencia se infirió la secuencia de 1.767 aminoácidos de la dextranasa DsrLS (SEQ ID NO:5). El análisis de dichas secuencias frente a aquellas depositadas en los bancos de datos del NCBI (USA) con el programa BLAST reveló homologías con otros genes bacterianos, mostrando la mayor homología con el gen *gtf1624* de *L. curvatus* TMW 1.624 (GenBank número de acceso HE972512.1) y su producto génico. Con respecto a la secuencia *gtf1624* de (5094 nt), presentó una diferencia de 215 nucleótidos y de 77 aminoácidos, respectivamente, con el gen y la proteína de *L. sakei* MN1. Dicha diferencia se situó entre las dos dextranasas en la región C-terminal. Por otro lado, el gen *dsrLS* y su producto de MN1 presentaron también elevada homología con el gen *gtfkg15* (Kralj, van Geel-Schutten, Dondorff, Kirsanovs, van der Maarel y Dijkhuizen (2004) Microbiology 150:3681-3690;) y el enzima codificado por él, sintetizado por *L. sakei* Kg15 productora de dextrano. La divergencia entre las moléculas de estas dos cepas fue de 525 nucleótidos y de 176 aminoácidos, de los cuáles, 26 se encontraron en la región N-terminal, 4 en la región central y 146 en la región C-terminal de la dextranasa. En consecuencia, la mayor divergencia de *dsrLS* con otras dextranasas estuvo localizada en el dominio C-terminal compuesto por regiones repetidas. Esta región parece estar implicada en la procesividad del enzima, al ser responsable de la unión de la proteína al dextrano sintetizado por ella.

EJEMPLO 3: Identificación de los plásmidos portadores de los genes *dsr*

Con el objeto de determinar la localización de los genes *dsr* en los genomas de *L. sakei* MN1, *L. plantarum* MMB2 y *L. mesenteroides* RTF10, se procedió a realizar un análisis mediante la técnica de hibridación de Southern utilizando preparaciones de ADN plasmídico (ver Figura 2) procedente de las tres bacterias lácticas.

El ADN plasmídico fue preparado a partir de cultivos crecidos a una densidad óptica de 1 medida a 600 nm. Las bacterias sedimentadas por centrifugación fueron concentradas 5 veces por resuspensión en una solución de sacarosa al 25% conteniendo 30 mg mL⁻¹ de lisozima, 120 U mL⁻¹ de mutanolisina y 40 µg mL⁻¹ RNasa A. La lisis celular se obtuvo mediante una incubación de 15 minutos a 37 °C. La desnaturalización del ADN cromosómico se realizó mediante un tratamiento de 7 minutos a temperatura ambiente con dodecil sulfato

sódico al 2% y 0,13 N de hidróxido sódico. La eliminación del ADN cromosómico y de restos celulares se realizó por precipitación con acetato sódico 1 M a pH 4,8 y centrifugación a 15.700 x g durante 15 minutos a 4 °C. El ADN plasmídico, contenido en los sobrenadantes, fue concentrado por tratamiento con isopropanol al 42% y centrifugación a 15.700 x g durante 15 minutos a 4 °C. Las formas circulares, y superenrolladas de los plásmidos presentes en los precipitados fueron purificadas y desproteínizadas por resuspensión en agua, adición de 1,8 M de acetato amónico, 0,12 mg mL⁻¹ de bromuro de etidio y una mezcla 1:1 de fenol:cloroformo/alcohol isoamílico (24/1) al 40% y centrifugación a 15.700 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los plásmidos contenidos en las fases acuosas fueron precipitados con etanol absoluto durante 12 horas a -20 °C y centrifugación a 11.269 x g durante 45 minutos a -10 °C, desecados y finalmente resuspendidos en 10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA.

Las preparaciones plasmídicas fueron fraccionadas en gel de agarosa al 0,7%. El método empleado para realizar la hibridación de Southern fue el previamente descrito para la detección de genes implicados en la síntesis de β-glucanos (Werning, Ibarburu, Dueñas, Irastorza, Navas, López, (2006) Journal of Food Protection 69:161-169), pero utilizando una temperatura de hibridación de 45 °C. Como sonda para la hibridación se utilizó el amplicón obtenido con el ADN de *L. sakei* MN1 y los oligonucleótidos dsrF y dsrR. Se detectó hibridación con las tres preparaciones plasmídicas, siendo crítica para la detección la temperatura de hibridación. En cada caso la banda detectada apareció localizada en una posición distinta (ver Figura 2B). La migración de las bandas de hibridación mostró correspondencia con plásmidos detectados por tinción del gel con bromuro de etidio (ver Figura 2A). La masa molecular de dichos plásmidos fue inferida por su migración y utilizando como referencia la de los plásmidos de la estirpe V517 de *Escherichia coli* (ver Figura 2A, carril C). Así, se detectaron plásmidos de 15 kb, 19 kb y 22 kb portadores del gen *dsr* en los genomas de *L. sakei* MN1, *L. plantarum* MMB2 y *L. mesenteroides* RTF10, respectivamente.

El plásmido de *L. sakei* MN1 fue denominado pMN1 y posteriormente caracterizado por la determinación de la secuencia de nucleótidos localizada corriente arriba del gen *dsrLS*. El análisis de la secuencia de una región de ADN de 1172 nt frente a aquellas depositadas en los bancos de datos del NCBI (USA) con el programa BLAST reveló homologías con los replicones de la familia del plásmido plásmido pUCL287 (Benachour, Frère, Flahaut, Novel y Auffray (1997) Mol. Gen. Genet. 255: 504-513), que replican por el mecanismo de tipo theta. Dicha región contiene el origen de replicación y los genes *repA* y *repB*, que codifican las

proteínas RepA y RepB implicadas en la iniciación de la replicación del plásmido y en los mecanismos de partición, que son responsables de su estabilidad segregacional.

EJEMPLO 4: Producción de EPS por *L. sakei* MN1.

5

Para determinar la producción de EPS por *L. sakei* MN1, se cultivó la bacteria a 30 °C en medio Man Rogosa Sharpe (MRS, Pronadisa) con sacarosa al 2% hasta una densidad óptica de 1 medida a 600 nm y se realizó una dilución 1/100 de dicho cultivo en medio definido CDM suplementado con 0,8% de sacarosa. Se tomaron muestras cada hora, durante 8 horas, y se determinaron el crecimiento bacteriano y la producción de EPS (ver Figura 3). Para determinar la producción de EPS se eliminaron las células por centrifugación a 9.300 x g durante 10 minutos a 4 °C y a los sobrenadantes se les añadieron tres volúmenes de etanol absoluto para precipitar el EPS durante 12 horas a -20 °C. Posteriormente los sobrenadantes fueron centrifugados a 9.300 x g durante 20 minutos a 4 °C y lavados dos veces con etanol absoluto al 80 %. Una vez secos, fueron resuspendidos en agua destilada estéril, calentados durante 10 minutos a 30 °C y cuantificados mediante el método del fenol-sulfúrico descrito por Dubois y colaboradores (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers y Smith (1956) Analytical Chemistry, 28:350-356). Los resultados pusieron de manifiesto que después de 8 horas *L. sakei* MN1 fue capaz de producir cantidades de EPS superiores a 2 g L⁻¹.

20

Para llevar a cabo una producción del compuesto, a gran escala y con un grado de pureza alto, se cultivó la bacteria a 30 °C en medio MRS con sacarosa al 2% hasta una densidad óptica de 1 medida a 600 nm y se realizó una dilución 1/100 de dicho cultivo en medio definido CDM con 0,8% de sacarosa. Cuando la densidad óptica fue de 1, se eliminaron las células por centrifugación a 16.000 x g durante 30 minutos a 4 °C y a los sobrenadantes se les añadió un volumen de etanol absoluto para precipitar el EPS durante 24 horas a 4 °C. Posteriormente, se centrifugaron a 10.651 x g durante 60 minutos a 4 °C para eliminar el sobrenadante, y el EPS precipitado fue re-suspendido con agua ultrapura. Se realizó una diálisis de los EPS, durante 2 días, con varios cambios de agua usando membranas de 12-14 kDa. Se congelaron a -80 °C y se liofilizaron. En estas condiciones, la producción de exopolisacárido puro es de aproximadamente 0,7 g L⁻¹.

30

EJEMPLO 5: Caracterización fisicoquímica del EPS sintetizado por *L. sakei* MN1.

35

Para llevar a cabo una caracterización del EPS sintetizado por *L. sakei* MN1, según el ejemplo anterior se realizaron: (i) determinación de su espectro de infrarrojos, (ii) análisis de metilación del biopolímero y (iii) análisis de su composición de monosacáridos tal y como se describe en Notararigo et al. (Notararigo et al. (2013) Carbohydr. Polym. 93:57–64).

5 Para obtener el espectro de infrarrojos, las muestras se analizaron mediante la técnica del KBr en un instrumento FTIR (espectrofotómetro de infrarrojos por transformada de Fourier) 4200 tipo A (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) en el rango de 400–4000 cm^{-1} . El detector empleado fue del tipo sulfato de triglicocola con una resolución de 4 cm^{-1} . En el espectro del EPS de MN1 (Fig. 4A), se observaron entre otras bandas de absorción, una a 849 cm^{-1} y
10 otra a 916 cm^{-1} , ambas características de α -anómeros.

Con el fin de determinar la composición de monosacáridos del biopolímero, se hidrolizó el EPS con ácido trifluoroacético (TFA) 3M durante 1 h a 121 °C. Los monosacáridos liberados se redujeron con NaBH_4 y se acetilaron (Laine, Esselman y Sweeley (1972), Methods in
15 Enzymology, 28:159-167). Los azúcares neutros fueron identificados y cuantificados mediante cromatografía de gases. El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un instrumento CG-EM 7980A-5975C de la casa Agilent, equipado con una columna HP-5MS (30m x 0,25 mm, 0,2 μm espesor de la película), un inyector *split/splitless* y con helio como gas portador. Inyector y detector se programaron a una temperatura de 250 °C. El pico de
20 cada azúcar en el cromatograma se identificó comparando su tiempo de retención con los de patrones analizados en idénticas condiciones. La cuantificación se realizó atendiendo al área de los picos y a los factores de respuesta obtenidos con diferentes monosacáridos patrón. Los resultados obtenidos mostraron que los dextranos producidos, tanto por *L. sakei* MN1 como por las otras dos bacterias lácticas, estaban compuestos exclusivamente por
25 moléculas de glucosa.

El EPS producido por *L. sakei* MN1 fue metilado mediante el método de Ciucanu y Kerek (Ciucanu y Kerek (1984), Carbohydr. Res. 131:209-217, modificado por Needs y Selvendran (1993), Carbohydr. Res. 245:1-10). El EPS metilado se hidrolizó para obtener
30 monosacáridos parcialmente metilados que se derivatizaron para dar lugar a sus correspondientes acetatos de alditol parcialmente metilados. La reducción y acetilación se realizó según el método de Laine et al. (Laine, Esselman y Sweeley (1972), Meth. Enzymol. 28:159-167) con una única modificación que consiste en reducir con NaBD_4 . Los acetatos de alditol parcialmente metilados se analizaron mediante cromatografía de gases-
35 espectrometría de masas en un instrumento Agilent 7980A-5975C equipado con una columna HP-5MS (30m x 0,25mm, 0,2 μm espesor de la película), con helio. El inyector y la

línea de transferencia se mantuvieron a 250 °C durante el análisis. La relación de split durante la inyección fue de 50:1. Cada uno de los picos del cromatograma se identificó mediante su tiempo de retención y su espectro de masas. La cuantificación se realizó atendiendo al área de los picos (ver Figura 4B). El EPS producido por *L. sakei* MN1 generó

5 derivados parcialmente metilados y acetilados de un (1→6)-glucano con aproximadamente 10% de sustituciones en la posición O-3 con cadenas laterales compuestas por un residuo único de glucosa. Ya que la banda correspondiente a los anómeros fue observada en el espectro de infrarrojo, este polímero puede ser descrito como un polisacárido de tipo dextrano (ver Figura 4C).

10

Los resultados de los análisis indicados mostraron un polisacárido extracelular constituido por cadenas prácticamente lineales de α -(1,6)-glucopiranosas (90%) con ramificaciones α -(1,3) (10%) denominado por sus características como dextrano.

15 **EJEMPLO 6: Comparación del dextrano producido por *L. sakei* MN1 y un dextrano comercial a través de análisis de resonancia magnética nuclear.**

El tamaño molecular del dextrano producido por *L. sakei* MN1 y el dextrano comercial T2000 (Pharmacia fine chemicals AB Uppsala, Suecia) fue analizado por RMN mediante la técnica

20 de DOSY (Espectroscopía de Difusión Ordenada). Para ello, se disolvieron 15 mg de los polisacáridos en 0,5 mL de D₂O. Los análisis de DOSY se realizaron con el protocolo estándar Bruker DOSY a 298 K con el programa de pulsos ledbpg2s en un espectrómetro Bruker Avance 500 MHz. Treinta y dos espectros de protón (1H) monodimensionales (1D) fueron recogidos con un gradiente de duración de $\delta=4$ ms y con un tiempo de eco de $\Delta=400$

25 ms. En la Figura 5 puede observarse que existe una gran diferencia de tamaño entre el dextrano comercial T2000 y el dextrano de *L. sakei* MN1, ya que estos presentan unos logaritmos del coeficiente de difusión de -10,9 y -12,3, respectivamente. En consecuencia la masa molecular del dextrano producido por *L. sakei* MN1 es superior a 2×10^6 kDa.

30 **EJEMPLO 7: Evaluación *in vitro* de los dextranos como antivirales frente a virus de salmónidos.**

Se realizó una evaluación *in vitro* frente a virus de salmónidos sobre cultivos celulares infectado utilizando varios dextranos purificados a partir de sobrenadantes de cultivos de *L. sakei* MN1 (MN1), *L. plantarum* MMB2 (MMB2) y *L. mesenteroides* RTF10 (RTF10), así

35 como del dextrano comercial T2000 (Pharmacia fine chemicals AB Uppsala, Suecia).

Asimismo, se eligieron las líneas celulares BF-2 (ATCC CRL 1681) obtenida de *Lepomis macrochirus* y EPC (ATCC CRL-2872) obtenida de epiteloma papuloso de ciprínidos *Pimephales promelas*. Las células se cultivaron en medio de crecimiento Leibovitz (L15, Gibco, Invitrogen, Barcelona) a 25°C suplementado con 100 UI mL⁻¹ de penicilina, 100 µg mL⁻¹ de estreptomina, 2 mM de L-glutamina y 10% de suero fetal bovino (FBS, Gibco). Para el mantenimiento de la monocapa celular, se utilizó el mismo medio pero disminuyendo el porcentaje de suero fetal al 2%.

7.1. Evaluación de la toxicidad de los dextranos utilizados

Se determinó la viabilidad celular de las líneas celulares BF-2 y EPC, tratadas y sin tratar, por ensayos colorimétricos según el método de Renault y cols. (Renault, Torchy y Kinkelin (1991) Dis. Aquat. Org. 10:23–29). A monocapas confluentes de células BF-2 y EPC, creciendo en placas de plástico desechable de 96 pocillos, se les retiró el medio de crecimiento y se reemplazó por diferentes concentraciones (desde 10 µg mL⁻¹ hasta 5000 µg mL⁻¹) de los dextranos diluidos en medio de mantenimiento. A los controles de células se les añadió el mismo volumen de medio de mantenimiento sin compuesto. Las placas se incubaron a 20°C durante 3 días (células BF-2) ó 7 días (células EPC). Posteriormente, se eliminó el medio de cultivo y se tiñeron las monocapas con una solución de cristal violeta al 1% (w/v) en etanol durante 10 min. Tras lavado y secado al aire se midió la absorbancia en un lector de microplacas (Bio-Rad®) a 590 nm. Los resultados se presentan como porcentajes de células supervivientes, donde el 100% representa la absorbancia de las células control. A la concentración citotóxica del compuesto que ocasionó un 50% de inhibición del crecimiento celular se le denomina CT₅₀. Los resultados obtenidos revelaron que la CT₅₀ para todos los dextranos ensayados era mayor que 5000 µg mL⁻¹.

7.2. Estudio de la Inhibición de efectos citopáticos de los virus y determinación de dosis inhibitoria 50

Para evaluar la capacidad antiviral de los dextranos se utilizaron dos virus procedentes de la colección Norteamericana ATCC. Estos virus fueron un Birnavirus (Virus de la necrosis pancreática infecciosa, VNPI, ATCC VR1318) y un Rhabdovirus (virus de la necrosis hematopoyética infecciosa, VNHI, ATCC VR714). Para el cultivo y la propagación de los virus a ensayar las células, a las 24 horas de su siembra y con una monocapa semiconfluente, fueron infectadas con una dosis infectiva viral 50% (TCID₅₀ mL⁻¹) de 1000. Con esta dosis una infección de 3 días a 15 °C con VNPI y de 7 días a 20 °C con VNHI

conllevo unos efectos citopáticos (ECP) producidos por los virus que afectaron a toda la monocapa celular y provocaron una lisis total (control virus, CV). Después de las incubaciones de las células en presencia de los virus, se recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron a baja velocidad (900 x g) durante 5 minutos para eliminar los restos celulares y se repartieron alícuotas de la suspensión de virus en criotubos que se conservaron a -80°C hasta su utilización. El título infectivo del pase de virus se determinó calculando la TCID₅₀ mL⁻¹.

La actividad antiviral de los dextranos ensayados se determinó por la capacidad de estos para inhibir los ECP de los virus y proteger la monocapa celular y se calculó mediante la determinación del porcentaje de células viables. Brevemente, se infectaron células BF-2 y EPC (aproximadamente 10⁵ mL⁻¹) cultivadas en placas de 48 pocillos con una TCID₅₀ mL⁻¹ de virus de 1000 y diferentes concentraciones (de 10 a 5000 µg mL⁻¹) de los dextranos diluidos en el medio de mantenimiento de las líneas celulares. Los cultivos se incubaron a las temperaturas óptimas para cada virus. Las monocapas se observaron diariamente al microscopio y, cuando los efectos citopáticos (ECP) en las células infectadas y no tratadas fueron totales (4+ ó un 100 % de afectación de la monocapa celular), se determinó el porcentaje de células supervivientes mediante tinción con cristal violeta. Los resultados obtenidos respecto a los ECP y a los porcentajes de células supervivientes (% inhibición) se muestran en las Tablas 1 y 2. Todos los dextranos ensayados mostraron una actividad antiviral similar frente al virus VNPI, requiriéndose una concentración de 1000 (MN1 y RTF10), 2000 (MMB2) o 3000 (T2000) µg mL⁻¹ para obtener un 50% de inhibición (Tabla 1). Sin embargo, frente al virus VNHI el dextrano producido por *L. sakei* MN1 mostró la mayor actividad antiviral obteniéndose una inhibición del 50% con una concentración de tan sólo 500 µg mL⁻¹ (Ver Tabla 2). Esta potente inhibición no se detectó con el dextrano T2000, ya que se requirió una concentración 10 veces superior (5000 µg mL⁻¹) para obtener el mismo efecto. Este hecho podría ser debido a la elevada masa molecular del dextrano purificado a partir de los sobrenadantes de MN1.

Tabla 1. Actividad antivírica de dextranos frente a VNPI en células BF-2.

	MN1		MMB2		RTF10		T 2000	
$\mu\text{g mL}^{-1}$	ECP ¹	% Inhibición ²	ECP ¹	% Inhibición ²	ECP ¹	% Inhibición ²	ECP ¹	% Inhibición ²
5000	0	100	+-	75	0	100	+-	75
4000	0	100	+-	75	0	100	+-	75
3000	0	100	+-	75	+-	75	2+	50
2000	+-	75	2+	50	+	75	3+	25
1000	2+	50	3+	25	2+	50	3+	25
750	3+	25	3+	25	3+	25	4+	0
500	3+	25	4+	25	3+	25	DT	0
250	4+	0	DT	0	4+	0	DT	0
100	DT	0	DT	0	DT	0	DT	0
50	DT	0	DT	0	DT	0	DT	0
10	DT	0	DT	0	DT	0	DT	0
0	DT	0	DT	0	DT	0	DT	0

¹ECP: DT, destrucción total de la monocapa. Los valores desde 4+ hasta 0 indican una gradación desde todas las células infectadas hasta la falta de infección.

- 5 ²El efecto inhibitorio de los dextranos (% de inhibición) representa el porcentaje de células supervivientes a la infección con el virus VNHI. El 100% representa la absorbancia de las células control no infectadas y tratadas del mismo modo que las células infectadas (control células) y el 0% corresponde a las células infectadas con virus y sin tratamiento.

10 Tabla 2. Actividad antivírica de dextranos frente a VNHI en células EPC.

	MN1		MMB2		RTF10		T2000	
$\mu\text{g mL}^{-1}$	ECP ¹	% Inhibición ²	ECP ¹	% Inhibición ²	ECP ¹	% Inhibición ²	ECP ¹	% Inhibición ²
5000	0	100	+-	75	0	100	2+	50
4000	0	100	+-	75	0	100	3+	25
3000	0	100	+-	75	0	100	3+	25
2000	+-	75	+	75	0	100	4+	25
1000	+	75	2+	50	+-	100	4+	25
750	+	75	3+	25	2+	50	4+	0
500	2+	50	3+	25	3+	25	DT	0
250	3+	25	4+	25	3+	25	DT	0
100	3+	25	DT	0	4+	25	DT	0
50	4+	25	DT	0	DT	0	DT	0
10	DT	0	DT	0	DT	0	DT	0
0	DT	0	DT	0	DT	0	DT	0

¹ECP: DT, destrucción total de la monocapa. Los valores desde 4+ hasta 0 indican una gradación desde todas las células infectados hasta la falta de infección.

²El efecto inhibitorio de los dextranos (% de inhibición) representa el porcentaje de células supervivientes a la infección con el virus VNHI. El 100% representa la absorbancia de las células control no infectadas y tratadas del mismo modo que las células infectadas (control células) y el 0% corresponde a las células infectadas con virus y sin tratamiento.

REIVINDICACIONES

- 1.- Una secuencia de nucleótidos caracterizada por que se corresponde con la secuencia SEQ ID NO: 4.
- 5
- 2.- Una secuencia de nucleótidos caracterizada por que presenta una identidad del 80% con la secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1 y por que codifica una enzima dextransacarasa útil para la obtención de exopolisacáridos.
- 10
- 3.- Vector de expresión tipo procariota o eucariota caracterizado por que comprende una secuencia de nucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2.
- 4.- Vector de expresión según la reivindicación 3 caracterizada por que comprende la secuencia SEQ ID NO: 6.
- 15
- 5.- Una enzima con actividad dextransacarasa útil para la obtención de un exopolisacárido, caracterizada por que está codificada por una secuencia de nucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2.
- 20
- 6.- Una enzima con actividad dextransacarasa según la reivindicación 5 caracterizada por que está constituida por la SEQ ID NO: 5.
- 7.- Una célula caracterizada por que comprende una secuencia de nucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 2 o un vector de expresión según una cualquiera de las reivindicaciones 3 y 4.
- 25
- 8.- Una célula según la reivindicación 7 caracterizada por que se corresponde con una cepa *Lactobacillus sakei* con capacidad para producir un exopolisacárido.
- 30
- 9.- Una célula según la reivindicación 8, caracterizada por que la cepa bacteriana *Lactobacillus sakei* se aísla de fiambre de magro de cerdo.
- 10.- Una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a la 9 caracterizada por que se corresponde con la cepa *Lactobacillus sakei* MN1 con CECT 8329.

11.- Uso de una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a la 10 para la obtención de una enzima con actividad dextranasa según una cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6.

5 12.- Uso de una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a la 10 en un procedimiento útil para la obtención de un exopolisacárido.

13.- Procedimiento de obtención de un exopolisacárido según la reivindicación 12 caracterizado por que la célula es una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a la 10 y por que comprende las siguientes etapas:

- a) cultivar una bacteria *L. sakei* en medio de cultivo suplementado con al menos un azúcar, seleccionado de entre sacarosa y maltosa, hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento del exopolisacárido;
- b) eliminar las bacterias por centrifugación y separar el sobrenadante;
- 15 c) añadir un alcohol o una cetona para obtener un precipitado del exopolisacárido; y
- d) centrifugar el precipitado del paso (c) para eliminar el sobrenadante, y obtener un exopolisacárido precipitado.

14.- Procedimiento de obtención de un exopolisacárido según la reivindicación 13, caracterizada por que incluye una fase de purificación posterior a la etapa (d) que comprende las siguientes etapas:

- i.- resuspender el exopolisacárido precipitado según la etapa (d) en agua ultrapura;
- ii.- someter al exopolisacárido a una diálisis utilizando membranas de 12-13 kDa, con cambios de agua; y
- 25 iii.- congelar a una temperatura entre -60 y -80 °C y liofilizar.

15.- Procedimiento de obtención de un exopolisacárido según una cualquiera de las reivindicaciones 13 y 14 caracterizado por que la cepa *L. sakei* de la etapa (a) es la cepa *Lactobacillus sakei* MN1 con CECT 8329.

30 16.- Procedimiento de obtención de un exopolisacárido según una cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6 caracterizado por que utiliza una enzima de actividad dextranasa.

35 17.- Un exopolisacárido obtenido a través del procedimiento de obtención según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a la 16.

18. Un exopolisacárido según la reivindicación 17, caracterizado por que es un dextrano.

19.- Uso de un exopolisacárido según una cualquiera de las reivindicaciones 17 y 18 para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención o tratamiento de
5 infecciones virales de especies piscícolas, preferiblemente salmónidos.

20.- Uso según la reivindicación 19 caracterizado por que el virus pertenece a los géneros Birnavirus o Rhabdovirus, y preferentemente es el virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) o el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI).
10

21.- Composición farmacéutica veterinaria o alimentaria útil para la prevención o tratamiento de infecciones virales de especies piscícolas caracterizada por que comprende un exopolisacárido según una cualquiera de las reivindicaciones 17 y 18.

15 22.- Composición según la reivindicación 21 caracterizada por que el virus pertenece a los géneros Birnavirus o Rhabdovirus, y preferentemente es el virus de la necrosis pancreática infecciosa (VNPI) o el virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (VNHI).

FIGURA 1

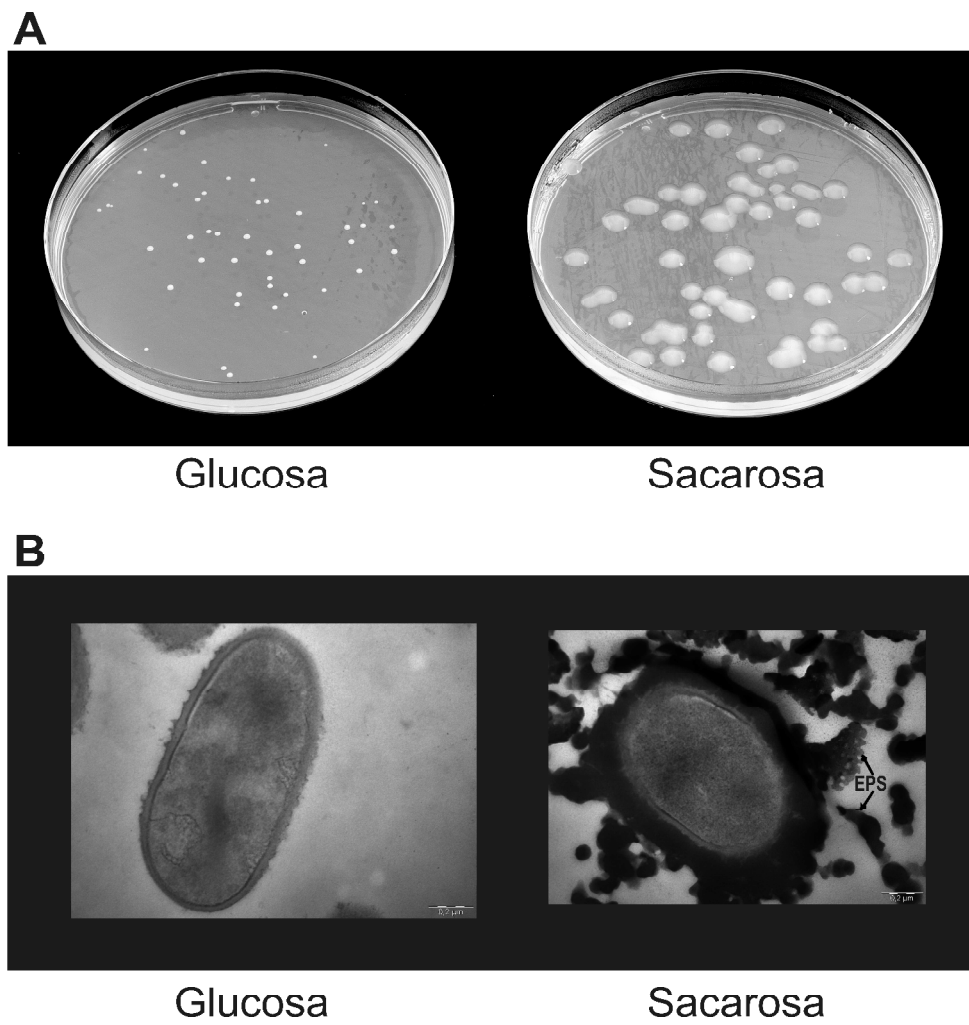


FIGURA 2

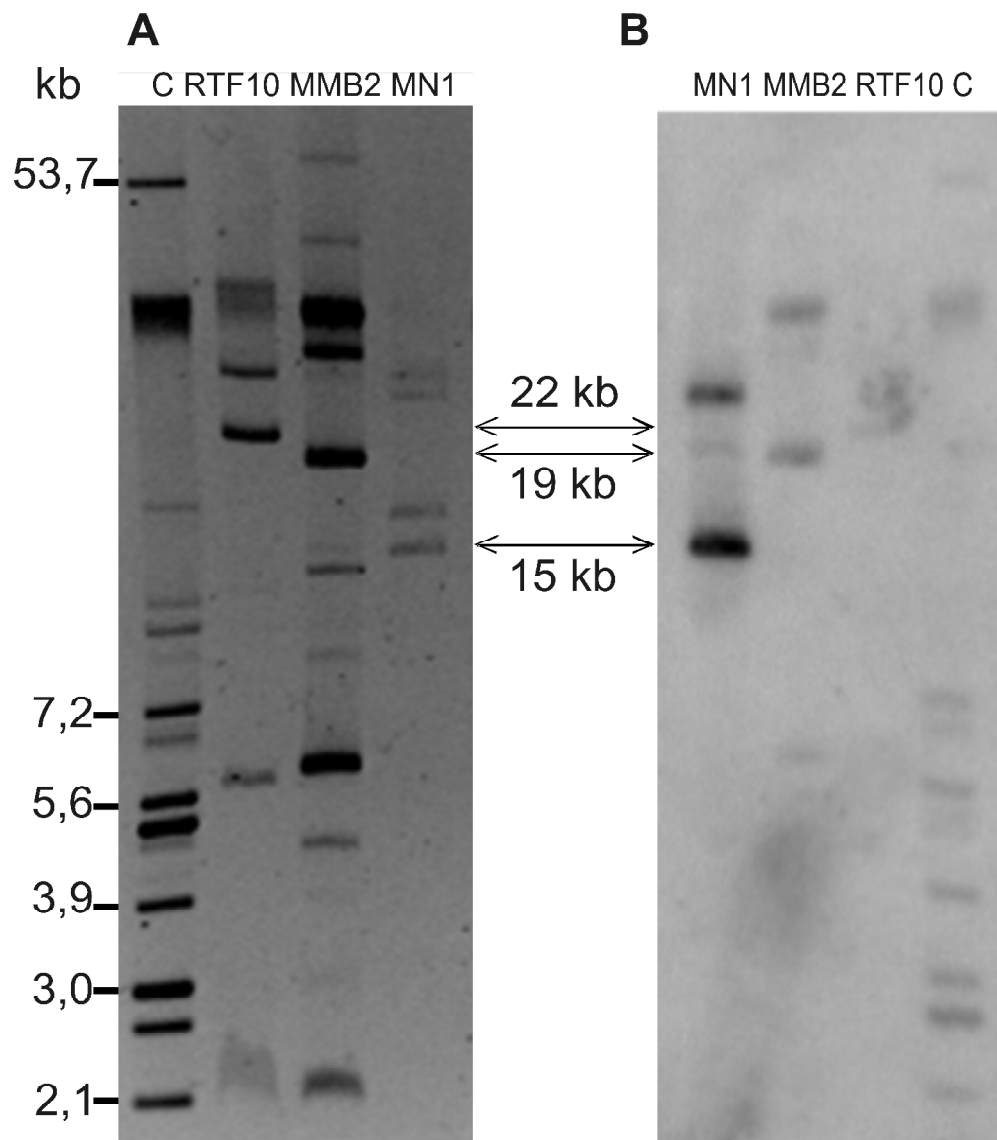


FIGURA 3

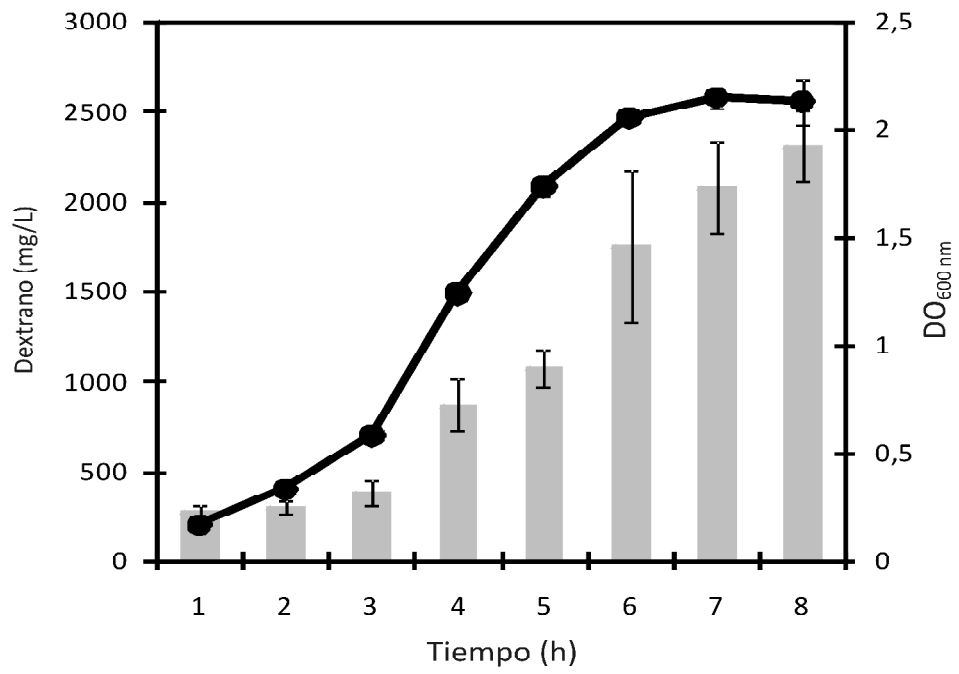
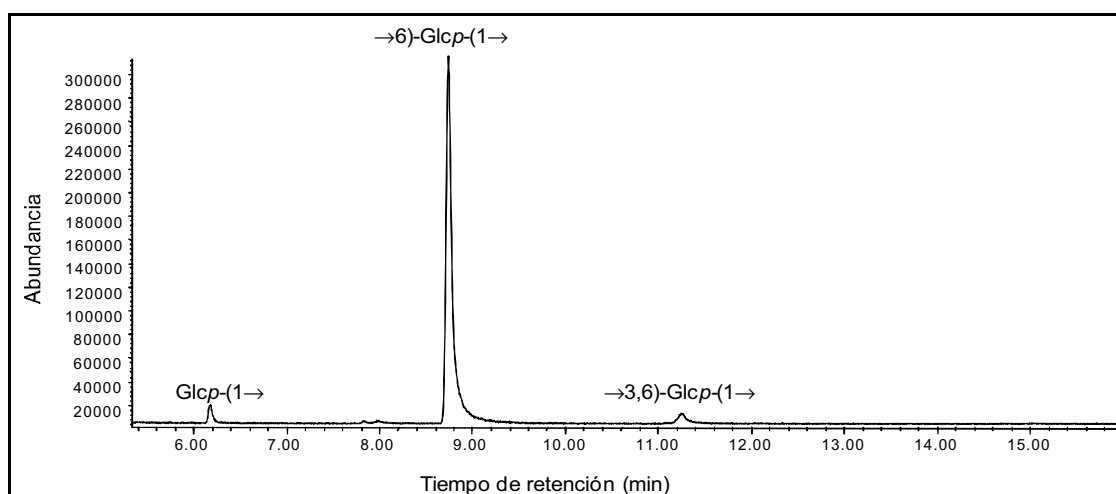
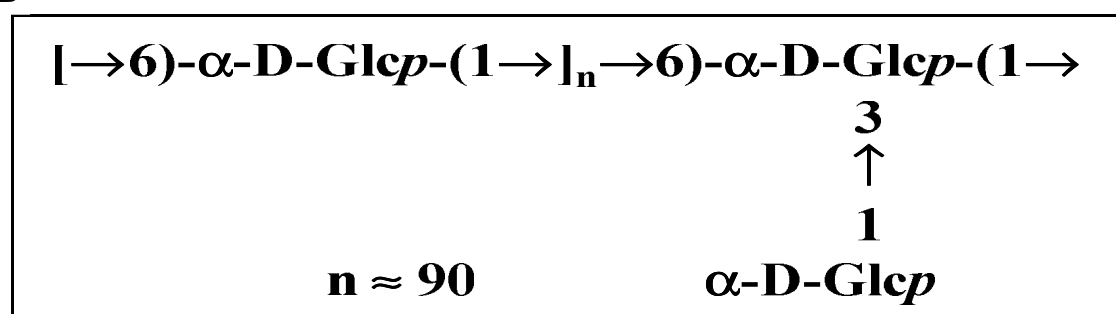


FIGURA 4

A



B



C

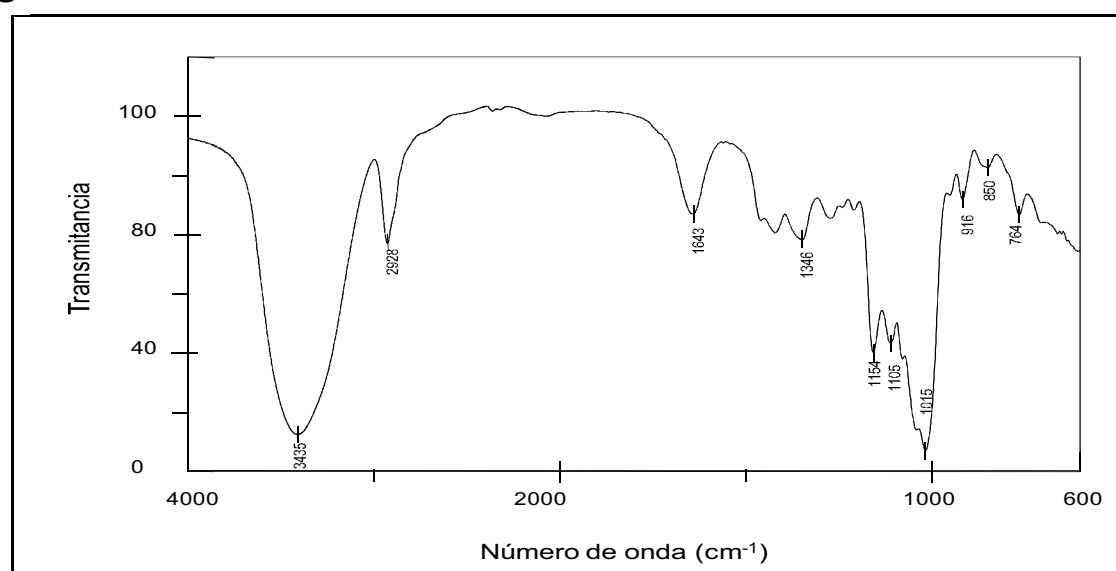
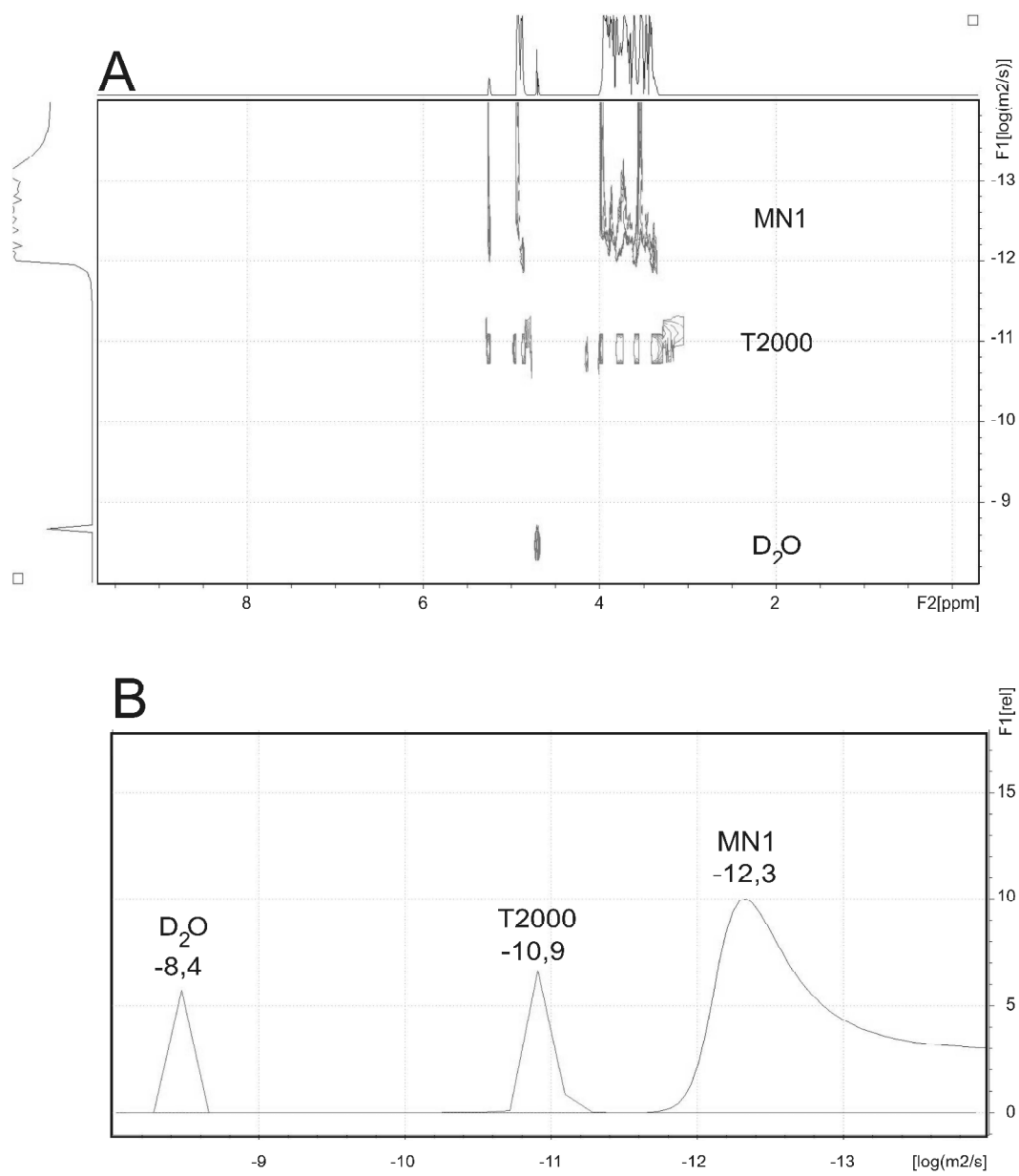


FIGURA 5



ES 2 526 264 B1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Universitat de Valencia
- <120> Secuencia de nucleótidos codificante de una enzima con actividad dextranasa, células que la expresan y su uso para la obtención de exopolisacáridos con actividad antiviral y composiciones que los contienen
- <130> 2013-0330
- <140> ES P201330831
- <141> 2013-06-05
- <160> 8
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 1345
- <212> DNA
- <213> Lactobacillus sakei MN1
- <220>
- <223> Secuencia del DNA codificante de la región variable del 16S RNA de Lactobacillus sakei MN1
- <400> 1
- | | |
|--|------|
| gctgatccgc gattactagc gattccggct tcatgtaggc gagttgcagc ctacaatccg | 60 |
| aactgagaat gggtttaaga gattagctaa acctcgcggt ctcgcaactc gttgtaccat | 120 |
| ccattgtagc acgtgtgtag cccagggtcat aaggggcatg atgatttgac gtcgtcccca | 180 |
| ccttcctccg gtttgtcacc ggcagtctca ctagagtgcc caactaaatg ctggcaacta | 240 |
| gtaataaggg ttgcgctcgt tgcgggactt aaccaacat ctcacgacac gagctgacga | 300 |
| caaccatgca ccacctgtca ctttgtcccc gaagggaag ctctatctct agagtgggtca | 360 |
| aaggatgtca agacctggta aggttcttcg cgttgcttcg aattaaacca catgctccac | 420 |
| cgcttgctgc ggccccgctc aattcctttg agtttcaacc ttgcggctcgt actccccagg | 480 |
| cggagtgttt aatgcgttag ctgcggcact gaaggcgga aaccctcaa cacctagcac | 540 |
| tcatcgttta cggcatggac taccagggtta tctaactctg tttgctacct atgctttcga | 600 |
| gcctcagcgt cagttacaga ccagacagcc gccttcgcca ctggtgttct tccatatatc | 660 |
| tacgcatttc accgctacac atggagtacc actgtcctct tctgcactca agtttcccag | 720 |
| tttccgatgc acttcttcgg ttgagccgaa ggctttcaca tcagacttaa gaaaccgcct | 780 |
| gcgctcgttt tacgccaat aaatccggac aacgcttgcc acctacgtat taccgaggct | 840 |
| gctggcacgt agttagccgt ggctttctgg ttggataccg tcactacctg atcagttact | 900 |
| atcagataca ttcttctcca acaacagagt ttacgatcc gaaaaccttc ttcactcacg | 960 |
| cggcggttgc ccatcagact ttcgtccatt gtggaagatt ccctactgct gcctcccgta | 1020 |
| ggagtctggg ccgtgtctca gtcccagtgt ggccgattac cctctcaggt cggctatgca | 1080 |
| tcacgggtctt ggtgagcctt tacctacca actaactaat gcaccgcggg tccatcctaa | 1140 |
| agtgatagcc gaaaccatct ttcaacccta caccatgcgg tgttagggtt tatgcgggtat | 1200 |

ES 2 526 264 B1

tagcatctgt ttccaaatgt tatccccac tttagggcag gttaccacg tggtactcac 1260
ccgtccgcca ctactcaaa tgtttatcaa tcaggagcaa gctccttcaa tctaaacgag 1320
agtgcgttcg acttgcatgt atagc 1345

<210> 2
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Cebador sentido para la amplificación de una región del gen dsrLS de *Lactobacillus sakei* MN1

<400> 2
gatgatgggc aatatatggc aa 22

<210> 3
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Cebador antisentido para la amplificación de una región del gen dsrLS de *Lactobacillus sakei* MN1

<400> 3
cttgaacgat attgtggtgc caa 23

<210> 4
<211> 5304
<212> DNA
<213> *Lactobacillus sakei* MN1

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos del gen dsrLS de *Lactobacillus sakei* MN1

<400> 4
atgttaagga ataattatatt tggagagact aaaacgcatt ataaattata taaatgcggt 60
aagaactggg ctgtcatggg gatttcatta tttccgctgg gattagggat gctagttacc 120
agccagccag tgtcagctga tgtgacagcc accagcacct caagcagtgc agtgaggacc 180
gatgcaatca gtgaaagtag tagcagtgc gcaaaggctg aaacgactag tgcaagtagt 240
agcagtgcag tgaaggccga aacgactagt gcaagtagta gcagtgcagc aaaggctgaa 300
acggctgcga tcactactgc aggtgttgca aatgctgatt cacaacatc agcagaagta 360
accgctgact ctacttctac cagccaagt gtaactaata attccaataa tcaaaataat 420
acagcacagc cagccgggtca agaagcagcc ccggtatcag aggacacatc atctgatgat 480
agtgagagaa ctacaccaac agttgcaaat aatgataagc cagcaattga ttcagttgac 540
acttcacaac ctgcaactgc agcgccaaaa gcagacactg atgtatcaac gctacaagta 600
gatgcaacta cgaagaccga ttcagacata aaagaggata caccaacaga taagacaacc 660
gatacaaaga ctgtgcaatt aaccactgtt gaaggaacgt ccaagcaagt ggtaacgacg 720
ccgaaggaag agagctcaac tgacaaatct tcgtctgtgg tttctaaaca gacagacaaa 780
acgtctttgc caaccgtagc aacagcaaca gcgacgacag tgtctaagat tccttcagtg 840

ES 2 526 264 B1

acaggtgatt	accagtttga	cgaaaagacg	aagacttata	cgttcacagg	taaagatggt	900
catcccgtaa	ctgggttggg	ttacgcgaat	aatatcctgc	aatactttga	tgaacgggt	960
catcaagtaa	aagggtcaata	cgttacaatt	gcaggtcatg	tatattat	cgaccagcc	1020
agcggcgctg	cacaaacagg	tgtaaatcaa	atcgatggta	agatggttgg	gtttaaatct	1080
gatgggtcac	aaattacgtc	aggtttttct	aatgataacg	ccggaaattc	ttactacttt	1140
gatgagtctg	gaaccatggg	gacagggcgg	caaactattg	ctggtaagac	gtattacttt	1200
gacaaagacg	ggcatctccg	taaggggtat	tccactatta	ttgataatca	attgtactat	1260
ttcgatttga	aaacaggaga	gtctgtttca	acaacgacgt	ccaatttcaa	atctggcttg	1320
acatcacaaa	cggatgacac	aacaccacat	aatagtgcgg	ttaatattgc	taaggatagt	1380
tttaccaccg	ttgatggatt	cttgacagct	gagtcattgg	atgtacctaa	agatattcaa	1440
acatctgcga	cggactggcg	tgcattcaacg	cctgaagatt	tccgtccgat	catgatgact	1500
tggtggccaa	cgaagcaaat	tcaagcagcg	tatttgaacc	atatgggtctc	cgaaggattg	1560
ttgtcatcag	ataagaagtt	ctccgcaacg	gatgatcaaa	cggtgttgaa	ccaagcagca	1620
cacgcggttc	aattgcaaat	tgaattgaag	attcaacaga	caaagtctgt	tgaatggttg	1680
cgaacaacga	tgcacaattt	cattaagtca	caaccaggat	acaatgttac	tagtgaaacg	1740
ccaagtaacg	accaccttca	aggtggcgca	ttaagctaca	ttaacagtgt	tttgacgcct	1800
gatgcgaact	caaatttccg	tttgatgaac	cgtaatccaa	cacaacaaga	tggtacgcgt	1860
cattacaaca	ctgatacatc	tgaggggtgga	tatgagttgc	tgtagccaa	tgacgtggat	1920
aattctaacc	cagttgttca	agcagaacaa	ttgaactggg	tgtacttctt	gacgcatttc	1980
ggtgaaattg	ttaagaacga	tccgtcagct	aactttgata	gtgttagagt	ggatgcggta	2040
gacaacgtgg	atgccgacct	gctaaacatt	acagccgctt	attttagaga	tgtgtatggc	2100
gtcgataaaa	acgatttgac	agctaataca	catttgtcta	ttttggaaga	ttggggccac	2160
aatgacccat	tatatgtcaa	ggaccacggg	agtgatcagt	tgacgatgga	tgattacatg	2220
catacccaat	tgatttgggtc	attaacaaaa	aatccagata	atcgtagtgc	gatgcgacga	2280
tttatggagt	attatttggg	cgaccgtgct	aaggacaata	cgtctgatca	ggcaattcct	2340
aattacagct	ttgtccgtgc	acacgatagt	gaagttcaaa	cggttatcgg	tgatattggt	2400
gcgaagttgt	atccggatgt	taaaaattca	ttggcgccat	ctatggaaca	attggcggca	2460
gcctttaagg	tatatgatgc	ggatatgaat	tctgttaata	agaagtatac	gcaatacaac	2520
atgccagcag	cgtatgccat	gttactaacg	aataaagaca	caattccacg	tgtttactat	2580
ggatgatatt	atagcgatga	tggtcaatat	atggcaacta	agtcaccata	ttacgatgcc	2640
atctcagcgt	tggtgaaagc	ccgtattaa	tatgtggctg	gtggacaaac	catggctgta	2700
gataaacacg	atatcttaac	atcagttcgc	tttggtgatg	ggatcatgaa	tgcattctgat	2760
aagggttagca	cgacggcccc	tacccaagga	attggcgtga	ttgtcagcaa	taatgatgcg	2820
ttagcgttga	aggagacac	tgtagaccct	catatgggta	tcgctcacgc	caaccaggca	2880
taccgtgctt	tggtgttaac	gacgacagat	ggactaatga	aatacacgtc	cgataatggc	2940

ES 2 526 264 B1

gcgccaattc	gctatacgga	tgcaaatggt	gacttgattt	tcactagcgc	agacattaag	3000
ggataccaaa	acgttgaggt	atccggattc	ttgtcagtgt	gggtaccagt	cggtgcatcc	3060
gacacacagg	atgcgcgcgc	aacagggtct	agcgcgtcaa	acaaaactgg	tgacacctta	3120
cattcaaatg	cagcattgga	ctcaaatgtg	atttatgaag	gtttttctaa	tttccaagag	3180
atgccaacaa	cccacgatga	gtttacaaac	gtaaagatcg	ctcaaaatgc	tgatttgttt	3240
aagtcattggg	gtgtgacaag	tttccaactt	gcaccacaat	atcgttcaag	tgatgacaca	3300
tcattttttg	attctattat	taagaatgga	tatgcgttta	cagaccgcta	tgacttgggc	3360
tttaatacgc	caacaaagta	cggagacgtt	gacgacctag	cagatgcaat	tagagcaatg	3420
cacagtgttg	gtattcaggt	catggctgac	tttgtccctg	accaaattta	taatttgcca	3480
ggccaagaag	tagttgctgt	taatcg tact	aataactttg	gtacaccaaa	ccaggattca	3540
gatctacaaa	accagttgta	tgttacaaat	tcaaaggggtg	gcggtgaata	ccaagctaag	3600
tatgggtgggtg	agttcttgga	tcttttgcgt	ctggaacacc	ctgatttggt	tacaacaaat	3660
cagatttcga	ctgggtgtacc	aatcgatggg	tccacgaaga	ttaaagaatg	gtctgcaaag	3720
tacttcaatg	gttctgacat	ccaaggtaag	ggcgcgtgatt	acgtattgaa	ggatgggtgca	3780
tctcaagaat	atttcaagat	tacgtcta at	gcgaacgatg	agtccttctt	gccaaaacaa	3840
tttatgaatc	aagatgccat	gactgggttc	accacagatg	aaaagggcac	aacttattat	3900
tcaacaagtg	gttaccaagc	taaacagtcg	tttatccaag	gtgatgatgg	acaatattat	3960
tactttgatg	cagacggata	catgggtgacg	ggctcacaaa	ccattaatgg	taagcaatat	4020
tactttcttg	caaatggcgt	tgagttaaga	gaagcatttt	tacaaaatgc	atctggtaac	4080
acggttttatt	atggcaagac	tggctcagca	gttaagtcta	aatatgtagt	cgatcaaagc	4140
gggtgtggctt	attactttga	tgtaaacggg	aatatggctg	cagatcgtat	gatgattctt	4200
gatggacaca	cgcaatatatt	ctttgcgggt	ggttcacaa	ctaaggacca	atttttgatt	4260
gggtcagatg	gtaacttacg	ttactttgac	caaggtagtg	gtaatatggg	tacaaatcgt	4320
tttgcagtaa	accgaaacgg	ggattgggtc	tacttcaatg	gcgatgggat	cgcgttgaag	4380
ggttggcaaa	caattgctgg	taagacttat	ttctttgatg	ctgatggacg	tcaagtcaag	4440
gctgccgctg	acaaggctgc	tgctgacaag	gctgccgctg	aacaagccgc	tgctgacaag	4500
gccgctgctg	acaaggctgc	cgctgaacaa	gctgccgctg	acaaggctgc	tgctgacaag	4560
gctgccgctg	aacaagctgc	cgctgacaag	gctgccgctg	acaaggctgc	cgctgaacaa	4620
gctgccgctg	acaaggctgc	tgctgacaag	gctgccgctg	aacaagctgc	cgctgaacaa	4680
gctgccgctg	acaaggctgc	cgctgaacaa	gccgctgctg	acaaggctgc	cgctgaacaa	4740
gccgctactg	acaaggccgc	tgctgacaag	gctgccgctg	aacaagctgc	cgctgacaag	4800
gctgctgctg	acaaggctgc	cgctgaacaa	gctgccgctg	aacaagctgc	cgctgacaag	4860
gctgccgctg	aacaagctgc	tgctgacaag	gctgccgctg	aacaagctgc	cgctgacaag	4920
gctgccgctg	aacaagccgc	tgctgacaag	gctgccgcta	aggataagca	aactcaagct	4980
gtagcttacg	ctgctaccaa	ggctaagaac	aatattgatc	aagctactac	agctgatggc	5040

ES 2 526 264 B1

atcaatgatg cccaagcaac tggatcact gatattgata accagcatgt tcctggtact 5100
tctgttgata atcaaaagca agctgagaag gtaactgaag atatcaagaa tgatccagat 5160
aataagactt tgcctgaagc tatcgaatta ccaaatacgg gcgttgataa gacagaaagt 5220
attactatta ccggtgtagt tatgctaadc ctcactacta tttttggtct gttgtttaca 5280
agtaaaaagc ataaaaaaga ttag 5304

<210> 5
<211> 1767
<212> PRT
<213> Lactobacillus sakei MN1

<220>
<223> secuencia de aminoácidos de la proteína DsrLS de
Lactobacillus sakei MN1

<400> 5

Met Leu Arg Asn Asn Tyr Phe Gly Glu Thr Lys Thr His Tyr Lys Leu
1 5 10 15

Tyr Lys Cys Gly Lys Asn Trp Ala Val Met Gly Ile Ser Leu Phe Pro
20 25 30

Leu Gly Leu Gly Met Leu Val Thr Ser Gln Pro Val Ser Ala Asp Val
35 40 45

Thr Ala Thr Ser Thr Ser Ser Ser Ala Val Arg Thr Asp Ala Ile Ser
50 55 60

Glu Ser Ser Ser Ser Ala Ala Lys Ala Glu Thr Thr Ser Ala Ser Ser
65 70 75 80

Ser Ser Ala Val Lys Ala Glu Thr Thr Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ala
85 90 95

Ala Lys Ala Glu Thr Ala Ala Ile Thr Thr Ala Gly Val Ala Asn Ala
100 105 110

Asp Ser Gln Thr Ser Ala Glu Val Thr Ala Asp Ser Thr Ser Thr Ser
115 120 125

Gln Val Val Thr Asn Asn Ser Asn Asn Gln Asn Asn Thr Ala Gln Pro
130 135 140

Ala Gly Gln Glu Ala Ala Pro Val Ser Glu Asp Thr Ser Ser Asp Asp
145 150 155 160

Ser Glu Arg Thr Thr Pro Thr Val Ala Asn Asn Asp Lys Pro Ala Ile
165 170 175

Asp Ser Val Asp Thr Ser Gln Pro Ala Thr Ala Ala Pro Lys Ala Asp
180 185 190

ES 2 526 264 B1

Thr Asp Val Ser Thr Leu Gln Val Asp Ala Thr Thr Lys Thr Asp Ser
 195 200 205
 Asp Ile Lys Glu Asp Thr Pro Thr Asp Lys Thr Thr Asp Thr Lys Thr
 210 215 220
 Val Gln Leu Thr Thr Val Glu Gly Thr Ser Lys Gln Val Val Thr Thr
 225 230 235
 Pro Lys Glu Glu Ser Ser Thr Asp Lys Ser Ser Ser Val Val Ser Lys
 245 250 255
 Gln Thr Asp Lys Thr Ser Leu Pro Thr Val Ala Thr Ala Thr Ala Thr
 260 265 270
 Thr Val Ser Lys Ile Pro Ser Val Thr Gly Asp Tyr Gln Phe Asp Glu
 275 280 285
 Lys Thr Lys Thr Tyr Thr Phe Thr Gly Lys Asp Gly His Pro Val Thr
 290 295 300
 Gly Leu Val Tyr Ala Asn Asn Ile Leu Gln Tyr Phe Asp Glu Thr Gly
 305 310 315 320
 His Gln Val Lys Gly Gln Tyr Val Thr Ile Ala Gly His Val Tyr Tyr
 325 330 335
 Phe Asp Pro Ala Ser Gly Ala Ala Gln Thr Gly Val Asn Gln Ile Asp
 340 345 350
 Gly Lys Met Val Gly Phe Lys Ser Asp Gly Ser Gln Ile Thr Ser Gly
 355 360 365
 Phe Ser Asn Asp Asn Ala Gly Asn Ser Tyr Tyr Phe Asp Glu Ser Gly
 370 375 380
 Thr Met Val Thr Gly Arg Gln Thr Ile Ala Gly Lys Thr Tyr Tyr Phe
 385 390 395 400
 Asp Lys Asp Gly His Leu Arg Lys Gly Tyr Ser Thr Ile Ile Asp Asn
 405 410 415
 Gln Leu Tyr Tyr Phe Asp Leu Lys Thr Gly Glu Ser Val Ser Thr Thr
 420 425 430
 Thr Ser Asn Phe Lys Ser Gly Leu Thr Ser Gln Thr Asp Asp Thr Thr
 435 440 445
 Pro His Asn Ser Ala Val Asn Met Ser Lys Asp Ser Phe Thr Thr Val
 450 455 460
 Asp Gly Phe Leu Thr Ala Glu Ser Trp Tyr Val Pro Lys Asp Ile Gln
 465 470 475 480

ES 2 526 264 B1

Thr Ser Ala Thr Asp Trp Arg Ala Ser Thr Pro Glu Asp Phe Arg Pro
 485 490 495
 Ile Met Met Thr Trp Trp Pro Thr Lys Gln Ile Gln Ala Ala Tyr Leu
 500 505 510
 Asn His Met Val Ser Glu Gly Leu Leu Ser Ser Asp Lys Lys Phe Ser
 515 520 525
 Ala Thr Asp Asp Gln Thr Leu Leu Asn Gln Ala Ala His Ala Val Gln
 530 535 540
 Leu Gln Ile Glu Leu Lys Ile Gln Gln Thr Lys Ser Val Glu Trp Leu
 545 550 555 560
 Arg Thr Thr Met His Asn Phe Ile Lys Ser Gln Pro Gly Tyr Asn Val
 565 570 575
 Thr Ser Glu Thr Pro Ser Asn Asp His Leu Gln Gly Gly Ala Leu Ser
 580 585 590
 Tyr Ile Asn Ser Val Leu Thr Pro Asp Ala Asn Ser Asn Phe Arg Leu
 595 600 605
 Met Asn Arg Asn Pro Thr Gln Gln Asp Gly Thr Arg His Tyr Asn Thr
 610 615 620
 Asp Thr Ser Glu Gly Gly Tyr Glu Leu Leu Leu Ala Asn Asp Val Asp
 625 630 635 640
 Asn Ser Asn Pro Val Val Gln Ala Glu Gln Leu Asn Trp Leu Tyr Phe
 645 650 655
 Leu Thr His Phe Gly Glu Ile Val Lys Asn Asp Pro Ser Ala Asn Phe
 660 665 670
 Asp Ser Val Arg Val Asp Ala Val Asp Asn Val Asp Ala Asp Leu Leu
 675 680 685
 Asn Ile Thr Ala Ala Tyr Phe Arg Asp Val Tyr Gly Val Asp Lys Asn
 690 695 700
 Asp Leu Thr Ala Asn Gln His Leu Ser Ile Leu Glu Asp Trp Gly His
 705 710 715 720
 Asn Asp Pro Leu Tyr Val Lys Asp His Gly Ser Asp Gln Leu Thr Met
 725 730 735
 Asp Asp Tyr Met His Thr Gln Leu Ile Trp Ser Leu Thr Lys Asn Pro
 740 745 750

ES 2 526 264 B1

Asp Asn Arg Ser Ala Met Arg Arg Phe Met Glu Tyr Tyr Leu Val Asp
755 760 765

Arg Ala Lys Asp Asn Thr Ser Asp Gln Ala Ile Pro Asn Tyr Ser Phe
770 775 780

Val Arg Ala His Asp Ser Glu Val Gln Thr Val Ile Gly Asp Ile Val
785 790 795 800

Ala Lys Leu Tyr Pro Asp Val Lys Asn Ser Leu Ala Pro Ser Met Glu
805 810 815

Gln Leu Ala Ala Ala Phe Lys Val Tyr Asp Ala Asp Met Asn Ser Val
820 825 830

Asn Lys Lys Tyr Thr Gln Tyr Asn Met Pro Ala Ala Tyr Ala Met Leu
835 840 845

Leu Thr Asn Lys Asp Thr Ile Pro Arg Val Tyr Tyr Gly Asp Met Tyr
850 855 860

Thr Asp Asp Gly Gln Tyr Met Ala Thr Lys Ser Pro Tyr Tyr Asp Ala
865 870 875 880

Ile Ser Ala Leu Leu Lys Ala Arg Ile Lys Tyr Val Ala Gly Gly Gln
885 890 895

Thr Met Ala Val Asp Lys His Asp Ile Leu Thr Ser Val Arg Phe Gly
900 905 910

Asp Gly Ile Met Asn Ala Ser Asp Lys Gly Ser Thr Thr Ala Arg Thr
915 920 925

Gln Gly Ile Gly Val Ile Val Ser Asn Asn Asp Ala Leu Ala Leu Lys
930 935 940

Gly Asp Thr Val Thr Leu His Met Gly Ile Ala His Ala Asn Gln Ala
945 950 955 960

Tyr Arg Ala Leu Leu Leu Thr Thr Thr Asp Gly Leu Met Lys Tyr Thr
965 970 975

Ser Asp Asn Gly Ala Pro Ile Arg Tyr Thr Asp Ala Asn Gly Asp Leu
980 985 990

Ile Phe Thr Ser Ala Asp Ile Lys Gly Tyr Gln Asn Val Glu Val Ser
995 1000 1005

Gly Phe Leu Ser Val Trp Val Pro Val Gly Ala Ser Asp Thr Gln
1010 1015 1020

Asp Ala Arg Ala Thr Gly Ser Ser Ala Ala Asn Lys Thr Gly Asp
1025 1030 1035

ES 2 526 264 B1

Thr	Leu 1040	His	Ser	Asn	Ala	Ala 1045	Leu	Asp	Ser	Asn	Val 1050	Ile	Tyr	Glu
Gly	Phe 1055	Ser	Asn	Phe	Gln	Glu 1060	Met	Pro	Thr	Thr	His 1065	Asp	Glu	Phe
Thr	Asn 1070	Val	Lys	Ile	Ala	Gln 1075	Asn	Ala	Asp	Leu	Phe 1080	Lys	Ser	Trp
Gly	Val 1085	Thr	Ser	Phe	Gln	Leu 1090	Ala	Pro	Gln	Tyr	Arg 1095	Ser	Ser	Asp
Asp	Thr 1100	Ser	Phe	Leu	Asp	Ser 1105	Ile	Ile	Lys	Asn	Gly 1110	Tyr	Ala	Phe
Thr	Asp 1115	Arg	Tyr	Asp	Leu	Gly 1120	Phe	Asn	Thr	Pro	Thr 1125	Lys	Tyr	Gly
Asp	Val 1130	Asp	Asp	Leu	Ala	Asp 1135	Ala	Ile	Arg	Ala	Met 1140	His	Ser	Val
Gly	Ile 1145	Gln	Val	Met	Ala	Asp 1150	Phe	Val	Pro	Asp	Gln 1155	Ile	Tyr	Asn
Leu	Pro 1160	Gly	Gln	Glu	Val	Val 1165	Ala	Val	Asn	Arg	Thr 1170	Asn	Asn	Phe
Gly	Thr 1175	Pro	Asn	Gln	Asp	Ser 1180	Asp	Leu	Gln	Asn	Gln 1185	Leu	Tyr	Val
Thr	Asn 1190	Ser	Lys	Gly	Gly	Gly 1195	Glu	Tyr	Gln	Ala	Lys 1200	Tyr	Gly	Gly
Glu	Phe 1205	Leu	Asp	Leu	Leu	Arg 1210	Leu	Glu	His	Pro	Asp 1215	Leu	Phe	Thr
Thr	Asn 1220	Gln	Ile	Ser	Thr	Gly 1225	Val	Pro	Ile	Asp	Gly 1230	Ser	Thr	Lys
Ile	Lys 1235	Glu	Trp	Ser	Ala	Lys 1240	Tyr	Phe	Asn	Gly	Ser 1245	Asp	Ile	Gln
Gly	Lys 1250	Gly	Ala	Asp	Tyr	Val 1255	Leu	Lys	Asp	Gly	Ala 1260	Ser	Gln	Glu
Tyr	Phe 1265	Lys	Ile	Thr	Ser	Asn 1270	Ala	Asn	Asp	Glu	Ser 1275	Phe	Leu	Pro
Lys	Gln 1280	Phe	Met	Asn	Gln	Asp 1285	Ala	Met	Thr	Gly	Phe 1290	Thr	Thr	Asp

ES 2 526 264 B1

Glu	Lys	Gly	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Ser	Gly	Tyr	Gln	Ala	Lys
	1295					1300					1305			
Gln	Ser	Phe	Ile	Gln	Gly	Asp	Asp	Gly	Gln	Tyr	Tyr	Tyr	Phe	Asp
	1310					1315					1320			
Ala	Asp	Gly	Tyr	Met	Val	Thr	Gly	Ser	Gln	Thr	Ile	Asn	Gly	Lys
	1325					1330					1335			
Gln	Tyr	Tyr	Phe	Leu	Pro	Asn	Gly	Val	Glu	Leu	Arg	Glu	Ala	Phe
	1340					1345					1350			
Leu	Gln	Asn	Ala	Ser	Gly	Asn	Thr	Val	Tyr	Tyr	Gly	Lys	Thr	Gly
	1355					1360					1365			
Ser	Ala	Val	Lys	Ser	Lys	Tyr	Val	Val	Asp	Gln	Ser	Gly	Val	Ala
	1370					1375					1380			
Tyr	Tyr	Phe	Asp	Val	Asn	Gly	Asn	Met	Val	Ala	Asp	Arg	Met	Met
	1385					1390					1395			
Ile	Leu	Asp	Gly	His	Thr	Gln	Tyr	Phe	Phe	Ala	Gly	Gly	Ser	Gln
	1400					1405					1410			
Ala	Lys	Asp	Gln	Phe	Leu	Ile	Gly	Ser	Asp	Gly	Asn	Leu	Arg	Tyr
	1415					1420					1425			
Phe	Asp	Gln	Gly	Ser	Gly	Asn	Met	Val	Thr	Asn	Arg	Phe	Ala	Val
	1430					1435					1440			
Asn	Arg	Asn	Gly	Asp	Trp	Phe	Tyr	Phe	Asn	Gly	Asp	Gly	Ile	Ala
	1445					1450					1455			
Leu	Lys	Gly	Trp	Gln	Thr	Ile	Ala	Gly	Lys	Thr	Tyr	Phe	Phe	Asp
	1460					1465					1470			
Ala	Asp	Gly	Arg	Gln	Val	Lys	Ala	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Ala
	1475					1480					1485			
Asp	Lys	Ala	Ala	Ala	Glu	Gln	Ala	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Ala
	1490					1495					1500			
Asp	Lys	Ala	Ala	Ala	Glu	Gln	Ala	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Ala
	1505					1510					1515			
Asp	Lys	Ala	Ala	Ala	Glu	Gln	Ala	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Ala
	1520					1525					1530			
Asp	Lys	Ala	Ala	Ala	Glu	Gln	Ala	Ala	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Ala
	1535					1540					1545			
Asp	Lys	Ala	Ala	Ala	Glu	Gln	Ala	Ala	Ala	Glu	Gln	Ala	Ala	Ala
	1550					1555					1560			

ES 2 526 264 B1

Asp Lys Ala Ala Ala Glu Gln Ala Ala Ala Asp Lys Ala Ala Ala
 1565 1570 1575
 Glu Gln Ala Ala Thr Asp Lys Ala Ala Ala Asp Lys Ala Ala Ala
 1580 1585 1590
 Glu Gln Ala Ala Ala Asp Lys Ala Ala Ala Asp Lys Ala Ala Ala
 1595 1600 1605
 Glu Gln Ala Ala Ala Glu Gln Ala Ala Ala Asp Lys Ala Ala Ala
 1610 1615 1620
 Glu Gln Ala Ala Ala Asp Lys Ala Ala Ala Glu Gln Ala Ala Ala
 1625 1630 1635
 Asp Lys Ala Ala Ala Glu Gln Ala Ala Ala Asp Lys Ala Ala Ala
 1640 1645 1650
 Lys Asp Lys Gln Thr Gln Ala Val Ala Tyr Ala Ala Thr Lys Ala
 1655 1660 1665
 Lys Asn Asn Ile Asp Gln Ala Thr Thr Ala Asp Gly Ile Asn Asp
 1670 1675 1680
 Ala Gln Ala Thr Gly Ile Thr Asp Ile Asp Asn Gln His Val Pro
 1685 1690 1695
 Gly Thr Ser Val Asp Asn Gln Lys Gln Ala Glu Lys Val Thr Glu
 1700 1705 1710
 Asp Ile Lys Asn Asp Pro Asp Asn Lys Thr Leu Pro Glu Ala Ile
 1715 1720 1725
 Glu Leu Pro Asn Thr Gly Val Asp Lys Thr Glu Ser Ile Thr Ile
 1730 1735 1740
 Thr Gly Val Val Met Leu Ile Leu Thr Thr Ile Phe Gly Leu Leu
 1745 1750 1755
 Phe Thr Ser Lys Lys His Lys Lys Asp
 1760 1765

<210> 6
 <211> 1172
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus sakei MN1

<220>
 <223> secuencia de nucleótidos del origen del replicón del plásmido
 pmn1 de Lactobacillus sakei MN1. Origen de replicación:
 234..>420. Gen repA: 470..>1405. Gen repB: 1398..>1903

<400> 6
 cctcttttaa acctctttta taaacctctt ttaaacctct tttagacccc tcttgaggct

ES 2 526 264 B1

tactctccca aggcttatag aagtttatcg actacatttt gtctgtttat cgactacatt 120
 ttgtctgttt atcgactaca ttttgtctgt ttatcgacta cttttgtct gtttatcgac 180
 tacacttatt tactttctgta ttcaaataaa gtagtattat tcaaggaggt tttttatga 240
 gcaatgaatt agttaaatat gatccagaac tgaatacaat tcctctgaga agatttactc 300
 ctgtagaaat gaatcttttc ttttcggttg tttctagaat gcgcgataaa ggtgatgata 360
 ctgttcggtt tacttttgat cagttaaaag aattaagcgc gtataagccg accgcaaata 420
 atcgatttat tgatgacata caaagtacat atcaaaaaat attaggtctt agatttggtt 480
 ctagaagtaa agatggactt gatagagaaa tgtttgtcat gtttactcga tttgaaatca 540
 agggttcggc agaagtcctt tatgttgata ttcaaattta cccaaggca ttgaaacttc 600
 taaataatct tgaaagctgg gttagatag ctttagcaga gttcagagat ttaaagagta 660
 gttatgcaaa aacgatgttt cgtctcctta aacaatttcg aactactggt tatgcttatt 720
 tttctaaaag tgattttttt gaattacttg atattccgca aagctattgg aataaacctg 780
 caaacgttga atccagagtt attcagccaa ttaaagaaga actaactcct cttttcaggg 840
 gtctagctat tagaaaaaaa tatggtaaag gccgtggcaa gccggttatt ggttactcat 900
 ttacctggaa atcagaaaaa aagaacgcag acgacttctc acaaggtaa tttcaagatg 960
 aacgtcaaaa actctttaac attcagcata atgggtgaatt aacagagcag gaaaaatggc 1020
 gtgccattga caaagttaag ggggtgactt taggctccac tgagaaacaa gcattggctg 1080
 agaaacaagc ggaacacgat aaaaaataa gagatcaagc aagaaaagaa gcacttgctg 1140
 aactccgaaa ggggtttgga aatcatgcct aa 1172

<210> 7

<211> 311

<212> PRT

<213> Lactobacillus sakei MN1

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la proteína RepA del plásmido pMN1 de Lactobacillus sakei MN1

<400> 7

Met Ser Asn Glu Leu Val Lys Tyr Asp Pro Glu Leu Asn Thr Ile Pro
 1 5 10 15

Leu Arg Arg Phe Thr Pro Val Glu Met Asn Leu Phe Phe Ser Val Val
 20 25 30

Ser Arg Met Arg Asp Lys Gly Asp Asp Thr Val Arg Phe Thr Phe Asp
 35 40 45

Gln Leu Lys Glu Leu Ser Ala Tyr Lys Pro Thr Ala Asn Asn Arg Phe
 50 55 60

Ile Asp Asp Ile Gln Ser Thr Tyr Gln Lys Ile Leu Gly Leu Arg Phe
 65 70 75 80

ES 2 526 264 B1

Gly Ser Arg Ser Lys₈₅ Asp Gly Leu Asp Arg₉₀ Glu Met Phe Val Met₉₅ Phe
 Thr Arg Phe Glu₁₀₀ Ile Lys Gly Ser Ala₁₀₅ Glu Val Pro Tyr Val₁₁₀ Asp Ile
 Gln Ile Tyr₁₁₅ Pro Lys Ala Leu Lys₁₂₀ Leu Leu Asn Asn₁₂₅ Leu Glu Ser Trp
 Val Arg Tyr Ala Leu Ala Glu₁₃₅ Phe Arg Asp Leu Lys₁₄₀ Ser Ser Tyr Ala
 Lys₁₄₅ Thr Met Phe Arg Leu₁₅₀ Leu Lys Gln Phe Arg₁₅₅ Thr Thr Gly Tyr Ala₁₆₀
 Tyr Phe Ser Lys Ser₁₆₅ Asp Phe Phe Glu Leu₁₇₀ Leu Asp Ile Pro Gln₁₇₅ Ser
 Tyr Trp Asn Lys₁₈₀ Pro Ala Asn Val Glu₁₈₅ Ser Arg Val Ile Gln₁₉₀ Pro Ile
 Lys Glu Glu₁₉₅ Leu Thr Pro Leu Phe₂₀₀ Arg Gly Leu Ala Ile₂₀₅ Arg Lys Lys
 Tyr Gly₂₁₀ Lys Gly Arg Gly Lys₂₁₅ Pro Val Ile Gly Tyr₂₂₀ Ser Phe Thr Trp
 Lys₂₂₅ Ser Glu Lys Lys Asn₂₃₀ Ala Asp Asp Phe Ser₂₃₅ Gln Gly Gln Phe Gln₂₄₀
 Asp Glu Arg Gln Lys₂₄₅ Leu Phe Asn Ile Gln₂₅₀ His Asn Gly Glu Leu₂₅₅ Thr
 Glu Gln Glu Lys₂₆₀ Trp Arg Ala Ile Asp₂₆₅ Lys Val Lys Gly Leu₂₇₀ Thr Leu
 Gly Ser Thr₂₇₅ Glu Lys Gln Ala Leu₂₈₀ Ala Glu Lys Gln Ala₂₈₅ Glu His Asp
 Lys Lys₂₉₀ Ile Arg Asp Gln Ala₂₉₅ Arg Lys Glu Ala Leu₃₀₀ Ala Glu Leu Arg
 Lys Gly Phe Gly Asn His Ala
 305 310

<210> 8
 <211> 169
 <212> PRT
 <213> Lactobacillus sakei MN1

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la proteína RepB del plásmido pMN1 de Lactobacillus sakei MN1