

(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 INVENCIÓN

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
CIENTÍFICAS (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**

(5) Resumen:

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.

La presente invención trata de una nueva secuencia de nucleótidos que codifica para una enzima con actividad dextranasa 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 salmonídeos. La invención también protege composiciones farmacéuticas veterinarias o alimentarias que contienen dicho exopolisacárido.

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 circscribe 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 salmonellos.

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 dextrans, presentan principalmente uniones α -(1→6) (Robyt y Walseth (1979) Carbohydr. Res. 68:95–111). Los
30 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 *Weisella* (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 glucansacarasas 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 dextransacarasas (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 20 dextransacarasas 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).

35 Ciertos tipos de dextrano, como el dextrano sulfatado, también se han empleado para 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 salmonidos 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).

20

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.

25

EXPLICACION DE LA INVENCION

Breve descripción de la invención

30 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.

35 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 que codifica una enzima dextransacarasa útil para la obtención de exopolisacáridos.

Otro objeto de la invención lo constituye un vector de expresión tipo procariota o eucariota,

5 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 lo 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 lo 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 lo 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.

35 Otro objeto de la invención lo constituye un procedimiento de obtención de un 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:

5 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

10 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 dextransacarasa, en adelante procedimiento de obtención de un exopolisacárido enzimático de la invención, donde se utiliza una enzima de actividad dextransacarasa 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.

20

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 salmonídos.

25

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.

30

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

35

La presente invención se basa en la identificación de una nueva enzima con actividad dextransacarasa, 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 dextransacarasa.

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 un elevada masa molecular (superior a $2 \times 10^6 \text{ Da}$);
- c) con respecto al uso como antivírico 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 microscopía 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 monosacarídicas 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 $\alpha\text{-D-glucopiranósil-(1-2)-}\beta\text{-D-fructofuranósido}$.

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

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.

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.

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.

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.

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.

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 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

5 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:

10 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.

15

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.

25 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 *dsls* y se caracteriza por poseer una masa molecular de 15 kDa y un
30 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.

35 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 dextrancararasas 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.

Otro objeto de la invención lo constituye una célula útil para obtener exopolisacáridos, en 5 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 10 cepa *Lactobacillus sakei* con capacidad para producir un exopolisacárido, preferentemente 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 30 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;

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 diáisisis utilizando membranas de 12-13 kDa, con cambios de agua; y

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

15 Otra realización particular de la invención la constituye el procedimiento de obtención de un 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.

25 Para el experto en la materia resultará obvio que el uso de la célula de la invención en el 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.

30 Para la obtención del dextrano (exopolisacárido), resulta necesaria la presencia de sacarosa (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 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)-glucopiranosa (90%) con 5 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 10 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 15 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 dextransacarasa, en adelante procedimiento de obtención de un exopolisacárido enzimático de la invención, donde se utiliza una enzima de 20 actividad dextransacarasa 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 $1000\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. Estos resultados contrastan con los obtenidos con otros exopolisacáridos, ensayados en paralelo, como el dextrano comercial 30 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 35 con VNHI, utilizando una concentración de $500\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. Estos resultados contrastan con los

obtenidos por otros dextrans 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 salmonídos.

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 salmonídos, 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 dextransacárasas 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

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 microscopía 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 codificador 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 dextransacarasas, e identificación y caracterización del gen *dsrLS* de *L. sakei* MN1.

10 **2.1. Diseño de oligonucleótidos capaces de detectar genes codificantes de dextransacarasas**

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 dextransacaraasa. Por este motivo se analizaron las secuencias de nucleótidos de 14 genes codificantes de dextransacarasas 15 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 20 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 desnaturación inicial de 30 segundos a 98 °C; (ii) 35 ciclos de desnaturación 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 25 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 30 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 dextransacarasas de bacterias lácticas pertenecientes al género *Lactobacillus*. La determinación de la secuencia de nucleótidos de los tres amplicones reveló una identidad 35 total de los genes de MMB2 y RTF10 y tan sólo una homología del 56,5% con su homónimo de MN1.

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, Kirsanova, 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 cuales, 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% contenido 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 desnaturación 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 5 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 10 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 15 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 20 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 25 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 30 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 plasmídico pUCL287 (Benachour, Frère, Flahaut, Novel y Auffray (1997) Mol. Gen. Genet. 255: 504-513), que replican por el mecanismo de tipo theta. 35 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, 10 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 15 °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 20 superiores a 2 g L⁻¹.

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 25 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 30 diátesis 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.

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 NaBH₄ 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 dextrans 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 NaBD₄. 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 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)-glucopiranosa (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 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 ledpg2s en un espectrómetro Bruker Avance 500 MHz. Treinta y dos espectros de protón (1H) monodimensionales (1D) fueron recogidos con un gradiente de duración de δ=4 ms y con un tiempo de eco de Δ=400 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 x 10⁶ kDa.

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

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

10

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 dextrans 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 dextrans 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

30 Para evaluar la capacidad antiviral de los dextrans 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

conllevó 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 ($900 \times g$) durante 5 minutos para eliminar los restos celulares 5 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 $\text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$.

La actividad antiviral de los dextrans ensayados se determinó por la capacidad de estos 10 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 10^5 mL^{-1}) cultivadas en placas de 48 pocillos con una $\text{TCID}_{50} \text{ mL}^{-1}$ de virus de 1000 y diferentes concentraciones (de 10 a $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$) de los dextrans diluidos en el medio de mantenimiento de las líneas celulares. Los cultivos se incubaron a 15 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 20 muestran en las Tablas 1 y 2. Todos los dextrans ensayados mostraron una actividad antiviral similar frente al virus VNPI, requiriéndose una concentración de 1000 (MN1 y RTF10), 2000 (MMB2) o 3000 (T2000) $\mu\text{g mL}^{-1}$ para obtener un 50% de inhibición (Tabla 1). Sin embargo, frente al virus VNHI el dextrano producido por *L. sakei* MN1 mostró la mayor 25 actividad antiviral obteniéndose una inhibición del 50% con una concentración de tan sólo 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Ver Tabla 2). Esta potente inhibición no se detectó con el dextrano T2000, ya que se requirió una concentración 10 veces superior ($5000 \mu\text{g mL}^{-1}$) 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.

$\mu\text{g mL}^{-1}$	MN1		MMB2		RTF10		T 2000	
	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.

$\mu\text{g mL}^{-1}$	MN1		MMB2		RTF10		T2000	
	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 dextrans (% 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.
- 5

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 25 las reivindicaciones 3 y 4.

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.

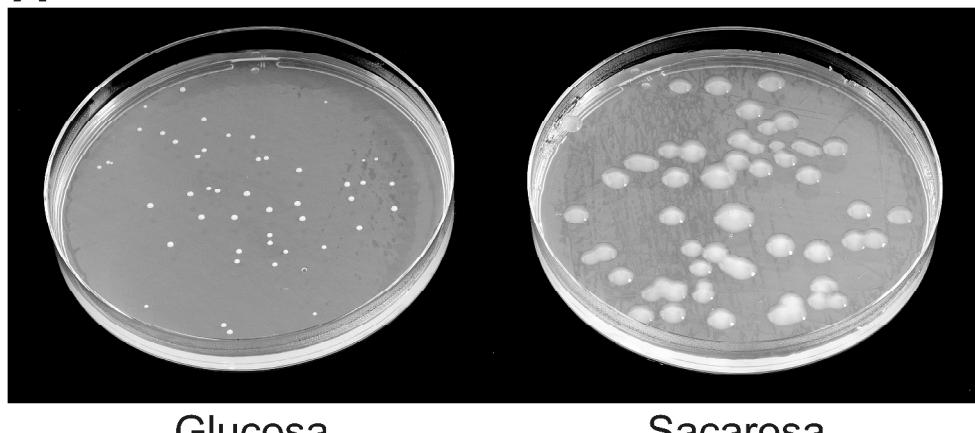
10.- Una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a la 9 caracterizada por que se corresponde con la cepa *Lactobacillus sakei* MN1 con CECT 8329.

- 11.- Uso de una célula según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a la 10 para la obtención de una enzima con actividad dextransacarasa 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.
- 10 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.
- 20 14.- Procedimiento de obtención de un exopolisacráido 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;
- 25 ii.- someter al exopolisacárido a una diáisisis utilizando membranas de 12-13 kDa, con cambios de agua; y
- iii.- congelar a una temperatura entre -60 y -80 °C y liofilizar.
- 30 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.
- 16.- Procedimiento de obtención de un exopolisacárido según una cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6 caracterizado por que utiliza una enzima de actividad dextransacarasa.
- 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 salmonídos.
- 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

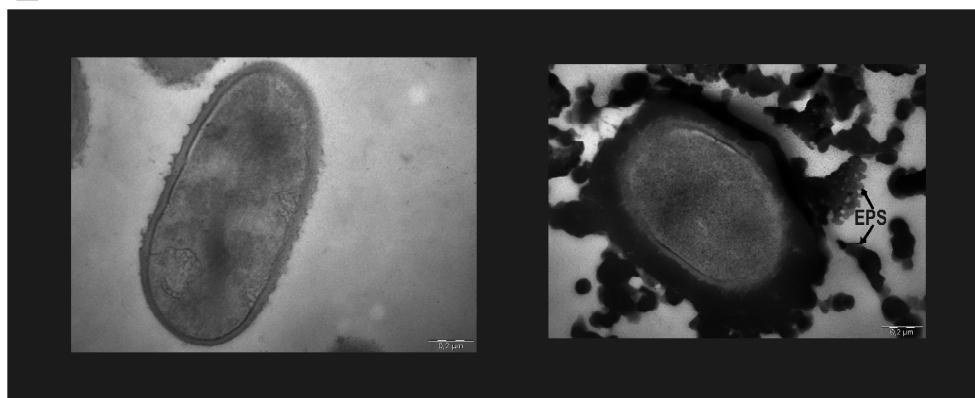
A



Glucosa

Sacarosa

B



Glucosa

Sacarosa

FIGURA 2

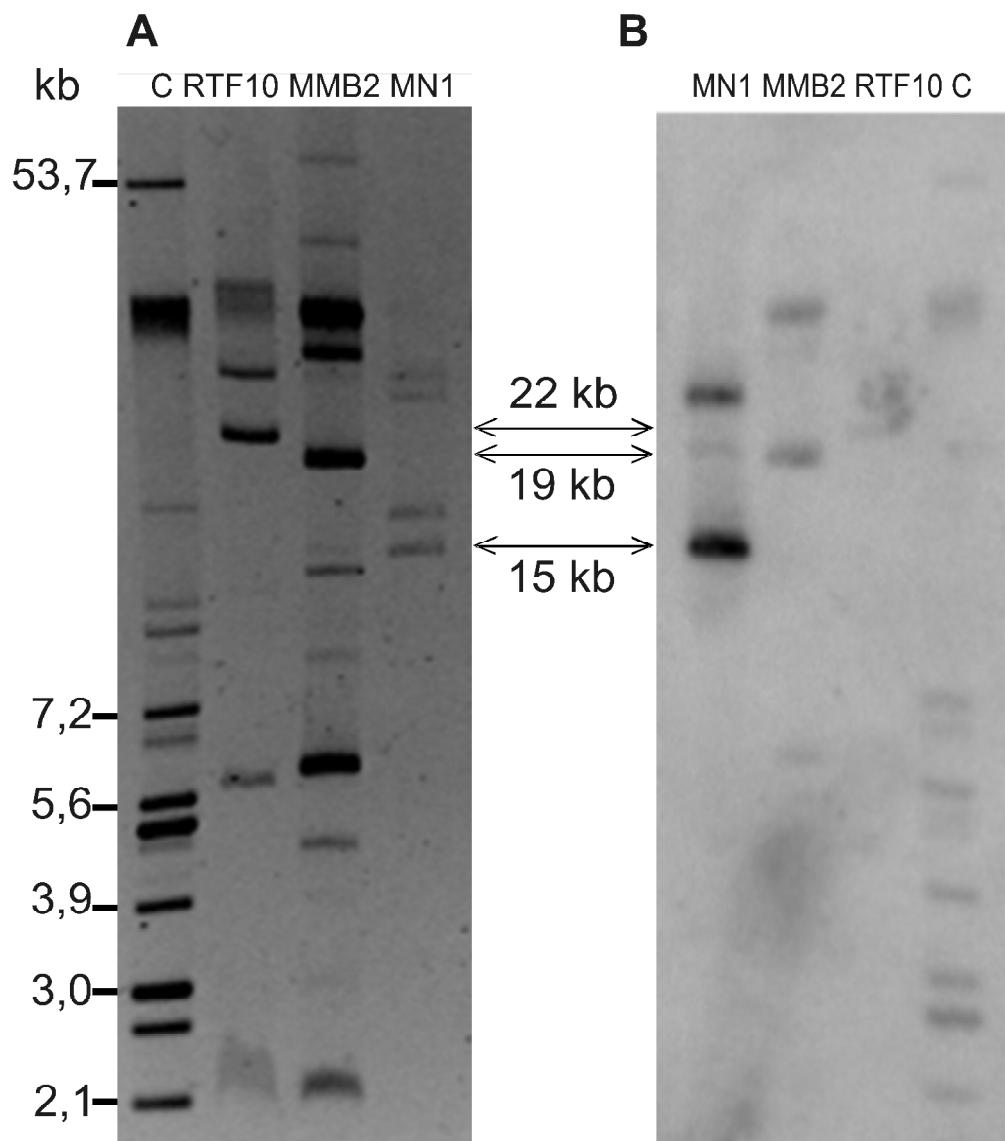


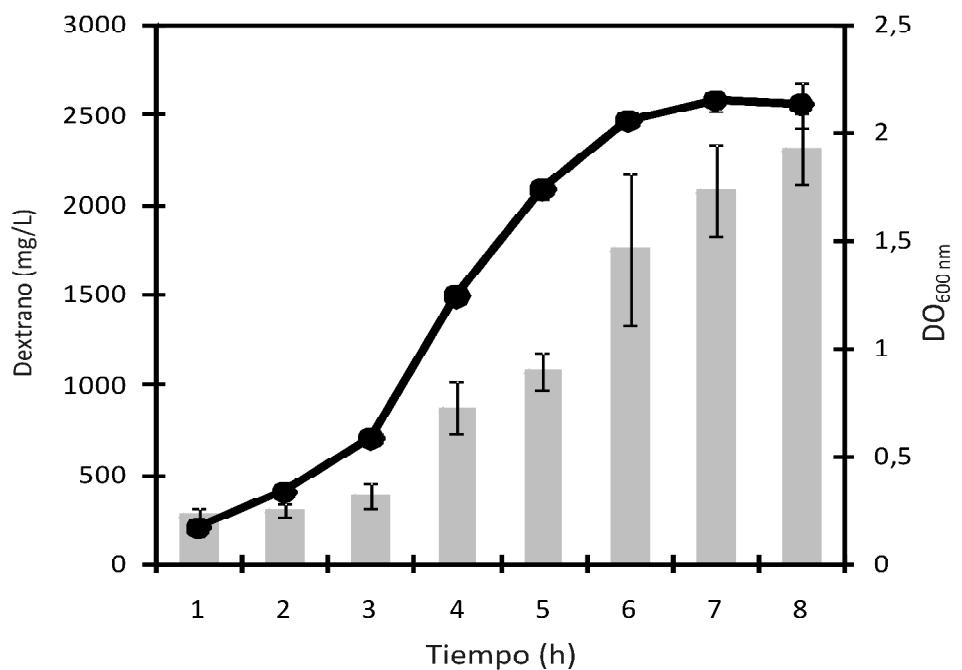
FIGURA 3

FIGURA 4

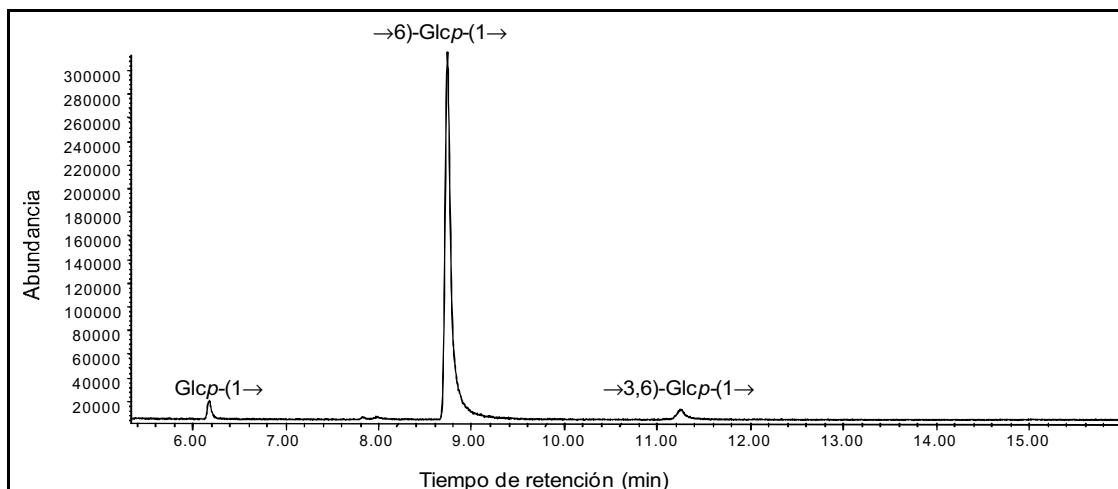
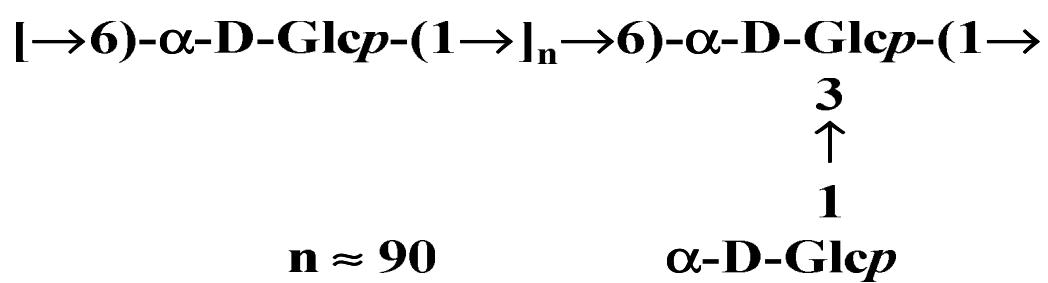
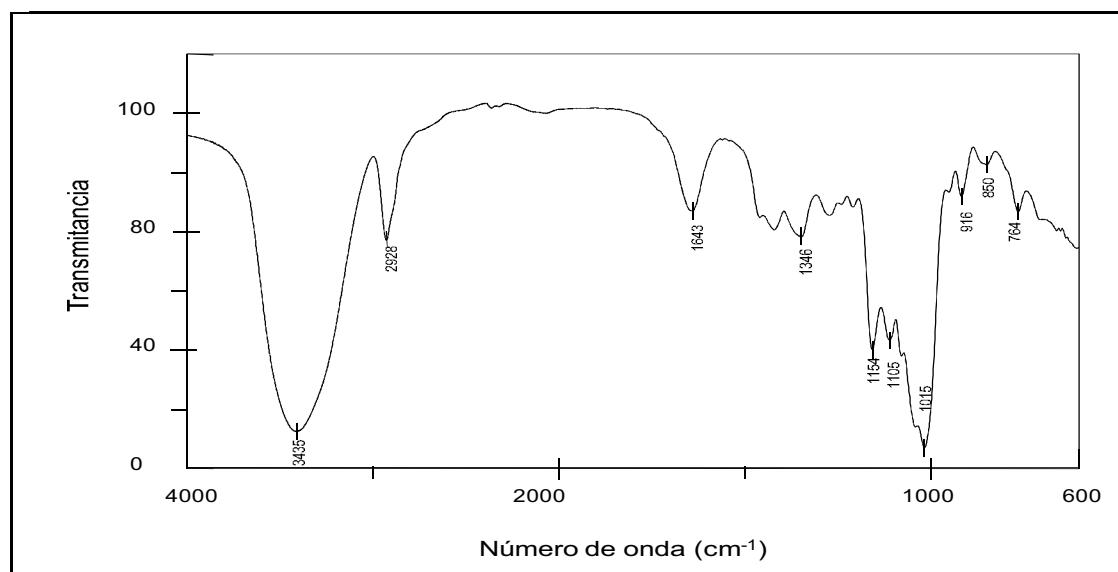
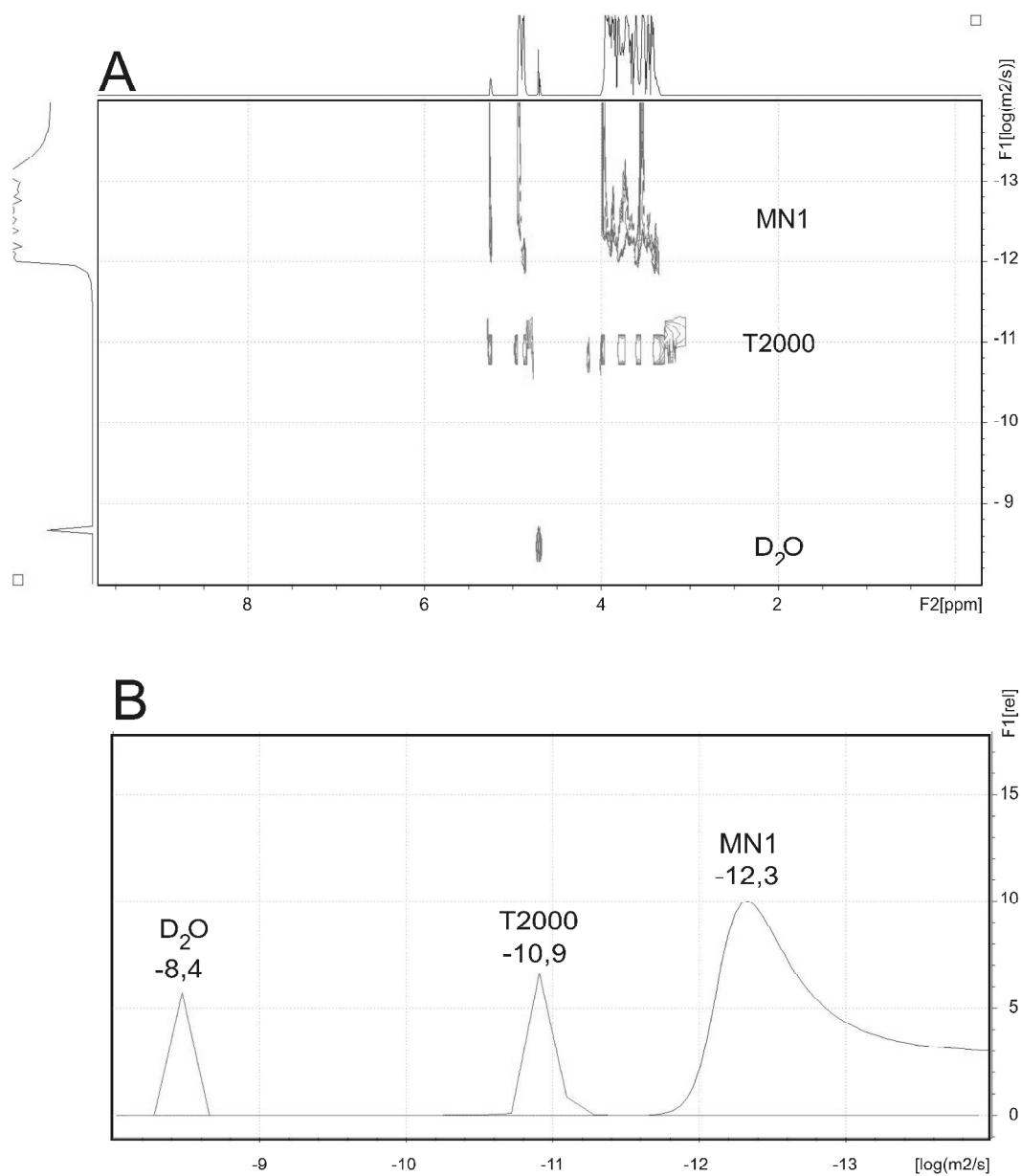
A**B****C**

FIGURA 5

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Universitat de Valencia

<120> 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

<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	tcatgttagc	gagttgcagc	ctacaatccg	60
aactgagaat	ggtttaaga	gattagctaa	acctcgccgt	ctcgcaactc	gttgtaccat	120
ccattgttagc	acgtgttag	cccaggcat	aaggggcatg	atgatttgac	gtcgccccca	180
ccttcctccg	gtttgtcacc	ggcagtcctca	ctagagtgcc	caactaaatg	ctggcaacta	240
gtaataaggg	ttgcgcgt	tgccggactt	aacccaacat	ctcacgacac	gagctgacga	300
caaccatgca	ccacctgtca	ctttgtcccc	gaagggaaag	ctctatct	agagtggtca	360
aaggatgtca	agacctggta	aggttttcg	cgttgcttcg	aattaaacca	catgctccac	420
cgcttgcg	ggcccccgtc	aattccttg	agtttcaacc	ttgcggcgt	actccccagg	480
cggagtgc	aatgcgttag	ctgcggcact	gaaggggcgg	aaccctccaa	cacctagcac	540
tcatcg	cgcatggac	taccaggta	tctaattctg	tttgc	atgcggat	600
gcctcagcgt	cagttacaga	ccagacagcc	gccttcgcca	ctgggttct	tccatata	660
tacgcatttc	accgctacac	atggagttcc	actgtcct	tctgcactca	agttcc	720
tttccatgc	acttcttcgg	ttgagccgaa	ggcttcaca	tcagactaa	gaaaccgcct	780
gcgtcg	tacgccaat	aatccggac	aacgcttgc	acctacgtat	taccgcgg	840
gctggcacgt	attagccgt	ggcttcgg	ttggataccg	tcactac	atcgttact	900
atcagataca	ttcttc	acaacagagt	tttacgatcc	gaaaac	ttcactc	960
cgccgttgc	ccatcagact	ttcgccatt	gtggaa	ccctact	gcctccgt	1020
ggagtctgg	ccgtgtctca	gtcccagtgt	ggccgattac	cctct	cggtatgca	1080
tcacggctt	ggtgagcctt	tacctcacca	actaactaat	gcaccgcgg	tccatc	1140
agtgatagcc	gaaaccatct	ttcaacccta	caccatgcgg	tgtaggtt	tatgcgtat	1200

ES 2 526 264 B1

tagcatctgt ttccaaatgt tatccccac tttagggcag gttaccacg tgttactcac ccgtccgcca ctcactcaa tgtttatcaa tcaggagcaa gctccttcaa tctaaacgag agtgcgttcg acttgcatgt atagc	1260 1320 1345
<210> 2 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial sequence	
<220> <223> Cebador sentido para la amplificación de una región del gen dsrLS de <i>Lactobacillus sakei</i> MN1	
<400> 2 gatgatggtc 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 <i>Lactobacillus sakei</i> MN1	
<400> 3 cttgaacgat atttgtggtgc caa	23
<210> 4 <211> 5304 <212> DNA <213> <i>Lactobacillus sakei</i> MN1	
<220> <223> Secuencia de nucleótidos del gen dsrLS de <i>Lactobacillus sakei</i> MN1	
<400> 4 atgttaagga ataattatTT tggagagact aaaacgcatt ataaattata taaatgcggT aagaactggg ctgtcatggg gatttcatta tttccgctgg gattagggat gctagttacc agccagccag tgtcagctga tgtgacagcc accagcacct caagcagtgc agtgaggacc gtatcaatca gtgaaagtag tagcagtgcA gcaaaggctg aaacgactag tgcaagttagt agcagtgcag tgaaggccga aacgactagt gcaagttagt gcagtgcagC aaaggctgaa acggctgcga tcactactgc aggtgttgca aatgctgatt cacaaacatc agcagaagta accgctgact ctacttctac cagccaagtG gtaactaata attccaataa tcaaataat acagcacAGC cagccggTca agaagcAGC ccggTatcg aggacacatc atctgtatgt agtgagagaa ctacaccaac agttgcaaAT aatgataAGC cagcaattGA ttcaGTTGAC acttcacaac ctgcaactgc agcgccAAA gcagacACTG atgtatcaac gctacaAGTA gatgcaactA cgaagaccGA ttcaGacata aaagaggata caccaacAGA taagacaACC gatacaaAGA ctgtgcaatt aaccactgtt gaaggaacGT ccaagcaAGT ggtaacgacG ccgaaggAAAG agagctcaac tgacaaatCT tcgtctgtgg tttctaaaca gacagacaAA acgtcttgc caaccgtAGC aacagcaACA gcgacgacAG tgtctaAGAT tccttcagTG	60 120 180 240 300 360 420 480 540 600 660 720 780 840

ES 2 526 264 B1

acaggtgatt accagttga cgaaaagacg aagacttata cgttcacagg taaagatgg 900
catccgtaa ctgggttgtt ttacgcgaat aatatcctgc aatacttga tgaaacgggt 960
catcaagtaa aaggtaata cgttacaatt gcaggtcatg tatattatcgacccagcc 1020
agcggcgctg cacaacagg tgttaatcaa atcgatggta agatggttgg gtttaaatct 1080
gatgggtcac aaattacgta aggttttct aatgataacg ccggaaatttc ttactactt 1140
gatgagtctg gaaccatggt gacagggcgg caaactattg ctggtaagac gtattactt 1200
gacaaagacg ggcacatctccg taaggggtat tccactatta ttgataatca attgtactat 1260
ttcgatttga aaacaggaga gtctgtttca acaacgacgt ccaatttcaa atctggctt 1320
acatcacaaa cgatgacac aacaccacat aatagtgcgg ttaatatgtc taaggatagt 1380
tttaccaccg ttgatggatt cttgacagct gagtcatggt atgtacctaa agatattcaa 1440
acatctgcga cgactggcg tgcataacg cctgaagatt tccgtccgat catgtact 1500
tggtggccaa cgaagcaaat tcaagcagcg tatttgaacc atatggtctc cgaaggattg 1560
ttgtcatcag ataagaagtt ctccgcaacg gatgatcaaa cgttgttcaa ccaagcagca 1620
cacgcgggatc aattgcaaat tgaattgaag attcaacaga caaagtctgt tgaatggttg 1680
cgaacaacga tgcacaattt cattaagtca caaccaggat acaatgttac tagtcaaacg 1740
ccaagtaacg accacccatca aggtggcgca ttaagctaca ttaacagtgt tttgacgcct 1800
gatgcgaact caaatttccg tttgatgaac cgtaatccaa cacaacaaga tggtagcgcgt 1860
cattacaaca ctgatacatc tgagggtgga tatgagttgc tgtagccaa tgacgtggat 1920
aattctaacc cagttgttca agcagaacaa ttgaactggt tgtacttctt gacgcatttc 1980
ggtaatttgcgta tccgtcagct aactttgata gtgttagagt ggatgcggta 2040
gacaacgtgg atgccgacct gctaaacatt acagccgctt attttagaga tgtgtatggc 2100
gtcgataaaaa acgatttgac agctaataa catttgtcta ttttggaaaga ttggggccac 2160
aatgaccat tatatgtcaa ggaccacggt agtgcgttgc tgacgtggta tgattacatg 2220
catacccaat tgatttggtc attaacaaaa aatccagata atcgtagtgc gatgcgcacg 2280
tttatggagt attatttggt cgaccgtgct aaggacaata cgtctgtatca ggcaattcct 2340
aattacagct ttgtccgtgc acacgatagt gaagttcaaa cggttatcgg tgatattgtt 2400
gcgaagttgt atccggatgt taaaaattca ttggcgccat ctatggaaaca attggcggca 2460
gcctttaagg tatatgtgc ggatgttgc tctgttataa agaagtatac gcaataac 2520
atgccagcag cgtatgccat gttactaacg aataaagaca caattccacg tggttactat 2580
ggtgatgttgc atacggatgt tggtcaatat atggcaacta agtcaccata ttacgtatgc 2640
atctcagcgt tggtgaaagc ccgttataag tatgtggctg gtggacaaac catggctgt 2700
gataaacacg atatcttaac atcagttcgc tttgggtatcg ggatcatgaa tgcatctgt 2760
aagggttagca cgacggcccg taccaagga attggcgtga ttgtcagcaa taatgtatgc 2820
tttagcgttgc agggagacac tgtgaccctt catatgggtatcg tgcgtcacgc caaccaggca 2880
taccgtgttgc ttgtgttgc gacgacatgttgc aatacacttcgca cgataatggc 2940

ES 2 526 264 B1

gcgccaattc gctatacgga tgcaaatggt gacttgattt tcactagcgc agacattaag	3000
ggataccaaa acgttgaggt atccggattc ttgtcagtgt gggtaccagt cggtgcatcc	3060
gacacacagg atgcgcgc aacagggtct agcgctgcaa acaaaactgg tgacacccta	3120
cattcaaatg cagcattgga ctcaaatgtg atttatgaag gttttctaa tttccaagag	3180
atgccaacaa cccacgatga gtttacaaac gtaaagatcg ctcaaatgc tgatttgtt	3240
aagtcatggg gtgtgacaag tttccaacctt gcaccacaat atcgttcaag tgatgacaca	3300
tcattttgg attctattat taagaatgga tatgcgttta cagaccgcta tgacttggc	3360
ttaatacgc caacaaagta cggagacgtt gacgacctag cagatgcaat tagagcaatg	3420
cacagtgtt gtattcaggt catggctgac tttgtccctg accaaattta taatttgcca	3480
ggtcaagaag tagttgctgt taatcgtaact aataactttt gtacaccaaa ccaggattca	3540
gatctacaaa accagttgta ttttacaaat tcaaagggtg gcgggtgaata ccaagctaag	3600
tatggtggtg agttcttggta tctttgcgt ctggAACACC ctgatttgtt tacaacaaat	3660
cagatttcga ctgggttacc aatcgatggg tccacgaaga ttaaagaatg gtctgaaag	3720
tacttcaatg gttctgacat ccaaggtaag ggcgttgcattt acgtattgaa ggatggtgca	3780
tctcaagaat atttcaagat tacgtctaattt gcaacgttgc agtccttctt gccaaaacaa	3840
tttatgaatc aagatgccat gactgggttc accacagatg aaaagggcac aacttattat	3900
tcaacaagt gttaccaagc taaacagtgc tttatccaag gtgtatgtt gcaatattat	3960
tactttgttgc cagacggata catgggttacc ggctcacaatccatataatgg taagcaatat	4020
tacttcttgc caaatggcgt tgagttttaaa gaagcattttt tacaaaatgc atctggtaac	4080
acggtttattt atggcaagac tggctcagca gtttgttgcattt aatatgttagt cgatcaaagc	4140
ggtgtggctt attacttga tgtaaacggg aatatggcgtt cagatcgatgatgattttttt	4200
gatggacaca cgaatattttt ctttgcgggt gggtcacaag ctaaggacca atttttgatt	4260
gggtcagatg gtaacttacg ttacttttgcattt caaggttagt gtaatatggt tacaaaatgc	4320
tttgcagtaa accgaaacgg ggattgggttcaatttttgcattt gtcgttgcattt cgcgttgcattt	4380
ggttggcaaa caattgttgcattt ttctttgttgcattt ctgttgcattt gtcgttgcattt tcaagtcaag	4440
gctgccgctg acaaggctgc tgctgacaag gctgccgctg aacaaggccgc tgctgacaag	4500
gccgctgctg acaaggctgc tgctgacaag gctgccgctg acaaggctgc tgctgacaag	4560
gctgccgctg aacaaggctgc tgctgacaag gctgccgctg acaaggctgc tgctgacaag	4620
gctgccgctg acaaggctgc tgctgacaag gctgccgctg acaaggctgc tgctgacaag	4680
gctgccgctg acaaggctgc tgctgacaag gctgccgctg acaaggctgc tgctgacaag	4740
gccgctactg acaaggccgc tgctgacaag gctgccgctg aacaaggctgc tgctgacaag	4800
gctgctgctg acaaggctgc tgctgacaag gctgccgctg aacaaggctgc tgctgacaag	4860
gctgccgctg aacaaggctgc tgctgacaag gctgccgctg aacaaggctgc tgctgacaag	4920
gctgccgctg aacaaggccgc tgctgacaag gctgccgctg aacaaggctgc tgctgacaag	4980
gtatgttgcattt ctgttgcattt gtcgttgcattt tcaagtcaag aactcaagctt	5040

ES 2 526 264 B1

atcaatgatg cccaagcaac tggtatcact gatattgata accagcatgt tcctggtaact 5100
 tctgttgcata atcaaaagca agctgagaag gtaactgaag atatcaagaa tgatccagat 5160
 aataagactt tgcctgaagc tatacgatcca aataacgg gcgttgataa gacagaaagt 5220
 attactatta ccggtgttagt tatgctaatac ctcactacta tttttggct gttgtttaca 5280
 agtaaaaaagc ataaaaaaaga tttag 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									10						15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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
225 230 235 240

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

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 acctcttta taaacctctt ttaaacctct tttagacccc tcttgaggct

60

11

ES 2 526 264 B1

tactctccca	aggcttatag	aagtttatcg	actacatTTT	gtctgtttat	cgactacatt	120
ttgtctgttt	atcgactaca	ttttgtctgt	ttatcgacta	cattttgtct	gtttatcgac	180
tacacttatt	tacttctgtta	ttcaaataaa	gtagtattat	tcaaggaggt	tatTTtatga	240
gcaatgaatt	agttaaatat	gatccagaac	tgaatacaat	tcctctgaga	agatTTactc	300
ctgttagaaaat	gaatctttc	tttccggttg	tttctagaat	gcgcgataaa	ggtgatgata	360
ctgttcggTT	tacTTTgtat	cagtAAAAG	aattaagcgc	gtataagccg	accgcaaata	420
atcgatttat	tgatgacata	caaagtacat	atcaaaaaat	attaggtctt	agatTTggct	480
ctagaagtaa	agatggactt	gatagagaaa	tgtttgtcat	gtttactcga	tttgaatca	540
agggttcggc	agaagtccct	tatgttgata	ttcaaattta	ccccaggca	ttgaaacttc	600
taaataatct	tgaaagctgg	gttcgatATG	ctttagcaga	gttcagagat	ttaaagagta	660
gttatgcaaa	aacgatgttt	cgtccCTTA	aacaatttcg	aactactggt	tatgcttatt	720
tttctaaaag	tgatTTTTT	gaattacttg	atattccgca	aagctattgg	aataaacctg	780
caaacgttga	atccagagtt	attcagccaa	ttaaagaaga	actaactcct	ctttcaggg	840
gtctagctat	tagaaaaaaa	tatggtaaag	gccgtggcaa	gccggTTATT	gttactcat	900
ttacctggaa	atcagaaaaa	aagaacgcag	acgacttctc	acaaggtaa	tttcaagatg	960
aacgtcaaaa	actcttaac	attcagcata	atggtgaatt	aacagagcag	gaaaaatggc	1020
gtgccattga	caaagttaag	gggttgactt	taggctccac	tgagaaacaa	gcattggctg	1080
agaaacaAGC	ggaacacgat	aaaaaaataa	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 Lys Asp Gly Leu Asp Arg Glu Met Phe Val Met Phe
85 90 95

Thr Arg Phe Glu Ile Lys Gly Ser Ala Glu Val Pro Tyr Val Asp Ile
100 105 110

Gln Ile Tyr Pro Lys Ala Leu Lys Leu Leu Asn Asn Leu Glu Ser Trp
115 120 125

Val Arg Tyr Ala Leu Ala Glu Phe Arg Asp Leu Lys Ser Ser Tyr Ala
130 135 140

Lys Thr Met Phe Arg Leu Leu Lys Gln Phe Arg Thr Thr Gly Tyr Ala
145 150 155 160

Tyr Phe Ser Lys Ser Asp Phe Phe Glu Leu Leu Asp Ile Pro Gln Ser
165 170 175

Tyr Trp Asn Lys Pro Ala Asn Val Glu Ser Arg Val Ile Gln Pro Ile
180 185 190

Lys Glu Glu Leu Thr Pro Leu Phe Arg Gly Leu Ala Ile Arg Lys Lys
195 200 205

Tyr Gly Lys Gly Arg Gly Lys Pro Val Ile Gly Tyr Ser Phe Thr Trp
210 215 220

Lys Ser Glu Lys Lys Asn Ala Asp Asp Phe Ser Gln Gly Gln Phe Gln
225 230 235 240

Asp Glu Arg Gln Lys Leu Phe Asn Ile Gln His Asn Gly Glu Leu Thr
245 250 255

Glu Gln Glu Lys Trp Arg Ala Ile Asp Lys Val Lys Gly Leu Thr Leu
260 265 270

Gly Ser Thr Glu Lys Gln Ala Leu Ala Glu Lys Gln Ala Glu His Asp
275 280 285

Lys Lys Ile Arg Asp Gln Ala Arg Lys Glu Ala Leu Ala Glu Leu Arg
290 295 300

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