

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 094**

51 Int. Cl.:

C12P 19/04

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2006** **E 11185331 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015** **EP 2522739**

54 Título: **Gomas diutan de alta viscosidad y métodos para producirlas**

30 Prioridad:

01.11.2005 US 264268

01.11.2005 US 264279

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.05.2015

73 Titular/es:

CP KELCO US, INC. (100.0%)
3100 Cumberland Boulevard Suite 600
Atlanta, GA 30339, US

72 Inventor/es:

PATEL, YAMINI;
COLEMAN, RUSSEL;
MATZKE, STEVEN y
HARDING, NANCY

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 397 094 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Gomas diutan de alta viscosidad y métodos para producirlas

Campo de la invención

En la presente invención se describe la producción de un polisacárido diutan que presenta unas propiedades de viscosidad aumentada en comparación con el polisacárido previamente producido del mismo tipo de unidades repetitivas. Dicho polisacárido diutan mejorado se produce por medio de la generación de un derivado de *Sphingomonas* sp. ATCC 53159 que contiene un plásmido multicopia de amplia variedad de huéspedes en el que se han clonado genes para la biosíntesis de polisacárido diutan. El plásmido proporciona a la cepa huésped de *Sphingomonas* la capacidad para producir múltiples copias de genes para dicha síntesis de polisacárido. De este modo, se proporciona un método no sólo para la producción aumentada del polisacárido diutan objetivo sino también para la producción de un polisacárido diutan con propiedades físicas mejoradas (con la mayor viscosidad anteriormente mencionada). Dicho polisacárido diutan ha demostrado ser particularmente útil como un posible agente modificador de la viscosidad en aplicaciones de yacimientos petrolíferos y en materiales adhesivos. Esta invención también abarca los métodos de la invención para la producción de dicho polisacárido diutan mejorado, así como los nuevos genes clonados requeridos para producir el diutan mejorado mediante dicho método. Además, esta invención también abarca la nueva cepa de *Sphingomonas* modificada que incluye la secuencia de DNA necesaria.

Antecedentes de la invención

Los polisacáridos o gomas se emplean principalmente para espesar o gelificar disoluciones acuosas y se clasifican frecuentemente en dos grupos: agentes espesativos y agentes gelificantes. Los agentes espesativos típicos incluyen almidones, goma xantana, goma diutan, goma welan, goma guar, carboximetilcelulosa, alginato, metilcelulosa, goma karaya y goma tragacanto. Los agentes gelificantes comunes incluyen gelatina, goma gellan, almidón, alginato, pectina, carragenano, agar y metilcelulosa.

Algunos polisacáridos, o dicho más particularmente, algunas biogomas, tales como xantana, gellan, welan y diutan, se han producido durante muchos años a través de la fermentación por microbios. Dichas biogomas presentan unas características variadas, tales como capacidades para modificación de la viscosidad, que han permitido su utilización en muchas aplicaciones diferentes. Incluidos en dicha lista están los agentes gelificantes para alimentos, tales como gelatinas de confitería, mermeladas y jaleas, geles para postres, glaseados y productos lácteos, así como componentes de medios microbiológicos. Además, los agentes espesativos se utilizan para innumerables aplicaciones de uso último, para modificar la viscosidad de líquidos objetivo. Es particularmente interesante la capacidad de dichas gomas para impartir una modificación de la viscosidad a líquidos de petróleo subterráneos y/o submarinos con objeto de facilitar su recogida, aunque existen muchos otros posibles usos últimos diferentes (incluyendo la producción de adhesivos como un ejemplo). Se han producido diferentes biogomas a partir de diferentes fuentes bacterianas, tal como goma xantana a partir de *Xanthomonas campestris*, goma gellan a partir de *Sphingomonas elodea*, goma welan a partir de *Sphingomonas* sp. ATCC 31555, y goma diutan (S-657) a partir de *Sphingomonas* sp. ATCC 53159. Se han emprendido modificaciones genéticas de dichas cepas en el pasado para efectuar cambios significativos en los resultantes materiales de goma producidos a través de los susodichos procedimientos de fermentación. Dichas modificaciones han permitido cambios tales como la eliminación de grupos acilo para crear materiales de goma diferentes que presentan propiedades físicas diferentes. En general, dichas modificaciones genéticas han sido del tipo de o bien alterar la composición de la biogoma objetivo básicamente a través de una expresión génica alterada en el organismo huésped, o bien aumentar la producción de la biogoma objetivo por medio de la introducción de un plásmido que sólo presenta multiplicación génica (tal como en las Patentes de EE.UU. números 5.854.034, 5.985.623 y 6.284.516 concedidas a Pollock et al., y en la Patente de EE.UU. nº 6.709.845 concedida sólo a Pollock).

La goma diutan (también conocida como heteropolisacárido S-657) se prepara mediante fermentación por la cepa *Sphingomonas* sp. ATCC 53159 y presenta propiedades espesativas, suspendedoras y estabilizantes en disoluciones acuosas. El diutan presenta generalmente una unidad de repetición hexámera que consiste en cuatro azúcares en la cadena principal (glucosa-ácido glucurónico-glucosa-ramnosa) y una cadena lateral de dos restos de ramnosa fijados a uno de los restos de glucosa. En un artículo de T. A. Chowdhury, B. Lindberg, U. Lindquist y J. Baird, Carbohydrate Research 164 (1987), 117-122, se pueden hallar detalles de la estructura de la goma diutan. Diltz et al., Carbohydrate Research 331 (2001), 265-270, mostraron que el diutan tiene dos sustituyentes acetilo por unidad de repetición. Estas dos referencias se incorporan a esta memoria por referencia en su totalidad. En la Patente de EE.UU. nº 5.175.278, que se incorpora a esta memoria por referencia en su totalidad, se pueden hallar detalles sobre la preparación de la goma diutan. Se puede producir diutan a partir de la cepa de *Sphingomonas* utilizando técnicas de fermentación estándares, tales como mediante el uso de fuentes de carbohidratos (glucosa, maltosa y similares, como ejemplos no restrictivos), una fuente de nitrógeno y sales adicionales.

Las características físicas impartidas por dicha biogoma diutan en su forma de tipo silvestre son deseadas por

ciertas industrias, particularmente en términos de sus propiedades de modificación de la viscosidad y/o sus características de retención de agua. Desafortunadamente, se ha demostrado que el diutan es difícil de producir de forma económicamente eficaz. Además, dichos problemas de costes inciden negativamente en la utilización generalizada del diutan en la actualidad ya que el grado de viscosidad presentado por dicha biogoma es insuficiente para reemplazar a otras biogomas menos caras pero eficaces (tal como la goma xantana, como un ejemplo). De este modo, ha sido una necesidad arraigada el proporcionar un método para producir como poco dicho diutan eficaz a menor coste y/o proporcionar una manera de producir una biogoma del tipo diutan que también presente una mejora significativa en las propiedades físicas. Hasta la fecha, la única mención a la producción de los tipos de esfinganos relacionados (específicamente sin ninguna demostración relativa al diutan) es en términos de mayor producción (en las patentes de Pollock et al. anteriormente mencionadas). No ha habido ninguna discusión ni sugerencia razonable sobre algún modo de proporcionar un método para producir una goma diutan mejorada de mayor peso molecular que presente alguna mejora en las medidas de viscosidad a través de dicho método de producción.

Breve descripción de la invención

Se ha llegado ahora a la conclusión de que la multiplicación de ciertas nuevas secuencias de DNA aisladas para la biosíntesis de diutan en un organismo huésped de *Sphingomonas* no sólo permite una producción aumentada de goma diutan por dicho organismo sino también produce una goma diutan que presenta unas propiedades de viscosidad aumentada. Dicha nueva secuencia de DNA (que se introduce en un organismo huésped por medio de cualquier método bien conocido, tal como, sin limitación, mediante un plásmido) proporciona así los deseados resultados que se han buscado para los métodos de síntesis de diutan. Una clara ventaja de dicha utilización de estos genes multiplicados en un plásmido es la naturaleza relativamente simple de la incorporación de dicha secuencia de DNA aislada a procedimientos para la síntesis de diutan. Otra ventaja es la capacidad para producir dichas propiedades de viscosidad superiores en la goma diutan objetivo mientras, si es necesario, se aumenta potencialmente la eficacia de la producción por fermentación.

En consecuencia, esta invención incluye una goma diutan que presenta una mejora en diversas medidas de viscosidad diferentes. Entre éstas están: i) una viscosidad intrínseca superior a 150, preferiblemente superior a 155, más preferiblemente superior a 160 dl/g; ii) una viscosidad a 3 rpm en agua marina superior a 35, preferiblemente superior a 37, más preferiblemente superior a 40, y lo más preferiblemente superior a 42 en la lectura en el dial; iii) una viscosidad a 0,3 rpm en agua marina superior a 35.000, preferiblemente superior a 39.000, más preferiblemente superior a 40.000, y lo más preferiblemente superior a 41.000 centipoises (cP); y iv) una viscosidad de bajo índice de cizalladura en PEG superior a 3500, preferiblemente superior a 3700, más preferiblemente superior a 3900, y lo más preferiblemente superior a 4000 cP. Además, esta invención abarca un método para producir dicha goma diutan, como se define en cualquiera de los términos anteriores, por medio de la introducción de un grupo específico de genes en un organismo huésped de *Sphingomonas* y la permisón de la fermentación de dicho organismo para que produzca una goma diutan resultante. Además, esta invención abarca las secuencias de DNA específicas y cualquier vector (tal como un plásmido) que proporcione múltiples copias de los genes o una expresión aumentada de los genes mediante el uso de un promotor más potente, y similares. Además, también queda abarcada la cepa genéticamente modificada de *Sphingomonas* que contiene múltiples copias de los genes biosintéticos de diutan definidos por dichas secuencias de DNA aisladas únicas.

Se ha hallado que dicha secuencia de DNA aislada única requiere al menos una enzima biosintética de diutan que es una DpsG polimerasa. En otra posible realización, dicha enzima biosintética de diutan incluirá una DpsG polimerasa y una glucosa-1-fosfato timidililtransferasa; una dTDP-6-desoxi-D-glucosa-3,5-epimerasa; una dTDP-D-glucosa-4,6-deshidratasa; y una dTDP-6-desoxi-L-manosa-deshidrogenasa. En aún otra realización posible, dicha enzima biosintética de diutan incluirá una dpsG polimerasa y una ramnosil transferasa IV; una beta-1,4-glucuronosil transferasa II; una glucosil isoprenilfosfato transferasa I; y una glucosil transferasa III. En aún otra realización posible, dicha enzima biosintética de diutan comprende una dpsG polimerasa y las proteínas dpsD, dpsC y dpsE para exportación de polisacáridos. En aún otra realización posible, dicha enzima biosintética de diutan incluirá una ramnosil transferasa IV; una beta-1,4-glucuronosil transferasa II; una glucosil isoprenilfosfato transferasa I; una glucosil transferasa III; una glucosa-1-fosfato timidililtransferasa; una dTDP-6-desoxi-D-glucosa-3,5-epimerasa; una dTDP-D-glucosa-4,6-deshidratasa; y una dTDP-6-desoxi-L-manosa-deshidrogenasa. En general, la enzima biosintética de diutan del método de la invención y dentro del producto de la invención puede ser seleccionada del grupo que consiste en polimerasa; liasa; ramnosil transferasa IV; beta-1,4-glucuronosil transferasa II; glucosil transferasa III; proteína para exportación de polisacáridos; proteína de secreción; glucosil-isoprenilfosfato transferasa I; glucosa-1-fosfato timidililtransferasa; dTDP-6-desoxi-D-glucosa-3,5-epimerasa; dTDP-D-glucosa-4,6-deshidratasa; dTDP-6-desoxi-L-manosa-deshidrogenasa y combinaciones de las mismas. Además, esta invención abarca una molécula de ácido nucleico aislada (además del DNA que puede estar presente en el cromosoma objetivo) que codifica al menos una enzima biosintética de diutan como la mostrada en las ID. SEC. números: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 y 43, o una enzima que tiene una identidad de al menos 95% con respecto a las ID. SEC. números: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 y 43.

Por lo tanto, el método de la invención (así como los productos preparados mediante él) conciernen a gomas de esfingano, particularmente de los tipos diutan, incluyendo, sin limitación, S88, S60 y S657.

Como se indicó anteriormente, la presente invención es la culminación del desarrollo y la conclusión de que secuencias de DNA específicas que se introducen en copias múltiples dentro de ciertas cepas de *Sphingomonas* pueden proporcionar una producción biosintética aumentada de un polisacárido diutan de alta viscosidad. Las bacterias modificadas que contienen dichos genes para producción aumentada producen cantidades significativamente mayores de polisacárido diutan en comparación con las bacterias no modificadas y crean las susodichas propiedades de alta viscosidad resultantes.

Las secuencias de DNA que se introducen en el organismo huésped (en cualquier forma bien conocida, tal como, de nuevo como un ejemplo no restrictivo, un plásmido) para generar la producción aumentada y las propiedades de viscosidad aumentada anteriormente mencionadas (aunque lo que se cree, sin dependencia de ninguna teoría científica específica, es un aumento de las propiedades del intervalo de pesos moleculares) de acuerdo con la presente invención pueden ser aisladas, recuperadas y clonadas mediante técnicas que son fácilmente asequibles en este campo técnico. Más adelante, el DNA es suministrado a bacterias del género *Sphingomonas* en múltiples copias (por medio de un plásmido, o de otro modo conocido) o con una expresión aumentada de los genes por medio de, por ejemplo, un adecuado promotor más potente. Después de la inserción en las bacterias objetivo, se puede determinar la producción de diutan haciendo que las bacterias modificadas fermenten y comparando la producción en términos de cantidad producida y calidad producida. Se pueden determinar tanto la producción aumentada como los aumentos de viscosidad comparando la producción de diutan mediante el método de la invención, con la producción por la cepa productora de diutan de tipo silvestre (ATCC 53159).

Descripción detallada de la invención

Los términos y expresiones siguientes se utilizarán a lo largo de la memoria descriptiva en relación con la presente invención y tienen los significados indicados:

El término "*Sphingomonas*" se emplea a lo largo de la memoria descriptiva para referirse a cepas de bacterias Gram negativas del género *Sphingomonas*.

La expresión "productor aumentado" o "producción aumentada" se emplea a lo largo de la memoria descriptiva para describir bacterias modificadas que contienen múltiples copias de secuencias de DNA aisladas de la misma cepa que producen un polisacárido diutan significativamente mayor (al menos aproximadamente un 5% mayor sobre una base de peso por peso) en comparación con bacterias de tipo silvestre de la misma cepa.

El término "aislado" se emplea para describir un DNA que ha sido separado de un microorganismo y ha sido sometido a al menos cierto grado de purificación, es decir, a una o más operaciones de purificación, y que puede ser escindido o cortado por enzimas de restricción, clonado en múltiples copias o insertado en vectores plasmídicos o, en cualquier caso, insertado en, o incorporado a, bacterias.

El término "secuencia" se emplea para describir un segmento específico de DNA que es identificado por sus unidades nucleotídicas. El término "insertado" se emplea a lo largo de la memoria descriptiva para describir el proceso y el resultado de transferir segmentos de DNA aislados del DNA cromosómico de una cepa de *Sphingomonas* productora de diutan, a la cepa de *Sphingomonas* (por medio de un plásmido, como un ejemplo no restrictivo). Dicho DNA aislado puede ser primero introducido, de nuevo como una posibilidad no restrictiva, en el plásmido deseado (aquí pLAFR3) mediante técnicas bien conocidas en este campo técnico y ser luego transferido, por ejemplo, por conjugación o movilización, a una bacteria *Sphingomonas* receptora. Después de la inserción en una bacteria *Sphingomonas* receptora, el plásmido que contiene la secuencia de DNA relevante se replicará en la célula receptora para proporcionar varias copias (al menos dos y normalmente 4-10) del segmento de DNA necesario para la producción aumentada del polisacárido diutan de alta viscosidad (de nuevo se cree que es por un amplio intervalo de pesos moleculares). El uso de conjugación o movilización para transferir los vectores plasmídicos a bacterias receptoras es generalmente eficaz. También se puede emplear la electroporación o transformación química de células competentes con DNA purificado. Se pueden utilizar otros vectores o bacteriófagos para transferir DNA a la célula huésped. No es necesario el mantenimiento de los segmentos de DNA sobre plásmidos (u otros vectores de distribución bien conocidos) en la bacteria *Sphingomonas* receptora que produce diutan. Es rutinario el introducir copias adicionales de un segmento de DNA en el cromosoma bacteriano para que los segmentos se repliquen en cada generación por el mismo mecanismo por el que se replica el DNA bacteriano. Alternativamente, se puede alcanzar una expresión aumentada de los genes utilizando elementos promotores más potentes.

La expresión "multiplicación génica" se emplea para referirse o bien a copias aumentadas de genes, por ejemplo, por clonación de los genes objetivo sobre un plásmido multicopia (tal como de 4 a 10 copias) o por inserción de múltiples copias (tal como de 4 a 10) de los genes en el genoma bacteriano, o bien, alternativamente, a una expresión aumentada de genes por modificación de elementos promotores para aumentar la expresión génica. Estos dos métodos y otros pueden dar lugar a cantidades aumentadas de las proteínas codificadas.

El término "biosíntesis" se emplea a lo largo de la memoria descriptiva para describir la producción o síntesis biológica de diutan por bacterias del género *Sphingomonas*. El polisacárido diutan se sintetiza a partir de unidades de carbohidrato individuales en una serie de operaciones controladas por un gran número de enzimas de las bacterias.

- 5 La secuencia de DNA relevante que se incorpora a las bacterias receptoras en cualquier forma seleccionada (tal como, de nuevo preferiblemente, aunque no necesariamente, en forma de plásmido) codifica información genética de la que se sabe que es beneficiosa o esencial para la biosíntesis de un polisacárido diutan de producción aumentada y peso molecular aumentado. Sin embargo, se cree además que la secuencia de DNA particular del invento (tal como dentro de un plásmido pS8), sin dependencia de ninguna teoría científica específica, induce no sólo una producción aumentada sino también un aumento en el número de unidades repetitivas polimerizadas dentro de los polímeros individuales del propio diutan. Como resultado, se cree que dicho aumento de unidades repetitivas produce las resultantes propiedades de alta viscosidad sorprendentemente proporcionadas por la goma diutan. A causa de los aumentos medidos de la viscosidad intrínseca, que está relacionada con el peso molecular por una relación en forma de ley de potencias, se ha propuesto la hipótesis de un aumento del peso molecular. Se sabe de este modo que, para un polímero lineal (como la goma diutan), la viscosidad intrínseca es esencialmente proporcional al peso molecular en lo que a eso se refiere.

- 20 El aislamiento de las secuencias de DNA relevantes que son la base de este método de la invención y que generan el polisacárido diutan de viscosidad aumentada se lleva a cabo por medio de técnicas y métodos estándares. Dichas secuencias pueden ser así generadas a partir de una cepa de *Sphingomonas* productora de diutan que ha sido cultivada utilizando procedimientos estándares. La extracción del DNA puede ser llevada luego a cabo, por ejemplo, por medio de una centrifugación y una resuspensión iniciales de las células bacterianas y luego mediante la subsiguiente elución del DNA a través de columnas de purificación. Una vez que se ha completado la purificación, el DNA aislado puede ser digerido con endonucleasas de restricción y ser clonado en el plásmido u otro vector de distribución deseado y ser posteriormente transferido a una cepa receptora. Se pueden emplear sin limitación otras técnicas como las conocidas en este campo técnico.

- 30 La clonación de DNA en la presente invención se basa en técnicas y métodos generales que han llegado a ser estándares en este campo técnico. Se advierte que se puede emplear cualquier número de métodos para clonar los segmentos de DNA de acuerdo con la presente invención y que la presente invención no se limita, por ejemplo, al uso de vectores de clonación plasmídicos. Por ejemplo, los fragmentos de DNA pueden ser clonados por inserción en un vector de bacteriófago.

- 35 Las secuencias de DNA clonadas pueden ser luego introducidas en una cepa de *Sphingomonas* por medio de un plásmido u otro vector de distribución. La cepa de *Sphingomonas* genéticamente modificada puede ser luego utilizada para producir diutan por fermentación. Básicamente, un medio adecuado para la fermentación es un medio acuoso que contiene generalmente una fuente de carbono tal como, por ejemplo, carbohidratos que incluyen glucosa, lactosa, sacarosa, maltosa y maltodextrinas, una fuente de nitrógeno tal como, por ejemplo, amonio inorgánico, nitrato inorgánico, aminoácidos orgánicos o materiales proteicos tales como levadura, harina de soja o caseína hidrolizadas, restos solubles de destilación o concentrado de productos solubles de maíz, y sales inorgánicas. Una gran variedad de medios de fermentación sustentarán la producción de diutanes según la presente invención.

- 40 Se pueden incluir carbohidratos en el caldo de fermentación en cantidades variables, pero normalmente de entre aproximadamente el 1% y el 10% en peso (preferiblemente el 2-8%) del medio de fermentación. Los carbohidratos se pueden añadir antes de la fermentación o, alternativamente, durante la fermentación. La cantidad de nitrógeno puede variar de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 0,4% en peso del medio acuoso. Se puede emplear una sola fuente de carbono o fuente de nitrógeno, así como mezclas de estas fuentes. Entre las sales inorgánicas que resultan útiles en la fermentación de las bacterias del género *Sphingomonas* están sales que contienen sodio, potasio, amonio, nitrato, calcio, fosfato, sulfato, cloruro, carbonato e iones similares. También se pueden incluir ventajosamente oligoelementos metálicos tales como magnesio, manganeso, cobalto, hierro, zinc, cobre y molibdeno, yoduro y borato.

- 50 La fermentación puede ser llevada a cabo a temperaturas de entre aproximadamente 25 °C y 40 °C, siendo preferido el intervalo de temperaturas de entre aproximadamente 27 °C y 35 °C. El inóculo puede ser preparado mediante métodos estándares de aumento volumétrico a escala, incluyendo los cultivos en matraces sacudidos y la fermentación agitada y sumergida a pequeña escala. El medio para preparar el inóculo puede ser el mismo que el medio de producción o puede ser cualquiera de diversos medios estándares bien conocidos en la técnica, tal como el caldo Luria o el medio YM. Se puede emplear más de una fase de siembra para obtener el volumen deseado para inoculación. Los volúmenes de inoculación típicos varían de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 10% del volumen final total de fermentación.

El recipiente de fermentación puede contener un agitador para revolver el contenido. El recipiente puede tener

también controles automáticos del pH y la espumación. El medio de producción puede ser añadido al recipiente y ser esterilizado ahí por calentamiento. Alternativamente, la fuente de carbohidratos o carbono puede ser separadamente esterilizada antes de la adición. Se puede añadir un cultivo de siembra previamente desarrollado al medio enfriado (generalmente a la temperatura de fermentación preferida de aproximadamente 27 °C a aproximadamente 35 °C) y se puede fermentar el cultivo agitado durante un periodo de aproximadamente 48 a aproximadamente 110 horas, produciéndose un caldo de elevada viscosidad. El polisacárido diutan puede ser recuperado del caldo mediante el método estándar de precipitación con un alcohol, generalmente con isopropanol.

Realizaciones preferidas de la invención, incluyendo descripciones detalladas de los dibujos

Los ejemplos siguientes se proporcionan para ilustrar la presente invención. No se debería malinterpretar que la descripción de los ejemplos limita el alcance de la presente invención en modo alguno.

Aislamiento de la secuencia de DNA/producción del plásmido

Para acometer el aislamiento inicial y determinar la secuencia apropiada para los resultados de la invención previamente descritos, se construyó del modo siguiente un banco génico del organismo ATCC 53159: se aisló DNA cromosómico de *Sphingomonas* sp. ATCC 53159 y se digirió parcialmente con la endonucleasa de restricción *Sau3AI*. Los fragmentos de DNA en el intervalo de 15 a 50 kb fueron purificados en un gel de agarosa y fueron ligados en el vector de clonación cosmídico pLAFR3 digerido con *Bam*HI (de acuerdo con Staskawicz et al., "Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*", J. Bacteriology, 1987, **169**: 5789-94), aislado de la cepa JZ279 de *Escherichia coli* (de Harding et al., "Genetic and physical analysis of a cluster of genes essential for xanthan gum biosynthesis in *Xanthomonas campestris*", J. Bacteriology, 1987, **169**: 2854-51). Se empaquetaron los productos de las reacciones de ligación en partículas de fago λ (usando el extracto de empaquetamiento Gigapack III Gold de Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.) y se transfectaron células de *E. coli* DH5 α MCR Library Efficiency (Life Technologies, Rockville, Maryland, EE.UU.) con ellos. Se reunieron aproximadamente 10.000 colonias resistentes a tetraciclina para formar el banco génico. Luego se aislaron secuencias individuales de este banco. El trabajo acometido en este caso implicó el aislamiento de genes específicos para la biosíntesis de polisacáridos del organismo *Sphingomonas* ATCC 53159.

Dichos genes para la biosíntesis de polisacáridos son típicamente identificados por complementación de mutantes defectuosos en cuanto a la síntesis de polisacáridos, particularmente aquellos bloqueados en la primera etapa, la de la glicosil transferasa I. Puesto que inicialmente no se disponía de mutantes de ATCC 53159 defectuosos en cuanto a transferasa I, se utilizó la complementación de mutantes de *Sphingomonas elodea* y *Xanthomonas campestris* defectuosos en cuanto a transferasa I para identificar genes para la biosíntesis del polisacárido diutan. El plásmido pLAFR3 puede ser transferido de su huésped *E. coli* a otras bacterias Gram negativas por conjugación triparental utilizando un plásmido auxiliar que proporciona funciones de transferencia de IncP (de acuerdo con Ditta et al., "Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*", Proc. Natl. Acad. Sci. 1980, **77**: 7347-51). Los plásmidos de tipo RK2 presentan en *E. coli* un número de copias estimado de cinco a siete por cromosoma (Figurski et al., "Suppression of ColE1 replication properties by the Inc P-1 plasmid RK2 in hybrid plasmids constructed *in vitro*", J. Mol. Biol. 1979, **133**: 295-318).

El banco génico de DNA cromosómico de ATCC 53159 en *E. coli* fue transferido a un mutante no mucoso (GPS2) de *S. elodea* ATCC 31461 por conjugación triparental, seleccionándose en cuanto a resistencia a tetraciclina y estreptomicina. El plásmido auxiliar utilizado fue pRK2013 (en la cepa JZ279 de *E. coli*), que contiene un origen de replicación de estrecha variedad de huéspedes pero presenta funciones reguladoras en trans, necesarias para movilizar pLAFR3. El plásmido pRK2013 no se replicaba en cepas de *Sphingomonas*. La bacteria *S. elodea* ATCC 31461 produce el polisacárido gellan. Ambos polisacáridos, gellan y diutan, tienen la misma unidad de repetición de tetrasacáridos, compuesta de $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-ramnosa-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-glucosa-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-ácido D-glucurónico-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-glucosa-(1}\rightarrow]$. Sin embargo, el diutan también incluye una cadena lateral compuesta de dos moléculas de ramnosa unidas a uno de los restos de glucosa y está modificado con acetilo, mientras que el gellan no tiene azúcares en cadena lateral y está modificado con acetilo y glicerilo. El GPS2 mutante es defectuoso en cuanto a la primera etapa de la biosíntesis de polisacáridos, es decir, en la transferencia de glucosa-1-fosfato desde UDP-D-glucosa hasta el vehículo lipídico fosfato de bactoprenilo por la enzima glicosil transferasa I. De placas de selección por tetraciclina, se aislaron colonias productoras de polisacárido (mucoides) de un fondo de colonias no mucoides. Los clones con producción de polisacárido restaurada contenían presumiblemente el gen de ATCC 53159 que codifica la glicosil transferasa I más aproximadamente 20-25 kb de DNA adyacente. Se aisló DNA plasmídico de ocho transconjugantes mucoides de GPS2 y se transfirió a la cepa DH5 α de *E. coli* (Life Technologies) por electroporación. Los plásmidos fueron aislados de *E. coli* para obtener DNA suficiente para una digestión doble con las endonucleasas de restricción *Hind*III/*Eco*RI (que cortan cualquier lado del sitio de la endonucleasa de restricción *Bam*HI en el policonector), para escindir el inserto de DNA del vector. Los tamaños de los insertos de DNA en los clones se determinaron mediante electroforesis en gel. Se determinaron las secuencias terminales de varios plásmidos secuenciando a partir de cebadores específicos para secuencias plasmídicas que flanquean el sitio *Bam*HI del vector. Se analizaron las secuencias por comparación con secuencias de bases de datos informáticas,

utilizando BLASTX. En la Figura 1 se presentan dos de estos plásmidos, pS8 y pS6. Similarmente, se transfirió el banco génico de ATCC 53159 a un mutante no mucoso de *X. campestris* resistente a rifampicina y defectuoso en cuanto a transferasa I (CXC109) (tal como en la referencia de Harding et al. anteriormente indicada) por medio de conjugación triparental, seleccionándose en cuanto a resistencia a tetraciclina y rifampicina. La bacteria *X. campestris* produce el polisacárido xantano, cuya síntesis también se inicia por la transferencia de glucosa-1-fosfato desde UDP-D-glucosa hasta el vehículo lipídico fosfato de bactoprenilo por la enzima transferasa I (Ielpi et al., "Sequential assembly and polymerization of the polyprenol-linked pentasaccharide repeating unit of the xanthan polysaccharide in *Xanthomonas campestris*", J. Bacteriology 1993, **175**: 2490-500). Se purificaron los plásmidos a partir de los transconjugantes mucoides y se determinaron las secuencias terminales, como se describió anteriormente. En la Figura 1 se presentan dos de estos plásmidos, pX6 y pX4.

El DNA de S657 clonado en los plásmidos pS8 y pX6 fue completamente secuenciado por secuenciación aleatoria ("shotgun") de doble cadena en Lark Technologies Inc. (Houston, Texas, EE.UU.). Estas secuencias fueron analizadas para identificar los genes para la biosíntesis de diutan (presentados en la Figura 1). Se designaron las funciones génicas basándose en la homología con otros genes de bases de datos, en particular con los genes publicados para la biosíntesis del esfingano S-88 (tal como en la anteriormente mencionada patente 6.284.516 de Pollock et al.), número U51197 de acceso de GenBank, y el gellan (GenBank AY217008 y AY220099). Se identificaron genes (Figura 1) que codificaban las transferasas para los cuatro azúcares de la cadena principal y cuatro genes para la síntesis de dTDP-ramnosa. Los genes para la secreción del polisacárido se basaron en la homología con genes para la biosíntesis de otros polisacáridos. Dos genes codifican proteínas homólogas a proteínas implicadas en la secreción de proteínas. Dos genes codifican supuestamente una polimerasa y una liasa. El inserto en el plásmido pX6 contenía 17 genes que incluían el gen *dpsB* que codifica la transferasa I (que inicia la primera etapa en la síntesis del diutan), genes para la secreción y cuatro genes para la síntesis de dTDP-ramnosa, pero carece de los genes para las transferasas II, III y IV y los supuestos genes para la polimerasa y la liasa. El plásmido pS8 contiene 20 genes del grupo de genes *dps*, incluyendo genes para las cuatro transferasas de los azúcares de la cadena principal, los cuatro genes para la síntesis de dTDP-ramnosa y genes para la secreción del polisacárido, incluyendo los supuestos genes para la polimerasa y la liasa, pero carece de los genes *orf6* y *orf7* de función desconocida. El plásmido pS6 contiene genes para la secreción y las cuatro azúcar transferasas pero no tiene todos los genes para la síntesis de dTDP-ramnosa ni el gen para la polimerasa. El plásmido pX4 sólo contiene una pequeña parte de la región *dps* pero incluye el gen que codifica la transferasa I y los cuatro genes para la síntesis de dTDP-ramnosa, que fueron considerados por Pollock et al. suficientes para dar lugar a un aumento de producción de polisacárido en las cepas de *Sphingomonas*.

Producción de la cepa

Los cuatro plásmidos anteriormente descritos fueron luego introducidos en la cepa ATCC nº 53159 de *Sphingomonas* por conjugación triparental, como se describió anteriormente, para formar las nuevas cepas S657 genéticamente modificadas (S657/pS8, S657/pS6, S657/pX6 y S657/pX4). A continuación siguió la fermentación, como se describió anteriormente, con objeto de producir un material de biogoma del modo indicado más adelante. Los cuatro plásmidos ejercían un efecto beneficioso sobre la productividad de diutan; sin embargo, el plásmido pS8 también proporcionaba sorprendentemente aumentos sumamente grandes de la viscosidad del diutan y un aumento del peso molecular. Se proporciona la secuencia de DNA de pS8 (26.278 pares de bases) (secuencia de DNA nº 1) y se enumeran a continuación los genes codificados en la Tabla 1 y, en forma de diagrama, en la Figura 1. El inserto de DNA en el plásmido pS8 incluye los genes *dpsG* a *rmID* y una porción de genes *dpsS* y *orf7*.

La tabla de genes siguiente es básicamente una lista de los genes representados por la secuencia de DNA para insertar en el plásmido pS8.

Tabla 1

Genes en el inserto del plásmido pS8

Inicio	Fin	Nombre	Descripción
2*	1054	dpsS	(parcial) homólogo a <i>ge/S</i>
2738	1113 C	dpsG	supuesta polimerasa
4895	2898 C	dpsR	supuesta liasa
5093	6031	dpsQ	supuesta ramnosil transferasa IV
7082	6111 C	dpsI	desconocido
7121	8167	dpsK	beta-1,4-glucuronosil transferasa II
8164	9030	dpsL	glucosil transferasa III
10.467	9079 C	dpsJ	desconocido

Inicio	Fin	Nombre	Descripción
11.076	12.374	dpsF	desconocido
12.389	13.306	dpsD	supuesta proteína para exportación de polisacárido
13.341	14.687	dpsC	supuesta proteína para exportación de polisacárido
14.687	15.394	dpsE	supuesta proteína para exportación de polisacárido
15.405	16.286	dpsM	supuesta proteína para exportación de polisacárido
16.270	16.968	dpsN	supuesta proteína para exportación de polisacárido
18.454	17.060 C	atrD	supuesta proteína de secreción
20.637	18.451 C	atrB	supuesta proteína de secreción
21.229	22.641	dpsB	glucosil-isoprenilfosfato transferasa I
22.757	23.635	rmlA	glucosa-1-fosfato timidililtransferasa
23.632	24.198	rmlC	dTDP-6-desoxi-D-glucosa-3,5-epimerasa
24.202	25.263	rmlB	dTDP-D-glucosa-4,6-deshidratasa
25.263	26.129	rmlD	dTDP-6-desoxi-L-manosa deshidrogenasa
26.277*	26.146 C	orf7	(parcial) función desconocida

*Primer codón en marco; el codón de inicio no está presente

Producción de diutan

- Se determinó la producción de diutan por las cepas S657 de *Sphingomonas* genéticamente modificadas que contenían plásmido, en comparación con la cepa S657 de tipo silvestre sin un plásmido, en tres conjuntos de fermentaciones desarrolladas en el mismo medio líquido en fermentadores Applikon de 20 l de capacidad, con agitación y aireación. Para las cepas que contenían plásmido, se añadió el antibiótico tetraciclina en una cantidad de 5 mg/l durante toda la fermentación para asegurar la retención del plásmido. Cuando fue necesario, se añadió KOH para controlar el pH. Se utilizaron dos fases de siembra con transferencias de inóculo en concentraciones de 1% a 6%. Los medios empleados para la fermentación contenían jarabe de maíz como fuente de carbohidratos, una fuente de nitrógeno asimilable y sales. Los nutrientes que se pueden emplear para la fermentación son bien conocidos en la técnica e incluyen un carbohidrato, por ejemplo, glucosa, sacarosa, maltosa o maltodextrinas, una fuente de nitrógeno, por ejemplo, nitrógeno inorgánico como amonio o nitrato, nitrógeno orgánico tal como aminoácidos, extracto de levadura hidrolizada, proteína de soja o concentrado de productos solubles de maíz, y sales adicionales que contienen, por ejemplo, cloruro, fosfato, sulfato, calcio, cobre, hierro, magnesio, potasio, sodio o zinc.
- Como una medida de la producción de diutan resultante, se determinaron la viscosidad del caldo y las fibras precipitadas. La viscosidad de los caldos de fermentación se midió por medio de un viscosímetro Brookfield hecho funcionar a 60 rpm con un eje nº 4, y los resultados se muestran en la Tabla 2. Al final de la fermentación, los caldos fueron tratados con la bien conocida introducción de la enzima glucoamilasa para hidrolizar los oligosacáridos restantes del jarabe de maíz. Las gomas diutan producidas fueron luego precipitadas de una parte alícuota del caldo con dos volúmenes de alcohol isopropílico. Las fibras fueron recogidas en un filtro y fueron secadas. En la Tabla 2, el término DWY significa las producciones precipitables totales de biogomas, en peso en estado seco, después de la hidrólisis de los oligosacáridos en exceso de los jarabes de maíz.
- Claramente, el material resultante tiene una mayor producción con los plásmidos pX4, pX6, pS6 y pS8 que llevan presentes en ellos copias adicionales de genes para la biosíntesis de diutan. Sin embargo, con el plásmido pS8 hubo un inesperado gran aumento de la viscosidad del caldo con respecto al aumento de la producción en peso en estado seco, lo que indica que, además de una cantidad aumentada de diutan producido, algún factor estaba afectando a la viscosidad.

Tabla 2

Fermentación de cepas que contienen plásmido

Cepa	DWY				
	Prueba nº 1	Prueba nº 2	Prueba nº 3	Media	Aumento, %
S657	34,3	32,2	33,9	33,5	----
S657/pS8	37,1	35,4	35,9	36,1	8,0%
S657/pX6	38,4	37,6	33,5	36,5	9,1%
S657/pS6			37,6		12,3%

S657/pX4	36,4			8,8%	
Viscosidad del caldo					
Cepa	Prueba nº 1	Prueba nº 2	Prueba nº 3	Media	Aumento, %
S657	5150	4950	5550	5217	----
S657/pS8	6650	6850	6850	6783	30,0%
S657/pX6	5400	6250	5125	5592	7,2%
S657/pS6			6675		28,0%
S657/pX4			5525		5,9%

Claramente, hubo una mayor producción de material resultante con cualquiera de los cuatro plásmidos presentes, mientras que los plásmidos pS8 y pS6 permitían un aumento muy inesperado de la viscosidad del caldo, lo que indicaba también una elevada calidad del producto. Luego se determinó la calidad, es decir, la viscosidad, de los productos de goma diutan resultantes.

Reología del diutan en ensayos de aplicaciones

Luego se analizaron estas muestras de goma diutan en términos de posibles usos beneficiosos en dos áreas diferentes: aditivos de yacimientos petrolíferos para la recuperación de petróleo y aditivos de adhesivos para la retención de agua y un endurecimiento rápido.

La industria de los yacimientos petrolíferos se basa en lo que se denomina una prueba de "viscosidad en agua marina" (SWV; del inglés, sea water viscosity) como una estimación de un comportamiento aceptable de las gomas para la recuperación de petróleo. Dicha prueba es básicamente un indicador de la eficacia de una goma para aumentar la viscosidad en condiciones de agua salobre (por ejemplo, para representar la recuperación de lechos marinos).

La predicción de la viabilidad de una goma resultante como un apropiado modificador de la viscosidad con fines de recuperación de petróleo es generalmente aceptada en términos de modificación de la viscosidad de una formulación de agua marina de ensayo. Dicha formulación de "agua marina sintética" se produce al mezclar 419,53 gramos de sal marina (ASTM D-1141-52) con 9800 gramos de agua desionizada. Para la prueba de viscosidad en agua marina se añaden 0,86 gramos de la goma de muestra a 307,0 g de agua marina sintética y se mezclan a aproximadamente 11.500 rpm en una multimezcladora Fann (Modelo 9B5, número de accesorio N5020) durante 35 minutos. Al final de los 35 minutos, se enfría la disolución a aproximadamente 26 °C antes de que se mida la viscosidad. Para la lectura a 3 rpm, se coloca la muestra en la plataforma de muestras Fann (modelo Fan 35A; muelle de torsión MOC 34/35 F0.2b; volante B1; rotor R1) y se ajusta la velocidad a 3 rpm haciendo girar el motor a baja velocidad y fijando el cambio de velocidades en la posición media. Luego se deja que se estabilice la lectura y se lee el valor del esfuerzo cortante en el dial y se registra como la lectura en el dial (DR; del inglés, dial reading) de la SWV a 3 rpm. Para la lectura a 0,3 rpm, se emplea un viscosímetro Brookfield (viscosímetro Brookfield LV DV-II o DV-II, con el eje LV-2C) para medir la viscosidad. Se fija la velocidad del eje a 0,3 rpm y se deja que el eje gire al menos 6 minutos antes de que la viscosidad se registre como la lectura de SWV a 0,3 rpm y se exprese en centipoises (cP). Para aplicaciones de adhesivos, la prueba de viscosidad de bajo índice de cizalladura (LSRV; del inglés, low shear rate viscosity) en PEG (una viscosidad de bajo índice de cizalladura usando polietilenglicol como agente dispersivo, como se esboza más adelante) proporciona a esa industria una indicación en cuanto a la eficacia del comportamiento de un modificador de la viscosidad. Dicha prueba permite medir la viscosidad de una disolución de biogoma al 0,25% en "agua corriente estándar" (STW; del inglés, Standard Tap Water). La STW se prepara añadiendo 10,0 gramos de NaCl y 1,47 gramos de CaCl₂·2H₂O a 10 litros de agua desionizada. Para la medición de la viscosidad, se añaden 0,75 gramos de biogoma a 4,5 gramos de polietilenglicol 200 (CAS 25322-68-3) en un vaso de precipitados de 400 ml de capacidad y se dispersa a fondo la mezcla. Luego se añaden 299 gramos de STW al vaso de precipitados y se mezcla durante aproximadamente 4 horas usando un agitador de tipo hélice y bajo cabeceo a 800 ± 20 rpm. Después del tiempo de mezclamiento de 4 h, se pone el vaso de precipitados en un baño de agua a 25 °C y se deja que se asiente en reposo su contenido durante aproximadamente 30 minutos. Luego se mide la viscosidad usando un viscosímetro Brookfield LV provisto de un muelle de torsión 2.5+ (o un instrumento equivalente tal como el modelo DVE 2.5+), a 3 rpm usando el eje LV 1 después de dejar que el eje gire durante 3 minutos, y se expresa en centipoises (cP).

Las muestras de diutan anteriormente producidas se examinaron de esta manera; los resultados fueron los siguientes:

Tabla 3

Reología del diutan procedente de cepas que contienen plásmido

Cepa	SWV a 3 rpm DR			SWV a 0,3 rpm cP		LSRV en PEG cP		
	Ensayo nº 1	Ensayo nº 2	Ensayo nº 3	Ensayo nº 1	Ensayo nº 2	Ensayo nº 1	Ensayo nº 2	Ensayo nº 3
S657 de tipo silvestre	25	26	22	24.400	28.600	2820	3150	2280
S657/pS8	42	43	47	41.500	38.800	4720	4980	4920
S657/pX6	25	29	26	25.000	29.100	2860	3400	3270
S657/pS6	---	---	22	---	---	---	---	2270
S657/pX4	---	---	24,5	---	---	---	---	2950

SWV = viscosidad en agua marina

LSRV = viscosidad de bajo índice de cizalladura

- 5 Inesperadamente, hay aumentos definidos de viscosidad mostrados por las gomas diutan de la invención producidas por algunas de las cepas genéticamente modificadas que contienen plásmido. Sin embargo, lo más sorprendente es que el aumento de viscosidad para SWV a 3 rpm es del 80% para la cepa pS8 mientras que, en el mismo análisis realizado para la cepa pX6, es meramente del 9,6% con respecto a los resultados del tipo silvestre. Los plásmidos pS6 y pX4 no produjeron un aumento significativo. Asimismo, la prueba de SWV a menor rpm revela un aumento del
- 10 51,5% con respecto al tipo silvestre para el tipo pS8 frente a sólo más del 2% para el tipo pX6. Finalmente, la prueba de LSRV en polietilenglicol mostró que los resultados con pS8 eran un aumento de viscosidad superior al 77% con respecto a la goma de tipo silvestre, en comparación con un aumento inferior al 16% para el diutan pX6, un aumento del 7,2% para el pX4 y ningún aumento significativo para el plásmido pS6. De nuevo, los resultados muy inesperados en estos términos muestran las drásticas mejoras correspondientes a la producción de goma diutan por medio de la utilización de la secuencia génica necesaria, ejemplificada en el plásmido pS8, como una manera de
- 15 introducir dicha secuencia en una bacteria objetivo que produce diutan.

Por lo tanto, el diutan de la invención producido por medio de la introducción de pS8 presentaba unas medidas de viscosidad sorprendentemente aumentadas en los tres recuentos, particularmente en comparación con el tipo silvestre y las variedades producidas con plásmido pX6. Por consiguiente, se espera que dicho nuevo diutan funcione sumamente bien bajo las condiciones típicas de los yacimientos petrolíferos y en las aplicaciones de adhesivos.

Explicación fundamental para la mejora en reología

En los ejemplos previos se mostró que el diutan de la cepa S657/pS8 presentaba un aumento significativo de parámetros reológicos. Dicho aumento sustancial en las medidas de viscosidad en agua marina y de viscosidad de bajo índice de cizalladura en PEG no puede ser así sólo atribuido al aumento de productividad ya que la cepa pX6 también presentaba unos resultados de producción similares, si no mayores. De hecho, en el ejemplo previo ilustrado mediante la Tabla 2, las producciones en peso en estado seco (materia precipitable con alcohol) para la cepa S657/pS8 aumentaron en un 8,0%, mientras que los parámetros reológicos aumentaron significativamente más (52-80%). Se continuó con un estudio fundamental para explicar por qué se obtienen mejoras reológicas con la cepa S657/pS8 con respecto a la cepa de tipo silvestre.

La viscosidad intrínseca es una técnica bien conocida en la ciencia de los polímeros para inferir el peso molecular de macromoléculas (C. Tanford, 1961, "Physical Chemistry of Macromolecules", John Wiley & Sons, New York, EE.UU.). La viscosidad intrínseca se obtiene representando gráficamente la viscosidad reducida (viscosidad normalizada en cuanto a la concentración) frente a la concentración de la disolución y extrapolando una regresión lineal de los datos hasta la concentración cero (la intersección del gráfico con el eje y). Sorprendentemente, las gomas resultantes presentaban aumentos de viscosidad intrínseca como los indicados más adelante en la tabla siguiente.

Se evaluaron cinco muestras de diutan, dos de la cepa de tipo silvestre (Testigo 1 y Testigo 2) y tres de la cepa S657/pS8 (Muestra 1, Muestra 2 y Muestra 3), por medio de unos análisis de viscosidad intrínseca, azúcares neutros y ácidos orgánicos. Estas muestras fueron purificadas mediante precipitación con alcohol, rehidratadas, tratadas con hipoclorito, tratadas con glucoamilasa, tratadas con lisozima y finalmente tratadas con proteasa (en este orden secuencial). Luego fueron recuperadas en CBM:caldo en relación 4:1, secadas y molidas. El CBM es una mezcla azeotrópica de alcohol isopropílico/agua que incluye ~82% en peso del alcohol isopropílico.

Se examinó el contenido de humedad de las muestras llevando a cabo lo siguiente: en general, se examinaron dos partes alícuotas de 0,7 gramos de muestra usando una balanza Mettler HB 43 para humedad por lámpara halógena. Luego se promediaron los resultados de los dos ensayos y se utilizaron estos resultados para la corrección por humedad.

Una vez obtenidos los datos de humedad, se preparó una disolución de la goma al 0,2% en disolución 0,01 M de NaCl basándose en la corrección por humedad. Para estos ensayos se prepararon 200 gramos en total de la disolución al 0,2%. La goma fue pesada en una balanza analítica hasta lo más próximo a la diezmilésima y fue añadida al agua pesada hasta lo más próximo a la milésima. Las muestras fueron agitadas durante dos horas usando una mezcladora de hélice de 6,35 cm de diámetro a 1000 rpm en un vaso de precipitados de forma alta y 400 ml de capacidad.

Después de la hidratación inicial, cada muestra fue diluida hasta el 0,02% usando una disolución 0,01 M de NaCl. Esto se realizó pesando 20 gramos de la disolución al 0,2% en un vaso de precipitados de 400 ml de capacidad y añadiendo luego de nuevo 180 ml del diluyente. Las muestras diluidas fueron mezcladas durante 30 minutos adicionales. Las diluciones finales utilizadas por último para determinar la viscosidad intrínseca se prepararon a partir de esta muestra. Cada muestra de diutan fue evaluada en las concentraciones siguientes: 0,004%, 0,008%, 0,010% y 0,012%.

Las mediciones de viscosidad se llevaron a cabo utilizando el sistema Vilastic® VE. Antes de las mediciones se calibró el sistema Vilastic con agua hasta un error inferior al 2,0%. Se sometieron las muestras a las mediciones usando el programa Timer a 2 Hz, una deformación de 1 y un índice de cizalladura de aproximadamente 12 1/s, todas a una temperatura constante de 23 °C. Se realizaron cinco mediciones para cada muestra y se calculó el promedio. Los datos de viscosidad promediados fueron luego empleados para calcular la viscosidad intrínseca. En la Tabla cuatro siguiente se proporcionan los resultados finales de estos ensayos.

Tabla 4

Comparación de diutanes basándose en cálculos de viscosidad intrínseca

Muestra de diutan	Sólidos medidos	Viscosidad intrínseca
S657, Testigo 1	93,76	138,3
S657, Testigo 2	92,42	143
S657/pS8, Muestra 1	91,7	170,7
S657/pS8, Muestra 2	91,4	162,2
S657/pS8, Muestra 3	91,94	162,8

Estos resultados indican que la cepa S657/pS8 producía consistentemente diutan con una viscosidad intrínseca significativamente mayor; de hecho, la viscosidad reducida media de las cepas de la invención era 165,2 mientras que la del testigo era 140,7, todas para niveles similares de sólidos medidos. Este hallazgo indica que el diutan producido por S657/pS8 tiene un peso molecular mayor que el testigo de tipo silvestre.

Para determinar si la goma diutan de mayor viscosidad de S657/pS8 tenía la misma composición que el diutan de la cepa de tipo silvestre, se determinó la composición analizando los azúcares neutros y los ácidos orgánicos. Para el análisis de los azúcares neutros se utilizaron las muestras purificadas empleadas para las mediciones de viscosidad intrínseca. Una parte alícuota de cada muestra purificada fue hidrolizada hasta los azúcares componentes por hidrólisis con ácido trifluoroacético (100 °C/~18 h). Los azúcares neutros del producto de hidrólisis fueron cuantificados mediante cromatografía de alta eficacia por intercambio aniónico con detección amperométrica pulsada. Los ácidos orgánicos del producto de hidrólisis fueron cuantificados mediante cromatografía de alta eficacia por exclusión iónica con detección de conductividad químicamente suprimida. En la Tabla 5 se resumen los resultados del análisis de azúcares neutros. Como se muestra, el perfil de azúcares neutros para la cepa S657/pS8 es casi idéntico al perfil de azúcares neutros para la cepa S657 de tipo silvestre. Aunque ambos resultados son diferentes de los valores teóricos, estos resultados indican que la estructura de la unidad de repetición de la goma diutan producida al utilizar pS8 es igual a la del tipo silvestre y que todo aumento de viscosidad impartido por el material pS8 se debe a cadenas más largas, lo que significa un mayor peso molecular.

Tabla 5

Análisis de azúcares neutros y ácidos orgánicos para las cepas de diutan pS8 y de tipo silvestre (testigo)

	Cepa	% de ramnosa	% de glucosa	% de acetato
Muestra 1	S657/pS8	32	19	8,9
Muestra 2	S657/pS8	32	19	8,2
Muestra 3	S657/pS8	32	17	8,6
Testigo 1	S657 de tipo silvestre	30	18	8,6
Testigo 2	S657 de tipo silvestre	33	20	8,7
MEDIA	S657/pS8	32	18,3	8,6
MEDIA	S657 de tipo silvestre	31,5	19	8,65
VALOR TEÓRICO	---	46	30	8

Por lo tanto, la viscosidad en agua marina y la viscosidad de bajo índice de cizalladura en PEG muy mejoradas del diutan producido por la cepa genéticamente modificada S657/pS8 son atribuibles a un aumento del peso o la longitud moleculares de la molécula de diutan, es decir, a más unidades de repetición por molécula, y no a un cambio en su composición ni, por consiguiente, a cambios en la propia estructura de repetición. Esta reología mejorada tampoco puede ser únicamente debida a un aumento de la cantidad de diutan producida. Aunque se evaluaron cuatro plásmidos, pS6, pS8, pX4 y pX6, con diferentes porciones del grupo de genes para la biosíntesis de diutan clonadas y todos mostraron cierto aumento de productividad, sólo el plásmido pS8 mostró el inesperado y muy elevado aumento de parámetros reológicos en el producto de diutan recuperado.

Una comparación de los genes para la biosíntesis de diutan clonados en los plásmidos examinados sugiere que el gen que más probablemente es el responsable del aumento del peso molecular es el gen *dpsG*, ya que este gen está presente en pS8 y no en los demás plásmidos. El gen *dpsG* codifica una proteína hidrófoba de membrana con una acusada homología con otras proteínas de membrana implicadas en la síntesis de polisacáridos. Una porción de la proteína presenta homología con proteínas para polimerasa, una enzima que cataliza el enlace de unidades de repetición para formar el polisacárido de alto peso molecular. Se ha propuesto que el gen homólogo *gelG* de S60 actúa como una polimerasa para la síntesis de gellan (N. E. Harding et al., 2004, "Organization of genes required for gellan polysaccharide biosynthesis in *Sphingomonas elodea* ATCC 31461", J. Ind. Microbiol. Biotech. **31**: 70-82; I. Sa-Correia et al., 2002, "Gellan gum biosynthesis in *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461: Genes, enzymes and exopolysaccharide production engineering", J. Ind. Microbiol. Biotech. **29**: 170-176). También se han aislado genes homólogos de *dpsG* de las cepas ATCC 31554 y ATCC 21423 de *Sphingomonas* que producen los polisacáridos S88 y S7 (Pollock et al., Patentes de EE.UU. números 5.854.034, 5.985.623 y 6.284.516; y T. J. Pollock, Patente de EE.UU. nº 6.709.845). Por lo tanto, es muy probable que copias adicionales del gen para polimerasa puedan ejercer el efecto de aumentar la longitud molecular de la molécula de diutan. No se puede descartar que otros genes del grupo de genes biosintéticos del diutan puedan ser necesarios en combinación con *dpsG* para alcanzar el observado aumento de viscosidad. Serían candidatos probables los genes *dpsB*, *dpsL*, *dpsK* y *dpsQ* que codifican las azúcar transferasas I, II, III y IV, en particular el gen *dpsB* que codifica la transferasa I que añade el primer azúcar de la unidad de repetición al vehículo lipídico. Otros genes importantes pueden ser *dpsD*, *dpsC* y *dpsE*, que son genes homólogos a los genes *gumB* y *gumC* de los que se ha mostrado que aumentan el peso molecular del xantano cuando son multiplicados sobre un plásmido multicopia. Es posible que todos los genes clonados en el plásmido pS8 puedan ser necesarios para alcanzar el drástico aumento de viscosidad.

Aunque la invención se describirá y revelará en relación con ciertas realizaciones y prácticas preferidas, no se pretende en modo alguno limitar la invención a esas realizaciones específicas, más bien se pretende abarcar equivalentes estructurales y todas las realizaciones y modificaciones alternativas como pueden ser definidas por el alcance de las reivindicaciones adjuntas y sus equivalencias.

Depósitos

La siguiente cepa bacteriana fue depositada en la Depositaria de Patentes de la American Type Culture Collection, en 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110, EE.UU., el 21 de octubre de 2005, conforme al Tratado de Budapest para el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos:

Cepa S657 de *Sphingomonas* con el plásmido pS8.

REIVINDICACIONES

1. Una goma diutan que presenta una viscosidad intrínseca de más de 150 dl/g hasta 170,7 dl/g cuando la viscosidad intrínseca se obtiene representando gráficamente la viscosidad reducida frente a la concentración de la disolución y extrapolando una regresión lineal de los datos hasta la concentración cero.
- 5 2. La goma diutan de la Reivindicación 1, que presenta una viscosidad intrínseca superior a 155 dl/g.
3. La goma diutan de la Reivindicación 1, que presenta una viscosidad intrínseca superior a 160 dl/g.
4. Una goma diutan según cualquiera de las Reivindicaciones 1-3, que presenta una viscosidad a 3 rpm en agua marina superior a 35 en la lectura en el dial cuando la lectura se toma combinando y mezclando una goma de muestra con agua marina sintética y luego enfriando la disolución a 26 °C y colocándola sobre una plataforma de muestras Fann, donde se ajusta la velocidad a 3 rpm y se lee en el dial.
- 10 5. La goma diutan de la Reivindicación 4, que presenta una viscosidad a 3 rpm en agua marina superior a 37 en la lectura en el dial.
6. La goma diutan de la Reivindicación 4, que presenta una viscosidad a 3 rpm en agua marina superior a 42 en la lectura en el dial.
- 15 7. Una goma diutan según cualquier reivindicación precedente, que presenta una viscosidad a 0,3 rpm en agua marina superior a 35.000 cP cuando la lectura se toma empleando un viscosímetro Brookfield con un eje LV-2C para medir la viscosidad, ajustando la velocidad del eje a 0,3 rpm y dejando que el eje gire al menos 6 minutos antes de que se registre la viscosidad.
8. El diutan de la Reivindicación 7, que presenta una viscosidad a 0,3 rpm en agua marina superior a 38.000 cP.
- 20 9. El diutan de la Reivindicación 7, que presenta una viscosidad a 0,3 rpm en agua marina superior a 40.000 cP.
10. El diutan de la Reivindicación 7, que presenta una viscosidad a 0,3 rpm en agua marina superior a 41.000 cP.
11. Una goma diutan según cualquier reivindicación precedente, que presenta una viscosidad de bajo índice de cizalladura en presencia del agente dispersivo polietilenglicol, superior a 3500 cP cuando la medida de viscosidad se toma midiendo la viscosidad de una disolución de biogoma al 0,25% en agua corriente estándar (STW) usando un viscosímetro Brookfield LV provisto de un muelle de torsión 2.5+, a 3 rpm, empleando el eje LV 1 después de dejar que el eje gire durante 3 minutos.
- 25 12. La goma diutan de la Reivindicación 11, que presenta una viscosidad de bajo índice de cizalladura en presencia del agente dispersivo polietilenglicol, superior a 3700 cP.
13. La goma diutan de la Reivindicación 11, que presenta una viscosidad de bajo índice de cizalladura en presencia del agente dispersivo polietilenglicol, superior a 3900 cP.
- 30 14. Un método para producir la goma diutan según cualquiera de las Reivindicaciones 1-13, que comprende: introducir una secuencia de codificación para al menos una enzima biosintética del diutan como la codificada por las ID. SEC. números: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 y 43, o que tiene una identidad de al menos 95% con respecto a las ID. SEC. números: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 y 43, en un organismo huésped de *Sphingomonas* que produce diutan; y cultivar el organismo huésped bajo condiciones de fermentación, mediante lo cual el organismo huésped produce una goma diutan de cualquiera de las Reivindicaciones 1-13.
- 35 15. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica al menos una enzima biosintética del diutan como la mostrada en las ID. SEC. números: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41 y 43, o una enzima que tiene una identidad de al menos 95% con respecto a las ID. SEC. números: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 y 43.
- 40