

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 220 192**

② Número de solicitud: 200202041

⑤ Int. Cl.7: **C12N 1/20**

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **06.09.2002**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2004**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.12.2004

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Granada
Cuesta del Hospicio, s/n
18071 Granada, ES**

⑦ Inventor/es: **Quesada Arroquia, Emilia;
Bejar Luque, María Victoria;
Moral García, Ana del y
Ferrer Moreno, María Rita**

⑦ Agente: **Herrera Dávila, Álvaro**

⑤ Título: **Halomonas maura TK26 (CECT 5720) un mutante que sintetiza con alto rendimiento el exopolisacárido maurano26.**

⑦ Resumen:

Halomonas maura TK26 (CECT 5720), un mutante que sintetiza con alto rendimiento el exopolisacárido maurano26.

Halomonas maura TK26 (CECT 5720) obtenido mediante mutación biológica de la cepa salvaje de halomonas maura S30 con el transposón mini-Tn5. El cultivo de esta bacteria permite obtener elevadas cantidades de polisacárido maurano26 de elevado poder viscosizante y emulgente, y capaz de captar metales pesados y otros cationes. El polisacárido se obtiene con un rendimiento de unos 5 g/l de medio de cultivo. El polímero presenta una masa molecular de 5.3×10^6 Da. Este compuesto fundamentalmente por glucosa, manosa, galactosa; además posee un elevado porcentaje de restos de acetilo, sulfato y ácidos urónicos. Los cultivos de microorganismos no son viscosos y la presencia de sales en los mismos disminuye las contaminaciones. Dadas sus propiedades funcionales, este polímero tiene un elevado interés para la industria alimenticia, farmacéutica, y cosmética por su actividad viscosizante y estabilizadora de emulsiones y procesos de biodetoxificación por su capacidad para captar cationes.

ES 2 220 192 A1

DESCRIPCIÓN

Halomonas maura TK26 (CECT 5720), un mutante que sintetiza con alto rendimiento el exopolisacárido maura-
no26.

La presente invención se refiere a una bacteria productora de exopolisacárido: en concreto, se trata de una cepa de Halomonas maura de código interno de laboratorio TK26 que produce una elevada cantidad de un polisacárido denominado maurano 26 (denominación interna de laboratorio). Con este compuesto se pueden realizar preparaciones de elevada viscosidad que al ser añadidas a distintos preparados alimentarios, farmacéuticos y/o cosméticos originan por una parte, un aumento de su consistencia y por otra, favorecen la estabilización de emulsiones. Por otra parte este polímero tiene la habilidad de secuestrar cationes mono y divalentes debido al carácter polianiónico que le confieren sus restos acetilo, sulfato y los ácidos urónicos.

La cepa TK26 se ha depositado con fines de patente en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con fecha de 11 de Julio de 2002, donde se le ha asignado el número 5720. La CECT tiene su sede en el edificio de investigación de la Universidad de Valencia, sito en el Campus de Burjasot (DP 46100, Valencia, España).

Algunas bacterias presentan una envoltura externa de naturaleza polisacáridica que, en algunos casos, puede desprenderse y pasar al medio donde se cultivan estos microorganismos. Estos compuestos, denominados exopolisacáridos o EPS, se extraen fácilmente del medio de cultivo y tienen un gran número de aplicaciones desde el punto de vista biotecnológico, tanto en el ámbito industrial como en procesos medioambientales. Las plantas y algunas algas también producen estos compuestos (goma arábica, goma guar, goma de tragacanto, carragenatos, alginatos, etc.). Sin embargo, los EPS microbianos presentan innumerables ventajas sobre los polímeros extraídos de estos otros organismos. Por ejemplo, podríamos destacar el hecho de que la producción no está sujeta a cambios ambientales, extinción de la fuente, etc. Por otra parte está claro que los productos microbianos son más diversos y tienen propiedades funcionales más específicas. Por todo ello, desde hace algunos años, los exopolisacáridos microbianos están desplazando a los producidos por organismos superiores. Uno de los polisacáridos microbianos más ampliamente utilizados por la industria es el xantano, sintetizado por *Xanthomonas campestris*. Las preparaciones acuosas del mismo presentan una elevada viscosidad y son termoestables.

No obstante la industria moderna y el medio ambiente actualmente demandan nuevos compuestos capaces de cubrir funciones específicas que no pueden desarrollar los polímeros hasta ahora conocidos. Por ello, la búsqueda de nuevos exopolisacáridos es un campo donde se realiza una intensa investigación.

El estado de la técnica en la materia no aporta ninguna invención cuyo objetivo sea la producción de exopolisacáridos por Halomonas maura.

Tampoco se aportan referencias bibliográfica relativa a la producción de polisacáridos en Halomonas maura TK26, aunque sí se encontraron referencias de publicaciones en las que se describen otras especies de Halomonas productoras de exopolisacáridos como es el caso de Halomonas eurihalina.

En las referencias bibliográficas más afines a la cuestión (Bouchotroch y col. 2001. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 1625-1632; Bouchotroch y col. 1999. *Systematic and Applied Microbiology* 22: 412-419; y Bouchotroch y col. 2000 *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 24: 374-378) se describe taxonómicamente la especie Halomonas maura (en las dos primeras), mientras que en la última se describen, en líneas generales, los polisacáridos de diversas cepas de esta especie, entre las cuales se encuentra la cepa S30 a partir de la cual se obtiene. por el procedimiento que indicaremos a continuación, la cepa TK26.

Los microorganismos pertenecientes al género Halomonas se encuentran ampliamente distribuidos en ambientes hipersalinos. En la actualidad pertenecen a este género 22 especies entre las que se encuentran microorganismos halotolerantes (toleran la presencia de sales en el medio de cultivo) y halófilos (necesitan la presencia de sales para desarrollarse). Halomonas maura es una especie de este género caracterizada por originar colonias muy mucosas.

A la vista del estado de la técnica anterior, el objeto de la presente invención es la descripción del procedimiento de obtención y la caracterización de la cepa Halomonas maura TK26, microorganismo, obtenido tras la manipulación genética de la cepa salvaje S-30, con objeto de aumentar la capacidad de síntesis de su exopolisacárido, el maurano 26. Las características fisiológicas y el análisis genético de dicha cepa permite diferenciarla claramente de otras cepas de Halomonas maura. Las características del maurano 26 son también diferentes a otros polisacáridos producidos por esta especie.

La ventaja de este desarrollo microbiológico es disponer de una bacteria CECT 5720 perteneciente a Halomonas maura. que produce un 30% más de polisacárido que la cepa salvaje por lo cual, la explotación industrial del polímero resulta favorecida. El polisacárido de este microorganismo tiene una composición química distinta de la de los EPS ya comercializados lo que se traduce en propiedades funcionales nuevas y específicas que podrían ser utilizadas en distintas áreas industriales y en biotecnología medioambiental.

Dadas las propiedades funcionales del polisacárido maurano 26, (actividad viscosizante y emulgente, junto a la capacidad de adsorción de metales pesados), la cepa productora Halomonas maura TK26 tiene un gran interés desde

ES 2 220 192 A1

el punto de vista biotecnológico con aplicaciones como agente viscosizante y emulgente o para la captación de metales pesados en procesos de biorremediación o tratamiento de aguas residuales, aportando las siguientes ventajas:

- Halomonas maura TK26 es una bacteria halófila no patógena para el hombre, animales o plantas.
- Su cultivo es sencillo pues es un microorganismo que no requiere condiciones ambientales ni nutrientes especiales. Puede crecer y producir el polisacárido con una amplia gama de fuentes de carbono y de nitrógeno.
- La adición de sales al medio de cultivo evita contaminaciones en los procesos de fermentación industrial.
- Los cultivos de este microorganismo no desarrollan una viscosidad elevada, con lo cual la energía que se necesita para agitarlos y airearlos no es tan alta como la que requieren otras bacterias productoras de exopolímeros.

Estudiando las bacterias de diversos hábitats hipersalinos del Norte de Marruecos, se encontraron cuatro cepas de Halomonas (S-31T, S-30, S-36, S-7) que producían colonias mucosas. Para poder clasificarlas se realizó un estudio fenotípico, comprobándose que eran diferentes a las especies descritas hasta entonces (Bouchotroch y col., 1999. Syst. Appl. Microbiol. 22: 412-419). El análisis genotípico de estos organismos confirmó lo anterior y se describió una nueva especie, Halomonas maura, depositándose en la CECT la bacteria S-31T como cepa tipo (CECT 5298) (Bouchotroch y col. 2001 Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 1625-1632). Las 4 cepas producían polisacáridos que daban lugar a preparaciones acuosas de viscosidad considerable (Bouchotroch y col., 2000. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 24: 374-378).

La cepa S-30 de Halomonas maura era la que producía el polisacárido más interesante. Con el fin de mejorar la producción del polisacárido y las propiedades del mismo, se manipuló genéticamente dicho microorganismo. Para ello se realizaron numerosas experiencias de mutagénesis insercional con el transposón mini-Tn5. Entre las más de 1500 transconjugantes obtenidas, se seleccionó la mutante super-productora objeto de la solicitud de la patente. El procedimiento seguido fue el siguiente:

Se realizó una conjugación biparenteral utilizando como organismo receptor un mutante espontáneo a la rifampicina de la cepa S30 y como organismo donador *Escherichia coli* S17- λ pir portador del transposón mini-Tn5 (que codifica resistencia a la kanamicina). Ambos microorganismos se mezclaron en una proporción 2:1 y se depositaron en placas con medio conteniendo rifampicina y kanamicina (las colonias que crecen en este medio son las cepas de H. maura S-30 que tienen el transposón insertado en su genoma, o transconjugantes). La frecuencia de aparición de los transconjugantes fue de 8×10^{-7} . Entre los aproximadamente 1500 transconjugantes obtenidos en numerosas experiencias, se seleccionó el TK26 por producir colonias de mucosidad superior a la de la cepa salvaje.

La mutante TK26 se ha caracterizado genéticamente. Lleva insertado el transposón mini Tn5:Km2 en el gen de la subunidad E1 β del complejo α -ceto ácido deshidrogenasa de cadena ramificada (BCDH). La secuencia génica mutada por la inserción del transposón es la que figura en la Lista de secuencias adjunta.

En el laboratorio la cepa TK26 se mantiene fácilmente en el medio de cultivo siguiente:

Proteosa-peptona (Difco)	5g
Extracto de levadura (Difco)	3g
Extracto de Malta (Panreac)	3g
Glucosa (Panreac)	10g
NaCl	17'1g
MgCl ₂ .6H ₂ O	3g
SO ₄ .7H ₂ O	4'3g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0'1 g
KCl	0'4g
NaHCO ₃	0.02g
NaBr	0'05g
Agua destilada	c.s.p. 1000 ml

Para preparar un medio sólido hay que añadir un 2% (p/v) de Agar (Difco).

ES 2 220 192 A1

Las características taxonómicas de la cepa salvaje a partir de la cual se obtuvo la cepa TK26 son las que se encuentran detalladas en el trabajo de Bouchotroch y col. 2001. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 1625-1632.

Halomonas maura TK26 como productora de maurano 26

5

A partir del medio de cultivo en el que creció *Halomonas maura* TK26 durante 3 días a 32°C, se obtuvo el polisacárido por el siguiente procedimiento:

10 Se centrifuga el cultivo a 15.000 rpm durante 60 minutos, separándose el sobrenadante del sedimento celular. Se mezcla el sobrenadante con dos volúmenes de alcohol frío (a -20°C), produciéndose la precipitación del exopolisacárido. Tras mantener una noche a -4°C se recoge el polisacárido por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos. El sedimento obtenido se liofiliza o se deseca hasta peso constante. En las condiciones anteriormente señaladas la cepa TK26 produce aproximadamente 5 g de exopolisacárido por litro de medio.

15 *Características del maurano 26*

El polímero origina preparaciones acuosas de una viscosidad semejante a la del xantano a concentración del 0.5% (p/v). Dichas preparaciones son pseudoplásticas (la viscosidad disminuye con el esfuerzo de cizalla) y tixotrópicas (se recupera totalmente la viscosidad inicial cuando cesa el esfuerzo de cizalla). Las soluciones y su viscosidad permanecen estables a diferentes pH. Además resisten la congelación y descongelación y son compatibles con una elevada concentración de sales y sacarosa. La viscosidad de las soluciones del maurano decrece por encima de los 60°C; posteriormente se recupera en un porcentaje elevado respecto a su valor inicial. Este fenómeno favorece enormemente la manipulación de los productos que requieren procesos industriales de mezclado, bombeo, etc.

25 Para determinar las propiedades reológicas del polisacárido se someten a distintos esfuerzos de cizalla en un reómetro CSR10 Bohlin con temperatura controlada. Para una mejor comprensión de ello se presenta la figura 1, en la cual puede verse el comportamiento del polisacárido, frente a distintos parámetros: temperatura, pH y concentración de sales.

30 Explicación de la figura 1. La figura 1 representa la viscosidad a un shear stress de 2 Pa de soluciones del polímero maurano 26 al 0,5% (p/v) en presencia de distintas sales (KCl, MgCl₂, CaCl₂ (5% p/v) y NaCl (7,5% p/v)), pH (3 y 9) y temperaturas (25 y 55°C).

35 El maurano 26 es un excelente estabilizador de emulsiones oleoacuosas (O/A). Este fenómeno está relacionado con su poder viscosizante ya que no tiene actividad tensioactiva. Las fases oleosas emulsionadas pueden ser sustratos de la industria alimentaria (aceite de oliva, aceite de girasol, etc) o de otras áreas (petróleo o derivados, etc). Para ello basta disolver el EPS en la fase acuosa a una concentración del 0.5%. Estas emulsiones son estables en el tiempo y están formadas por gotículas de la fase interna de pequeño y uniforme tamaño. En la tabla que se incluye a continuación se puede comparar la actividad emulgenta del maurano (expresada como porcentaje de la mezcla emulsionada) con la de otros agentes tensioactivos de síntesis, como el polisorbato 60 de amplio uso en la industria alimentaria.

40

(Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

ES 2 220 192 A1

TABLA 1

Actividad emulgente del maurano y otros agentes tensioactivos frente a diversas fases oleosas.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

	Aceite De oliva	Kerosen o	Aceite de girasol	Tetradeca no	Octan o	Aceite Minera l	Crudo
Maurano	80,85	76,53	90,59	77,18	67,22	83,02	98,24
1 h	68,5	54,45	72,14	51,34	60,68	60,02	79,53
24 h							
Tritón X-100	70,08	92,59	65,83	70,24	67,52	61,79	63,75
1 h	61,84	60,32	64,72	65,83	62,39	64,73	60,74
24 h							
Tween 20	61,84	61,99	61,53	59,73	60,17	61,25	62,2
1 h	60,71	61,99	62,52	63,84	61,85	62,39	58,02
24 h							
Sugin 472	54,81	55,48	54,02	54,47	57,47	59,43	50,36
1 h	52,73	49,61	52,88	53,33	50	52,54	
24 h							
Polisorbat 60	62,53	62,83	64,7	61,95	60,71	60,9	85,36
1 h	61,52	62,29	62,80	59,79	60,53	60,19	80,48
24 h							
Xantano	100	90,47	91,42	93,05	95,09	100	100
1h	100	88,98	88,92	90,27	93,25	90,32	94,74
24 h							

ES 2 220 192 A1

Por otra parte, el polímero de Halomonas maura es capaz de absorber elevadas cantidades de metales pesados, destacando el Pb (46.4 mg/g EPS).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Halomonas maura TK26 (CECT 5720), un mutante que sintetiza con alto rendimiento el exopolisacárido mauroano26 **caracterizado** por su número de depósito 5720 en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

10 2. Halomonas maura TK26 (CECT 5720), un mutante que sintetiza con alto rendimiento el exopolisacárido mauroano26 según reivindicación 1, **caracterizada** genéticamente por llevar insertado el transposón mini Tn5:Km2 en el gen de la subunidad E1 del complejo α -ceto ácido deshidrogenasa de cadena ramificada (BCDH) con la secuencia génica mutada por la inserción del transposón que figura en la lista de secuencias.

3. Halomonas maura TK26 (CECT 5720), un mutante que sintetiza con alto rendimiento el exopolisacárido mauroano26 según reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** por la conservación de sus cepas en el siguiente medio de cultivo:

15	Proteosa-peptona (Difco)	5g
	Extracto de levadura (Difco)	3g
	Extracto de Malta (Panreac)	3g
20	Glucosa (Panreac)	10g
	NaCl	17'1g
25	MgCl ₂ .6H ₂ O	3g
	SO ₄ .7H ₂ O	4,3g
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1 g
30	KCl	0,4g
	NaHCO ₃	0,02g
35	NaBr	0,05g
	Agua destilada	c.s.p. 1000 ml

Para preparar un medio sólido hay que añadir un 2% (p/v) de Agar (Difco).

40
45
50
55
60
65

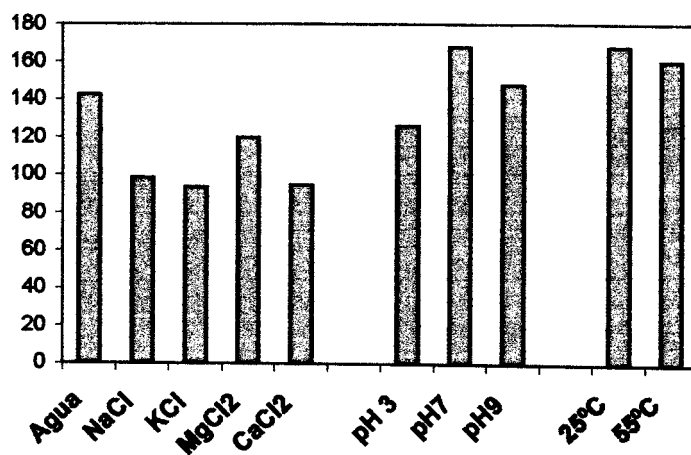


FIGURA 1

ES 2 220 192 A1

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> UNIVERSIDAD DE GRANADA
- <120> Halomonas Maura TK26 (CECT 5720), un mutante que sintetiza con alto rendimiento el exopolisacárido maurano26
- 10 <130> Halomonas Maura TK26 (CECT 5720), un mutante que sintetiza con alto rendimiento el exopolisacárido maurano26
- <140> P 200.202.041
- 15 <141> 2002-09-06
- <210> 1
- 20 <211> 933
- <212> DNA
- 25 <213> Halomonas Maura
- <400>
- 30 ccatggccga ggacgagaag gtgctgtgct tccggcgagga cgtgggcggc ttcggcggcg 60
- tcttccgcgc caccagccac ctgcaggaga agtacgggcg ggcgcgctgc ttcaacaccc 120
- cgctggtgga gcagggcatc atcggcttcg ccaatggcct ggccgcccag ggctcgggtgc 180
- 35 cggtggccga gatccagttt gccgactaca tctttccggc cttcgaccag atcgtcaacg 240
- agaccgcaa gttccgctac cgctcggggg atctcttcaa cgtcggcggg ctgaccatcc 300
- 40 gcgcccccta cggcggcggg atctccggcg gccactatca ctcccagtcc ccggaagcct 360
- atctcgccca tcccccggt ctcaaggctg tggtgcccg cgcaatccctac gaggccaagg 420
- ggttgctgct ggccgccatc cgcgacccgg acccggtgct gttcttcgag cccaagcgcc 480
- 45 tctaccgcgc cgcgaccggc gaggtgcccg aggaggacta ccagctgccc atcggcgagg 540
- ccgaggtcac caaggagggc accgacgtca ccctggtggg ctggggcgcc cagaminin 600
- tggaggtcat cgagcgcgcc gtggagctgg ccgagaagga gggcatctcc tgcgaggtga 660
- 50 tcgacctgcy cagcatcctg ccctgggacg aggacagcgt ggccgagtcg gtgctcaaga 720
- ccggccgcct ggtggtcacc cacgagggcg cgcgcaccgg cggcttcgcc ggcgagatcg 780
- 55 ccgccccat ccaggatcgc tgcttctgt acctggaatc gccatcatg cgcgtgaccg 840
- gtctggatac ccccttcccg ctgacgctgg agaaggagta cctgccggac cacctcaaga 900
- tcttcgaggc cattcgcgag agcgtgaact att 933
- 60
- 65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 220 192

② Nº de solicitud: 200202041

③ Fecha de presentación de la solicitud: 06.09.2002

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12N 1/20

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BOUCHOTROCH, S. et al. "Halomonas maura sp. nov., a novel moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium". INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, 2001, Vol. 51, Nº 5, páginas 1625-1632. Todo el documento.	1-3
A	BOUCHOTROCH, S. et al. "Bacterial exopolysaccharides produced by newly discovered bacteria belonging to the genus Halomonas, isolated from hypersaline habitats in Morocco". JOURNAL OF INDUSTRIAL MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, 2000, Vol. 24, Nº 6, páginas 374-378. Todo el documento.	1-3
A	BOUCHOTROCH, S. et al. "Taxonomic study of exopolysaccharide-producing, moderately halophilic bacteria isolated from hypersaline environments in Morocco". SYSTEMATIC AND APPLIED MICROBIOLOGY, 1999, Vol. 22, Nº 3, páginas 412-419. Todo el documento.	1-3
A	LLAMAS, I. et al. "Transposon mutagenesis in Halomonas eurihalina". RESEARCH IN MICROBIOLOGY, 2000, Vol. 151, Nº 1, páginas 13-18. Todo el documento.	1-3
A	ARIAS, M.S. et al. Rheological properties of an exopolysaccharide produced by the new halophilic bacteria Halomonas maura S-30. Food industry applications". MEDEDELINGEN FACULTEIT LANDBOUWKUNDIGE en TOEGEPASTE BIOLOGISCHE WETENSCHAPPEN UNIVERSITEIT GENT, 2000, Vol. 65, Nº 3B, páginas 599-602. Todo el documento.	1-3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

27.10.2004

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/1