



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 361 308**

⑯ Número de solicitud: **200931117**

⑮ Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑯ Fecha de presentación: **04.12.2009**

⑮ Solicitante/s: **Universidad de Granada**
Cuesta del Hospicio, s/n
18071 Granada, ES

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2011**

⑯ Inventor/es: **Manzanera Ruiz, Máximo;**
González López, Jesús Juan y
Naváez Reinaldo, Juan Jesús

⑯ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.06.2011

⑯ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑯ Título: **Cepa bacteriana CECT7625, usos y producto xeroprotector producido por la misma.**

⑯ Resumen:

Cepa bacteriana CECT7625, usos y producto xeroprotector producido por la misma.

Microorganismo de la especie bacteriana *Rhodococcus* sp. con número de acceso CECT7625. La presente invención también se refiere al uso de dicho microorganismo o de una población del mismo para la producción de una composición xeroprotectora, donde dicha composición comprende acetato, lactato, ácido glutámico, β -hidroxibutirato y fructosa. Además, la presente invención se refiere al uso de la composición xeroprotectora para la conservación de material biológico con un contenido de humedad residual igual o inferior al 10%, donde el material biológico es un organismo invertebrado, una semilla, una plántula, un microorganismo, un órgano aislado, un tejido biológico aislado o una célula, o una molécula con actividad biológica como por ejemplo una enzima con actividad lipasa. Y, la presente invención también se refiere a un método de obtención de la composición xeroprotectora o a un método para la conservación de dicho material biológico.

DESCRIPCIÓN

Cepa bacteriana CECT7625, usos y producto xeroprotector producido por la misma.

5 La presente invención se refiere a un microorganismo de la especie bacteriana *Rhodococcus* sp. con número de acceso CECT7625. Asimismo la presente invención se refiere al uso de dicho microorganismo o de una población del mismo para la producción de una composición xeroprotectora, donde dicha composición comprende acetato, lactato, ácido glutámico, β -hidroxibutirato y fructosa. La presente invención también se refiere al uso de la composición xeroprotectora para la conservación de material biológico con un contenido de humedad residual igual o inferior al
 10 10%, donde el material biológico es un organismo invertebrado, una semilla, una plántula, un microorganismo, un órgano aislado, un tejido biológico aislado o una célula, o una molécula con actividad biológica como por ejemplo una enzima con actividad lipasa. Además, la presente invención se refiere a un método de obtención de la composición xeroprotectora o a un método para la conservación de dicho material biológico.

15 **Estado de la técnica anterior**

La conservación de materiales biológicos mediante deshidratación y osmoconcentración es una tecnología conocida. Cuando la tarea de conservar biomoléculas sensibles se hizo necesaria, el simple secado mediante deshidratación fracasó, ya que se eliminaba el agua estructural, produciendo la desnaturalización posterior y la pérdida de actividad
 20 vital. La liofilización se ha convertido en el método más aceptado para la conservación a largo plazo de biomoléculas sensibles, usándose por ejemplo de forma muy extendida para la conservación de vacunas atenuadas vivas.

Los métodos actuales de conservación requieren de gran costo en energía y generalmente necesitan de almacenaje a bajas temperaturas. En ocasiones, después de su conservación el material biológico tiene una actividad y/o viabilidad
 25 que no alcanza los niveles satisfactorios. Los métodos de conservación, tales como el secado a temperatura ambiente, formulaciones en líquido, el congelado con crioprotectores o la liofilización producen reducciones significativas en la actividad/viabilidad del material conservado.

30 Los procesos usados actualmente son lentos e implican un elevado consumo de energía. Además, la liofilización confiere sólo un nivel modesto de termotolerancia en el producto final, y se requiere aún refrigeración para reducir el deterioro durante el almacenamiento. Éste es un problema particular para vacunas vivas destinadas a usarse en climas tropicales, ya que éstas pierden actividad, con el desafortunado resultado de que los programas de vacunación realizados en el campo en países tropicales, donde el control de la "cadena de frío" es difícil, pueden conducir finalmente a la vacunación de pacientes con vacuna inferior a la estándar o, en algunos casos, inservible.

35 Durante la selección natural evolutiva, ciertas especies de microorganismos, plantas y animales adquirieron la notable y elegante capacidad de tolerar la deshidratación extrema, permaneciendo latentes en medios hostiles durante períodos muy largos de tiempo y aún capaces de adquirir una actividad vital completa una vez hidratadas nuevamente. Ejemplos incluyen la "planta de la resurrección" *Selaginella lepidophylla*, el camarón de mar *Artemia salina*, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* o el tardígrado *Macrobiotus hufelandi*. Estos organismos se denominan criptobióticos y el procedimiento por el que sobreviven se conoce como anhidrobiosis. Todas las especies de animales y plantas que presentan esta capacidad, contienen moléculas protectoras formadoras de cristales amorfos como el disacárido trehalosa (α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranósido).

45 La formación y uso de los cristales amorfos está bien documentada (Manzanera *et al.*, 2002. *Appl Environ Microbiol*, 68: 4328-4333). Algunos de los conservantes que forman estos cristales son adecuados para este tipo de conservación e incluyen hidratos de carbono no reductores como la trehalosa, hidroxiectoina, maltitol, lactitol (4-O- α -D-glucopyranosyl-D-glucitol), palatinato [mezcla de GPS (α -D-glucopiranosil-1-6-sorbitol) y GPM (α -D-glucopiranosil-1-6-manitol)] y sus componentes individuales GPS y GPM. Los glicósidos no reductores de compuestos polihidroxilados tales como neotrehalosa, laconeotrehalosa, galactosil-trehalosa, sacarosa, lactosacarosa, rafinosa, etc. Otros conservantes formadores de cristales amorfos incluyen aminoácidos tales como la hidroxiectoina.

50 La presencia de agua en el estado seco es generalmente inferior a 0,2 g/g de peso celular seco en la mayoría de los criptobióntes. Estos niveles de agua son suficientes para que estos microorganismos resistan la deshidratación extrema, temperaturas elevadas, radiaciones ionizantes o también, en algunas especies de tardígrados, presiones de hasta 600 MPa.

55 Es conocido que las biopelículas (*Subaerial biofilms*), formadas por bacterias del género *Rhodococcus* sp entre otras, son capaces de producir compuestos osmoprotectores, es decir, sustancias extracelulares poliméricas (EPS) (Gorbushina, 2007. *Environmental Microbiology*, 9(7): 1613-1631). Asimismo, Ortega-Morales *et al.* (2007) (Ortega-Morales *et al.* 2007. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 254-264), describen bacterias de las biopelículas de las zonas intermareales tropicales, donde se han aislado bacterias que pertenecen al género *Microbacterium* sp. como fuente de nuevos exopolímeros protectores de las células contra la desecación. Por otra parte, LeBlanc (2008) (LeBlanc, 2008. *Applied and environmental microbiology*, 74(9): 2627-2636), se refiere al microorganismo *Rhodococcus jostii* RHA1, un actinomiceto con capacidades metabólicas favorables para la biorremediación de suelos contaminados, capaz de secretar los osmoprotectores ectoina y trehalosa.

Explicación de la invención

La presente invención se refiere a un microorganismo de la especie bacteriana *Rhodococcus* sp. con número de acceso CECT7625. Asimismo la presente invención se refiere al uso de dicho microorganismo o de una población del 5 mismo para la producción de una composición xeroprotectora, donde dicha composición comprende acetato, lactato, ácido glutámico, β -hidroxibutirato y fructosa. La presente invención también se refiere al uso de la composición xeroprotectora para la conservación de material biológico con un contenido de humedad residual igual o inferior al 10%, donde el material biológico es un organismo invertebrado, una semilla, una plántula, un microorganismo, un 10 órgano aislado, un tejido biológico aislado o una célula, o una molécula con actividad biológica como por ejemplo una enzima con actividad lipasa. Además, la presente invención se refiere a un método de obtención de la composición xeroprotectora o a un método para la conservación de dicho material biológico.

La capacidad para conservar material biológico sensible por períodos de tiempo indefinido en forma activa o viable es de importancia en aplicaciones para los sectores médico, agrícola e industrial. En la presente invención se ofrecen 15 herramientas para solucionar la conservación de material biológico que presenta dificultades para su estabilización. El material biológico preservado con la composición xeroprotectora producida por el microorganismo con nº de acceso CECT7625 es estable por períodos largos de tiempo. Tal como se muestra en los ejemplos de la presente invención, el uso de una composición que contiene cada uno de los componentes por separado para la conservación de la actividad de una enzima lipasa, es decir, la suma del efecto en la conservación de la actividad enzimática de una composición que 20 contiene acetato, o lactato, o ácido glutámico, o β -hidroxibutirato o fructosa, es menor que el efecto de conservación que produce una composición que contiene todos los componentes, es decir, la composición xeroprotectora tiene un efecto sinérgico en su capacidad de conservar material biológico.

Por tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a un microorganismo de la especie bacteriana *Rhodococcus* sp. con número de acceso CECT7625. Dicho microorganismo es tolerante a la desecación. Dicha cepa ha sido depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) el 10 de noviembre de 2009 y le correspondió el nº de depósito CECT7625. La dirección de dicha Autoridad Internacional de depósito es: Universidad de Valencia/Edificio de investigación/Campus de Burjassot/46100 Burjassot (Valencia).

30 En adelante, para hacer referencia a dicha cepa se puede emplear el término “4J2A2”.

La clasificación científica de la cepa CECT7625 de la presente invención es: Reino: *Bacteria*/Filo: *Actinobacterial*/Orden: *Actinomycetales*/Familia: *Nocardiaceae*/Género: *Rhodococcus*.

35 Las características de dicha cepa son:

- Metabolismo caracterizado por oxidación/fermentación, Dextrina, tween 40, tween 80, N-acetil-D-glucosamina, D-arabitol, D-fructosa, ácido D-glucónico, α -D-glucosa, D-manitol, D-manosa, D-psicosa, D-ribosa, D-sorbitol, ácido α -cetovalérico, ácido L-láctico, ácido L-málico, metil piruvato, mono-metil succinato, ácido propiónico, ácido 40 pirúvico, L-alanil-glicina, glicerol, 2'-deoxiadenosina.

- La temperatura máxima tolerada para el crecimiento de esta cepa son 40°C. La temperatura mínima para detectar crecimiento se encontró entre 15°C y 20°C, mientras que su temperatura óptima de crecimiento fue de entorno a 35°C. Fue incapaz de crecer a pH 12 aunque si a pH 9.

45 - El pH mínimo tolerado para el crecimiento de esta cepa se encontró entre pH 5 y pH 7, considerándose éste como pH óptimo para el crecimiento de esta cepa.

- Igualmente fue incapaz de proliferar en medio LB con una concentración de NaCl igual o superior a 2 M, quedando la concentración máxima tolerada entre 0,8 M y 2 M de NaCl. Esta cepa mostró un crecimiento óptimo a 50 una concentración de 0,2 M de NaCl, aunque también fue capaz de proliferar en este medio en ausencia de NaCl.

- Ensayos de sensibilidad a antibióticos mostraron halos de inhibición del crecimiento en los cinco antibióticos ensayados en disco: rifampicina₃₀ (2,83 cm); estreptomicina₂₅ (2,20 cm); tetraciclina₂₀ (0,87 cm); cloramfenicol₅₀ (4,12 cm); kanamicina₃₀ (1,93 cm).

Asimismo, la presente invención también se refiere a un microorganismo derivado del microorganismo depositado con nº de acceso CECT7625. El microorganismo derivado puede producirse de forma intencionada, por métodos mutagénicos conocidos en el estado de la técnica como por ejemplo, el crecimiento de dicho microorganismo original 60 en exposición con conocidos agentes capaces de forzar mutagénesis.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una población bacteriana que comprende el microorganismo depositado con nº de acceso CECT7625. La población bacteriana puede estar formada por otras cepas de microorganismos de cualquier especie. La población bacteriana es un conjunto de células de microorganismos donde al menos 65 hay una célula de dicho microorganismo depositado con nº de acceso CECT7625, en cualquier fase del estado de desarrollo y en cualquier fase de crecimiento, estacional o estacionaria, independientemente de la morfología que presente, en forma de coco, bacilo o morfologías intermedias de las anteriores.

ES 2 361 308 A1

En adelante se podrá hacer referencia al microorganismo o a la población bacteriana como el “microorganismo de la presente invención” o el “microorganismo de la invención”.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere al uso del microorganismo de la invención para la producción 5 de una composición xeroprotectora.

Un aspecto más de la presente invención se refiere a la composición xeroprotectora producida por el microorganismo de la invención. Para referirse a la composición xeroprotectora de la presente invención se puede emplear el término Producto de Ordeñado Bacteriano (POB). El término “composición xeroprotectora” tal como se entiende en 10 la presente invención, se refiere a una composición que previene los efectos adversos de la desecación total o parcial de material de origen biológico o material de origen sintético. El material biológico se refiere a cualquier compuesto producido directamente por un organismo vivo en cualquier estado de desarrollo, en cualquier compartimento celular, sea cual sea la naturaleza, composición o estructura del mismo, o que procede de un organismo que ya no está vivo. Dicho material biológico puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse, una célula, ácido nucleico, proteína, enzima, 15 polisacárido, lípido, fosfolípido, liposomas, virus, partículas virales o cualquier molécula que comprenda cualquiera de los elementos anteriores, o cualquier molécula orgánica que tenga un efecto farmacológico, inmunogénico y/o fisiológico de acción local y/o sistémica. El material biológico puede comprender agentes terapéuticos; agentes anti-infectivos como antibióticos, antivirales; analgésicos o combinaciones de analgésicos; agentes antiartríticos, antiasmáticos, antiinflamatorios, antiplásticos, antipruríticos, antipsicóticos, antipiréticos, antiespasmódicos, preparaciones 20 cardiovasculares (incluyendo bloqueantes de canales de calcio, bloqueadores beta, o antiarrítmicos), agentes contra la hipertensión, diuréticos, vasodilatadores, estimuladores del sistema nervioso central, antitusivos, preparaciones anti resfriados, descongestionantes, agentes de diagnóstico, hormonas, estimuladores del crecimiento óseo, inhibidores de la resorción de la médula ósea, inmunosupresores, relajantes musculares, psicoestimulantes, sedantes, tranquilizantes, 25 proteínas, péptidos o fragmentos de los mismos (tanto naturales, como sintéticos, como productos recombinantes), moléculas de ácidos nucleicos (tanto en forma polimérica de dos o más nucleótidos de ADN o ARN, incluyendo tanto moléculas de cadena doble como de cadena sencilla, construcciones genéticas, vectores de expresión, ARN antisentido, sentido o moléculas ARNi) o nucleótidos (como por ejemplo, pero sin limitarse, el dATP, dCTP, dGTP, dTTP o dUTP, de utilidad en la técnica de PCR, secuenciación, etc). El material de origen sintético se refiere a un tipo de material que no ha sido producido o sintetizado por un organismo vivo directamente sino que ha sido creado por el ser humano como por ejemplo, pero sin limitarse, una secuencia de ADN amplificada por PCR, o una proteína o enzima 30 modificada intencionadamente o no.

Una realización preferida de la presente invención se refiere a la composición xeroprotectora producida por el microorganismo de la invención, o a una composición xeroprotectora sintética, que comprende fructosa, ácido glutámico, 35 β -hidroxibutirato, acetato y lactato.

El término “acetato” se refiere al anión acetato presente en una solución, es decir el anión acetato ($C_2H_3O_2^-$), es un carboxilato y es base conjugada del ácido acético. El término “lactato” se refiere al anión lactato presente en una solución, es decir el anión lactato ($C_3H_5O_3^-$), es un carboxilato y es base conjugada del ácido láctico. El glutamato, 40 forma ionizada del ácido glutámico, se refiere a uno de los 20 aminoácidos esenciales que forman parte de las proteínas. El β -hidroxibutirato (o beta-hidroxibutirato) es el anión que deriva de la disolución del ácido 3-hidroxibutírico. La fructosa (o levulosa) es una cetohexosa (6 átomos de carbono) con formula química $C_6H_{12}O_6$, monosacárido con la misma fórmula empírica que la glucosa pero con diferente estructura.

45 Una realización más preferida se refiere a la composición xeroprotectora producida por el microorganismo de la invención, o a la composición xeroprotectora sintética, que comprende una proporción de entre 35 y 45 de fructosa: 1,4 y 3,4 de ácido glutámico: 0,5 y 1,5 de acetato. Es decir, una proporción (fructosa):(ácido glutámico):(acetato) de (35 a 45):(1,4 a 3,4):(0,5 a 1,5), respectivamente. Una realización aún más preferida se refiere a la composición xeroprotectora donde la proporción de (fructosa):(ácido glutámico):(acetato) es de (38 a 44):(2 a 3):(0,7 a 1,3), respectivamente. Preferiblemente la composición xeroprotectora tiene una proporción de (fructosa):(ácido glutámico):(acetato) de (41):(2,4):(1), respectivamente.

Una realización más preferida se refiere a la composición xeroprotectora producida por el microorganismo de la invención, o a la composición xeroprotectora sintética, que comprende una proporción de entre 14 y 18 de fructosa: 55 3 y 5 de ácido glutámico: 0,6 y 1 de β -hidroxibutirato: 0,5 y 1,5 de acetato: 1 y 2 de lactato. Es decir, una proporción (fructosa):(ácido glutámico):(β -hidroxibutirato):(acetato):(lactato) de (14 a 18):(3 a 5):(0,6 a 1):(0,5 a 1,5):(1 a 2). Una realización aún más preferida se refiere a la composición xeroprotectora donde la proporción de (fructosa):(ácido glutámico):(β -hidroxibutirato):(acetato):(lactato) es de (15 a 17):(3,5 a 4,5):(0,7 a 0,9):(0,7 a 1,2):(1,2 a 1,6). Preferiblemente la composición xeroprotectora tiene una proporción de (fructosa):(ácido glutámico):(β -hidroxibutirato):(acetato):(lactato) de (16):(4):(0,8):(1):(1,4), respectivamente.

El término “proporción” tal como se entiende en la presente invención se refiere a la correspondencia debida 60 de los elementos de la composición (fructosa, ácido glutámico, β -hidroxibutirato, acetato y lactato) relacionados entre sí. Es decir, se refiere a una relación matemática que vincula los elementos de la composición. Para que sirva de ejemplo, la composición xeroprotectora que tiene una proporción de (fructosa):(ácido glutámico):(β -hidroxibutirato):(acetato):(lactato) de (16):(4):(0,8):(1):(1,4), respectivamente, puede tener por ejemplo, concentraciones de (32):(8):(1,6):(2):(2,8) mg de cada elemento respectivamente/ml.

ES 2 361 308 A1

En adelante se podrá hacer referencia a cualquiera de las composiciones anteriores como la “composición de la presente invención” o “composición de la invención”.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de la composición de la invención para la conservación de material biológico con un contenido en humedad residual igual o inferior al 10%. El contenido de humedad residual del material biológico puede ser igual o inferior al 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ó 1% de humedad residual. La conservación de dicho material puede llevarse a cabo mediante la estabilización del mismo. En la presente invención, para referirse a este tipo de material biológico se puede emplear la expresión “material biológico en estado seco”. En estas condiciones, el conservante o estabilizador coalesce para alcanzar un estado no-cristalino, vítreo, y sólido (por ejemplo un cristal amorfo). Las partículas de cristal orgánico que están formadas al secar el material biológico con el estabilizador están cubiertas por el estabilizador que produce una alta estabilidad al reducir drásticamente las reacciones químicas. De esta forma el material biológico seco está incrustado en el cristal amorfo formado por el estabilizador.

El material biológico seco en presencia del estabilizador que forma el cristal amorfo es resistente a plásticos en estado líquido, mientras que el material que no está seco en presencia de estos estabilizadores no es resistente a plásticos en estado líquido.

El material biológico seco en estas formas puede encontrarse en estado no particulado y puede suministrarse en formas por ejemplo, pero sin limitarse, molduras o sólidos en 3 dimensiones como por ejemplo, pero sin limitarse, bloques, pastillas, parches, hojas, bolas, o pepitas de material biológico seco.

El término “humedad residual” tal como se emplea en la presente invención se refiere a la cantidad de humedad que contiene un producto después de pasado por algún tipo de proceso capaz de eliminar agua del mismo. La humedad residual es el porcentaje de masa del producto que corresponde a agua respecto del total de la masa. Es decir, un valor de humedad residual de un producto igual a un 10% significa que 10 g de cada 100 g del producto corresponden a agua. La humedad residual puede ser medida mediante métodos conocidos en el estado de la técnica como por ejemplo, pero sin limitarse, mediante el método titrimétrico, el método azeotrópico o el método gravimétrico.

El término “conservación de material biológico” hace referencia al mantenimiento o cuidado de la permanencia de las características intrínsecas del material biológico.

Una realización preferida se refiere al uso de la composición de la invención para la conservación de material biológico en estado seco, donde el material biológico es un organismo invertebrado, una semilla, una plántula, un microorganismo, un órgano aislado, un tejido biológico aislado o una célula. La célula puede ser procariota o eucariota. La célula puede ser una célula de un microorganismo en cualquier estado de desarrollo. La célula puede ser somática o germinal, vegetal o animal. Dicha célula puede proceder de cualquier organismo o microorganismo y puede presentarse en cualquier estado de diferenciación, como por ejemplo, pero sin limitarse, procedente de un cultivo de un tejido celular o de órganos, esperma, óvulos o embriones. La célula puede ser una célula madre totipotente, multipotente o unipotente. El microorganismo puede ser unicelular o multicelular. El organismo unicelular se selecciona de la lista que comprende, pero sin limitarse, *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. putida*, *Salmonella* spp, *Rhizobium* spp, *Pseudomonas* spp, *Rhodococcus* spp, *Lactobacillus* spp. o *Bifidobacterium* spp. El organismo pluricelular puede ser por ejemplo, pero sin limitarse, un nematodo.

La célula conservada por la composición de la presente invención es una célula viable es decir, es capaz de realizar las funciones normales de la célula incluyendo la replicación y división celular. Por otra parte la célula puede haber sido tratada, manipulada o mutada antes de su conservación. Por ejemplo, pero sin limitarse, una célula puede haberse hecho competente para transformaciones o transfecciones, o puede contener ácidos nucleicos recombinantes. Las células que se conservan pueden formar una población homogénea o heterogénea, por ejemplo, pero sin limitarse, una librería de células en la que cada una contiene una variación de algún ácido nucleico. Preferentemente, las células son células no anhidróbiticas (células sensibles a desecación) como por ejemplo, pero sin limitarse, células procedentes de microorganismos procariotas no anhidrobiontes que generalmente no sean esporulantes.

La conservación del microorganismo puede mejorarse mediante cultivo bajo condiciones que aumenten la concentración intracelular de trehalosa o de otros estabilizadores formadores de cristales amorfos. Por ejemplo, pero sin limitarse, en condiciones de alta osmolaridad (alta concentración de sales) que estimulen la producción intracelular de trehalosa o de otros estabilizantes formadores de cristales amorfos.

El organismo invertebrado es pero sin limitarse, una larva de insecto o un crustáceo. Dichos organismos invertebrados pueden ser preservados en condiciones de desecación, permitiendo la actividad vital del mismo, de modo que, cuando se rehidratan, dichos organismos presentan la capacidad de movimiento. La plántula es una planta en sus primeros estadios de desarrollo, desde que germina hasta que se desarrollan las primeras hojas verdaderas.

La composición de la invención puede usarse para la conservación de material biológico en estado seco, donde el material biológico es un organismo vertebrado perteneciente a la Superclase Tetrapoda (con cuatro extremidades), Clase Amphibia (anfibios) o Clase Reptilia (reptiles), o cualquiera de sus partes (Vernon y Jackson, 1931. The biological bulletin, 60: 80-93). Vernon y Jackson llevaron a cabo un estudio sobre la rana Leopardo (*Rana pipiens*), en el que de forma natural se seca su piel, lengua, bazo, e hígado con una pérdida de agua de entre un 43-81% del contenido de agua total.

ES 2 361 308 A1

Un órgano aislado, o un tejido biológico aislado (incluida la sangre) pueden conservarse mediante la composición de la presente invención. En Serrato *et al.* (2009) pueden observarse resultados de protocolos de criopreservación de tejidos biológicos (Serrato *et al.*, 2009. *Histology and histopathology*, 24: 1531-1540).

5 Una realización más preferida se refiere al uso de la composición de la invención, donde el material biológico es una molécula con actividad biológica. El término “molécula con actividad biológica” tal como se entiende en la presente invención se refiere a una molécula biológica cuyo origen sea un organismo vivo o que haya estado vivo, o derivados o análogos de dicha molécula. El término “derivados” se refiere a moléculas obtenidas por la modificación 10 de una molécula con actividad biológica, que presentan una funcionalidad similar. Por otra parte, el término “análogos” se refiere a moléculas que presentan una función similar a la molécula con actividad biológica.

Según otra realización aún más preferida de la composición de la presente invención la molécula con actividad 15 biológica es una enzima. Una realización todavía más preferida de la presente invención se refiere al uso de la composición de la invención, donde la enzima es una enzima con actividad lipasa. La enzima con actividad lipasa se selecciona de la lista de enzimas con números EC (*Enzyme Commission numbers*) que comprende las hidrolasas de éster carboxílico (EC 3.1.1) EC 3.1.1.1 (Carboxilesterasa), EC 3.1.1.2 (Ariesterasa), EC 3.1.1.3 (Triacilglicerol lipasa), EC 3.1.1.4 (Fosfolipasa A(2)), EC 3.1.1.5 (Lisofosfolipasa), EC 3.1.1.23 (Acilglicerol lipasa), EC 3.1.1.24 (3-oxoadipato enol-lactonasa), EC 3.1.1.25 (1,4-lactonasa), EC 3.1.1.26 (Galactolipasa), EC 3.1.1.32 (Fosfolipasa A(1)), EC 3.1.1.33 (6-acetilglucosa deacetilasa), EC 3.1.1.34 (Lipoproteína lipasa). Preferiblemente la enzima lipasa tiene 20 actividad Triacilglicerol lipasa (EC 3.1.1.3).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de obtención de la composición xeroprotectora de la invención que comprende:

25 a) cultivar el microorganismo de la invención en un medio de cultivo con fructosa como fuente de carbono,
b) deshidratar los microorganismos obtenidos en el cultivo del paso (a) hasta que tengan una humedad residual igual o inferior al 10%,
30 c) rehidratar los microorganismos deshidratados del paso (b) en un medio hipotónico y
d) seleccionar la fracción líquida del producto obtenido en el paso (c) que comprende la composición xeroprotectora.

35 El medio de cultivo es cualquier medio de cultivo conocido en el estado de la técnica para el crecimiento de un microorganismo de la presente invención, por ejemplo pero sin limitarse, el medio mineral M9. Medios ricos como el medio Luria Bertani (LB) en los que hay presentes xeroprotectores, u osmolitos naturales no sirven, porque la bacteria preferiría tomarlos del exterior a sintetizarlos.

40 Una realización preferida de la presente invención se refiere al método de obtención de la composición xeroprotectora, donde el medio de cultivo del paso (a) es sólido. El término “sólido” tal como se entiende en la presente invención se refiere a un medio de cultivo gelificado en mayor o menor grado, es decir, que comprende agar para facilitar su gelificación o cualquier compuesto gelificante.

45 La deshidratación de los microorganismos del paso (b) se lleva a cabo por medio de cualquier técnica conocida en el estado de la técnica. Otra realización preferida de la presente invención se refiere al método, donde la deshidratación de los microorganismos según el paso (b) se lleva a cabo por medio de una solución hipertónica o por medio de una corriente de aire. Preferiblemente la solución hipertónica o la corriente de aire tienen condiciones de esterilidad. La solución hipertónica es una solución que tiene mayor concentración de soluto en el medio externo que en el citoplasma 50 de la células del microorganismo de la presente invención, por tanto, la célula libera agua, es decir, se deshidrata.

La deshidratación de los microorganismos, descrita en el paso (b), se lleva a cabo en un medio hipotónico. El medio hipotónico o solución hipotónica es una solución que tiene menor concentración de soluto en el medio externo que en el citoplasma de la célula del microorganismo de la presente invención, por tanto, la célula recupera agua, es decir, se rehidrata. Una realización preferida más se refiere al método, donde el medio hipotónico para la rehidratación de los microorganismos según el paso (c) es agua parcial o totalmente destilada, parcial o totalmente desionizada o parcial o totalmente desmineralizada.

Las células y el medio hipotónico han de estar en contacto al menos 5 minutos. Preferiblemente estarán en contacto 60 al menos 20 minutos en agitación. La obtención del medio que contiene las sustancias estabilizantes se realizará por cualquier método que garantice la separación de células del contenido líquido, preferiblemente mediante centrifugado suave, seguido de un paso de filtración. Preferiblemente se utilizarán filtros de 0,4 micrómetros de diámetro de poro.

Otra realización preferida se refiere al método, donde además, la fracción líquida del paso (d) se deshidrata hasta 65 que el producto xeroprotector tenga una humedad residual igual o inferior al 10%.

El producto xeroprotector de la invención se puede separar del medio de cultivo por cualquier método de concentración. Preferiblemente se utilizarán secadores de tipo liofilizador que produzcan el estabilizador en estado seco. Las

moléculas estabilizadoras se podrán disolver o dispersar en una proporción de entre el 10 y el 30%. Esta disolución o dispersión se añade al material biológico que se desee conservar y se someterá a desecación.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al método para la conservación de material biológico que comprende:

- 5 a) mezclar la composición de la invención con una muestra de material biológico, y
- b) deshidratar el producto obtenido en el paso (a) hasta una humedad residual igual o inferior al 10%.

10 Una realización preferida se refiere al método para la conservación de material biológico, donde el material biológico del paso (a) es un organismo invertebrado, una semilla, una plántula, un microorganismo, un órgano aislado, un tejido biológico aislado o una célula.

15 Otra realización preferida se refiere al método para la conservación de material biológico, donde el material biológico es una molécula con actividad biológica.

Una realización más preferida de la presente invención se refiere al método, donde la molécula con actividad biológica es una enzima. Según una realización más preferida de la presente invención la enzima es una lipasa.

20 Otra realización aún más preferida se refiere a cualquiera de los métodos para la conservación de material biológico, donde la deshidratación de la mezcla de la composición xeroprotectora y del material biológico según el paso (b) se lleva a cabo por medio de una solución hipertónica o por medio de una corriente de aire.

25 Cualquier método para la conservación de material biológico de la presente invención permite el empleo de dicho material en procesos de manufacturación en los cuales el material biológico sería demasiado inestable si no estuviera conservado mediante el uso de la composición de la presente invención. La invención incluye extrusiones o moldes en los que se incluye el material conservado por cualquier método de la presente invención. Un método de producción de una moldura que contenga biomaterial activo mediante estabilizadores puede incluir soluciones de materiales plásticos.

30 Por ejemplo una moldura de material plástico con biomaterial activo encapsulado puede ser útil como componentes de biosensores. Por ejemplo un biosensor puede incluir bacterias que sean capaces de detectar sustancias tóxicas, patógenos o toxicidad en general.

35 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

40 **Descripción de las figuras**

Con la intención de complementar la descripción que se ha llevado a cabo, así como de ayudar a un mejor entendimiento de las características de la invención, de acuerdo con algunos ejemplos realizados, se muestran aquí, con carácter ilustrativo y no limitante, las siguientes figuras:

45 Fig. 1. *Muestra la viabilidad de los distintos aislados bacterianos seleccionados mediante exposición a cloroformo tras 24 horas de secado al aire.*

Las barras de error muestran la desviación estándar de al menos tres réplicas.

50 Los microorganismos representados en la figura son:

1J3A, 1J14, 2J2, 2J8A, 2J12B, 2J15B, 2J16A, 2J30, 3J18, 6J30, *Acitenobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas putida*, además de la cepa 4J2A2.

55 Fig. 2. *Muestra la actividad lipasa (en porcentaje relativo a un 100% de actividad del control positivo) tras secado de la enzima lipasa en presencia de los distintos componentes de productos del ordeñado bacteriano al 10% (p/v).*

60 El control positivo es trehalosa al 10%. El control negativo (-) se corresponde con la ausencia de compuesto alguno como aditivo previo a la desecación de la enzima. 4J2A2 es el valor de actividad lipasa registrada tras la estabilización por secado y posterior reconstitución de la enzima en presencia de POB extraídos de la cepa 4J2A2 mediante choque hiper/hipoosmótico respectivamente. 4J2A2D es la actividad lipasa registrada tras la estabilización por secado y posterior reconstitución de la enzima en presencia de POBSIA (Producto de Ordeñado Bacteriano extraído

65 por Secado mediante Incubación al Aire) extraídos de la cepa 4J2A2 mediante tratamiento de secado y posterior hidratación.

Fig. 3. Muestra la actividad lipasa (en porcentaje relativo a un 100% de actividad del control positivo) tras secado de la enzima lipasa en presencia de los distintos compuestos químicos (fructosa, ácido glutámico, beta-hidroxibutirato, acetato y lactato al 10%).

5 El control positivo (C+) es trehalosa al 10%. El control negativo (C-) se corresponde con la ausencia de compuesto alguno como aditivo previo a la desecación de la enzima. 4J2A2D sintético es la mezcla de fructosa, ácido glutámico, beta-hidroxibutirato, acetato y lactato al 10% en la misma proporción encontrada en el POBSIA de la cepa 4J2A2 mediante tratamiento de secado y posterior hidratación siendo la proporción de 16:4:0,8:1:1,4 respectivamente.

10 Fig. 4. Muestra la evolución de la supervivencia de *Escherichia coli* MC4100 frente a desecación mediante el empleo del producto de ordeñado bacteriano (POB) así como los extraídos por Secado mediante Incubación al Aire (POBSIAs).

15 4J2A2 es el valor de actividad lipasa registrada tras la estabilización por secado y posterior reconstitución de la enzima en presencia de POB extraídos de la cepa 4J2A2 mediante choque hiper/hipoosmótico respectivamente. 4J2A2D es la actividad lipasa registrada tras la estabilización por secado y posterior reconstitución de la enzima en presencia de POBSIA.

20 PVP indica que además se ha adicionado 1,5% de polivinilpirrolidona (PVP).

SIN es sintético.

T es trehalosa.

25 Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos ilustrativos y de carácter no limitante, realizados por los inventores que describen el aislamiento de la cepa de la presente invención así como la capacidad de producción 30 de compuestos xeroprotectores. En adelante se puede hacer referencia a la cepa CECT7625 con el término “4J2A2”.

Ejemplo 1

35 *Aislamiento del microorganismo 4J2A2 (CECT7625), extracción de POB (Productos del Ordeñado Bacteriano) y ensayo de xeroprotección de enzimas*

1.2. Aislamiento de la cepa 4J2A2 (CECT7625)

40 Se homogeneizó 1 g de suelo seco, procedente de Granada (37.182 Latitud N y 3.624 Longitud O), no expuesto a lluvia, ni riego, por un periodo superior a tres meses. El suelo se tomó del área circundante a raíces de adelfa (*Nerium oleander*). Las muestras fueron homogeneizadas para obtener un grano de tierra fino que garantizara su contacto con el cloroformo. La tierra se depositó en viales de vidrio a los que se les añadió 3 ml de cloroformo puro. Tras la adición del cloroformo se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación esporádica para maximizar el contacto de la muestra con el disolvente. Para eliminar el cloroformo de las muestras una vez transcurrido el tiempo 45 de contacto, las muestras de suelo fueron depositadas en placa petri de vidrio estéril sin tapadera hasta completar la evaporación del cloroformo. Una vez secas las muestras de suelo se resuspendieron en 10 ml de TSB. Con las suspensiones de suelo se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en placas de TSA que se incubaron 48 horas a 30°C. Trascurrido este tiempo se cuantificó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de cada muestra. Así, se detectaron $2 \cdot 10^5$ UFC/g de suelo en las muestras sin tratar, mientras que estas se redujeron a 50 $1,3 \cdot 10^5$ UFC/g de suelo tras 30 minutos de tratamiento.

55 Se seleccionaron aleatoriamente 36 cepas y para identificar las cepas que producían esporas se realizó un ensayo basado en la diferente sensibilidad de las células vegetativas con respecto a las esporas al tratamiento con calor y en base al método descrito por Vilchez y colaboradores (Vilchez *et al.*, 2008. *Extremophiles*, 12: 297-299). De esta forma se tomaron colonias independientes procedentes de placas de TSA de al menos 24 horas de crecimiento. Estas colonias se resuspendieron en 1 ml de solución M9 en microtubos estériles de 1,5 ml. Seguidamente se sembraron 10 μ l de esta suspensión en TSA. Acto seguido se incubó el resto de la suspensión en termobloque *Mixing Block* MB-102 a 72°C durante 30 minutos. Nuevamente se tomaron 10 μ l de cada muestra y se sembraron en placa de TSA. Aquellas cepas con capacidad para tolerar el tratamiento con calor se consideraron como esporulantes, mientras que aquellas que no toleraron el tratamiento por calor se consideraron no esporulantes. Como controles positivos y negativos se utilizaron 60 colonias de *Bacillus pumilus* y de *Burkholderia cepacia* respectivamente. La proporción de cepas esporulantes pasó de niveles inferiores al 40% para muestras no tratadas a niveles superiores al 50% tras 30 min de exposición de las muestras de suelo al cloroformo.

65 Con el fin de analizar la capacidad de tolerar la desecación de las cepas aisladas no esporulantes se realizó un estudio de desecación al aire. En este ensayo se incluyó una cepa de *Acinetobacter calcoaceticus* (PADD68) aislada del desierto de Tabernas (Almería) identificada como tolerante a la desecación en un estudio previo y que se utilizó como control positivo. Además también se incluyó en el estudio células de *Pseudomonas putida* KT2440 que se utilizaron

como controles negativos al ser una cepa sensible a la desecación (Antheunisse *et al.*, 1981. Antonie Leeuwnhoek, 47: 539-545; Manzanera *et al.*, 2002. Appl. Environ. Microbiol., 68: 4328-4333). Para este ensayo se utilizaron colonias independientes de las 17 cepas identificadas como no esporulantes aisladas en el estudio anterior y procedentes de placas de TSA de 72 horas para calcular su nivel de tolerancia a la desecación tal y como se indica a continuación.

5 Para calcular la tolerancia a la desecación se partió de colonias aisladas procedentes de placas de TSA de 48 horas de crecimiento. Utilizando un asa estéril se tomó una única colonia que se resuspendió en 1 ml de solución M9 estéril. Partiendo de esta suspensión celular se realizaron diluciones seriadas que se sembraron en placas de TSA con objeto de identificar el número de UFC/ml de partida. Por otra parte se tomaron 100 μ l de cada suspensión y se depositaron en gotas de 5-10 μ l sobre microplacas de petri estériles sin medio. Las microplacas se situaron bajo una corriente de aire estéril en una campana de flujo laminar durante 24 horas. Las placas quedaron secas tras 2-3 horas de incubación. Transcurridas 24 horas de incubación se resuspendieron en 1 ml de solución M9 estéril. Partiendo de esta solución se realizaron diluciones seriadas que se sembraron en placas de TSA. Del recuento de UFC/ml de esta segunda siembra se calcularon las proporciones de supervivencia en referencia al primer conteo. Estos ensayos 10 se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como la media de los tres ensayos en porcentaje, tomando como referencia del 100% los datos húmedos. La desviación estándar a la media permitió el cálculo de la T de student para estudiar si las diferencias en supervivencia fueron significativas. De las 17 cepas aisladas en estas condiciones 15 se identificó el microorganismo 4J2A2 por ser una cepa con niveles de tolerancia a la desecación significativamente superiores a las del control positivo *Acinetobacter calcoaceticus* (PADD68). Dicha cepa 4J2A2 pertenece al género 20 *Rhodococcus* sp. Estos resultados supusieron un 17% de aislados tolerantes a la desecación frente a un 0,5% de los aislados de las mismas muestras de suelo sin tratar con cloroformo. Esta cepa se caracterizó mediante secuenciación del ADNr 16S y comparación de la secuencia con los presentes en la bases de datos, así como mediante estudios metabólicos BIOLOG e hibridación del ADN-ADN con la especie más cercana. La Fig. 1 muestra los valores de tolerancia de las cepas aisladas.

25 *1.2. Extracción de productos del ordeñado bacteriano*

Para la extracción de los productos del ordeñado bacteriano y con el fin de identificar las moléculas acumuladas con 30 capacidad para proteger biomoléculas sensibles a la desecación se recurrió a una estrategia basada en tres pasos. En un primer paso se realizó una extracción de las moléculas acumuladas mediante una variación de la técnica conocida como "ordeñado bacteriano" generada por los inventores. En un segundo paso se realizó un ensayo de xeroprotección con las sustancias obtenidas para identificar la capacidad de las mismas para proteger enzimas frente a la desecación.

35 Dado que la producción y acúmulo de sustancias xeroprotectoras se realizó en medio con minerales, se procedió a identificar las fuentes de carbono más apropiadas para el cultivo de las cepas en medio mineral M9. Para la obtención de sustancias con capacidad xeroprotectora se cultivaron en medio mineral con la fuente de carbono apropiada (fructosa) las células de dicha cepa hasta la obtención de una biomasa suficiente. Tras este acúmulo, las células se depositaron sobre placas del mismo medio con agar para la producción de medio sólido. Entre las células y el medio se depositó un filtro estéril de 0,4 micras para permitir el paso de nutrientes a las células y su posterior recogida y manipulación. 40 Las placas con filtros y células se sometieron a un secado por corriente de aire estéril durante 24 horas. Como control positivo se incluyó *Halomononas elongata*, dado que es una cepa reconocida como halotolerante (Saber y Galinski, 1998. Biotechnol. Bioeng., 57: 306-313) y a *P. putida* KT2440 como cepa halosensible (De Castro *et al.*, 2000. Appl. Environ. Microbiol., 66:4142-4144).

45 Con este fin se inocularon la cepa seleccionada como hipertolerante a desecación 4J2A2. Además se incluyó a *H. elongata* como control positivo dado que ya había sido empleada por Sauer y Galinski para la obtención de hidroxietoína, y como control negativo se incluyó *E. coli* como ejemplo de cepa halo y xerosensible. Dichos inóculos se incubaron en agitación durante 48 horas. A continuación, se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 10.000 rpm en una centrifuga Beckman Avanti-J25 y se retiró la fracción sobrenadante, resuspendiendo el sedimento 50 bacteriano en 20 ml de solución M9 estéril y se depositaron sobre filtros. Tras 24 horas, los filtros, sometidos a desecación mediante una corriente de aire estéril, se separaron del medio y se depositaron en tubos con agua destilada estéril dejando incubar 20 minutos a 30°C y 150 rpm. Consecutivamente se repitió el mismo proceso de centrifugado, se desechó el precipitado bacteriano y se filtró el sobrenadante (utilizando un filtro de 0,22 μ m). El producto filtrado de cada muestra se dividió en dos fracciones, una de las cuales se utilizó para determinar la actividad xeroprotectora del 55 sobrenadante (fracción de ordeñado) y la otra para la identificación y caracterización de los compuestos presentes en esta fracción. Ambas fracciones se sometieron a un proceso de secado utilizando un liofilizador (*Labconco Freezone 6*) durante 48 horas obteniéndose un sedimento que fue resuspendido en 100 μ l de agua milliQ estéril. Una vez liofilizado, el Producto de Ordeñado Bacteriano (POB) se solubilizó en 100 microlitros de agua. Estas soluciones de POBs se utilizaron en estudios de xeroprotección.

60 En la tabla 1 se pueden observar las composiciones de los productos de ordeñado bacteriano de la cepa 4J2A2 tras su extracción mediante choque hiper/hipoosmótico (4J2A2), o tras su extracción por secado mediante incubación al aire (4J2A2D). Asimismo, en la Fig. 3 se muestra la actividad lipasa (en porcentaje relativo a un 100% de actividad del control positivo) tras secado de la enzima lipasa en presencia de los distintos compuestos químicos de la 65 composición 4J2A2D sintética (fructosa, ácido glutámico, beta-hidroxibutirato, acetato y lactato al 10%). El control positivo es trehalosa al 10%. El control negativo se corresponde con la ausencia de compuestos como aditivo previo a la desecación de la enzima. 4J2A2D sintético es la mezcla de fructosa, ácido glutámico, beta-hidroxibutirato, acetato y lactato al 10% en la misma proporción encontrada en el POBSIA de la cepa 4J2A2 mediante tratamiento de secado

ES 2 361 308 A1

por incubación al aire y posterior hidratación siendo la proporción de fructosa, ácido glutámico, beta-hidroxibutirato, acetato y lactato, de 16:4:0,8:1:1,4 respectivamente.

Tal como puede observarse en dicha Fig. 3, la combinación de los compuestos fructosa, ácido glutámico, beta-hidroxibutirato, acetato y lactato (en igual proporción que la mostrada en la tabla 1 (4J2A2D) presenta un efecto sinérgico en la conservación de la actividad lipasa ya que la suma de la actividad lipasa mostrada por composiciones que contienen los compuestos de forma aislada es menor que el resultado obtenido con dicha mezcla.

10

TABLA 1

Composición del producto de ordeñado bacteriano (POB) de la cepa 4J2A2

15

20

25

4J2A2		4J2A2D	
Fructosa	41,3	Fructosa	16,59
Acetato	1	Acetato	1
Ac. glutámico	2,38	Ac. glutámico	4,25
		B-hidroxibutirato	0,84
		Lactato	1,41

30

1.3. Ensayo de xeroprotección de enzimas

El objetivo de este ensayo fue determinar la capacidad de la fracción producto del ordeñado bacteriano para proteger enzimas frente a la desecación. Para ello se utilizó la enzima lipasa. Partiendo de 1 μ l que contenía 0,00554 unidades de lipasa de *Burkholderia cepacia* (Sigma-Aldrich 62309-100 mg) se adicionaron 15 μ l de la fracción producto del ordeñado bacteriano a estudiar. Como control positivo se adicionaron 15 μ l de una solución al 10% de trehalosa a 1 μ l (0,00554 U) de solución de lipasa y como control negativo se añadió 15 μ l de agua a 1 μ l (0,00554 U) de solución de lipasa. Las mezclas de 16 μ l con lipasa se depositaron en un microtubo de 2 ml de capacidad y se secaron a 50°C durante 120 minutos. Una vez secas se incubaron a 100°C durante 5 minutos. Finalmente fueron almacenadas en un desecador a temperatura ambiente durante 24 horas. Pasado el tiempo de incubación, las reacciones se resuspendieron en 50 μ l de una solución de TrisHCl (50 mM) y se transfirieron a un microtubo junto con 950 μ l de Tris HCl (50 mM) pH8 y 1 ml de Solución de Sustrato. La determinación de la capacidad xeroprotectora de cada fracción producto de ordeñado bacteriano (POB) se determinó por el ensayo de medición de la actividad lipasa.

Para la medida de la actividad lipasa se utilizó una variación del método descrito por Gupta y colaboradores (2002) consistente en la cuantificación espectrofotométrica del *p*-nitrofenol liberado por la enzima lipasa de *Burkholderia cepacia* (Sigma-Aldrich 62309-100 mg) a partir del sustrato *p*-nitrofenol palmitato (pNPP) (Gupta *et al.*, 2002. Analytical Biochemistry, 311: 98-99). Para ello se utilizó 1 ml de medio libre de células (985 μ l de Tris-HCl 0,05M junto a 15 μ l de POB obtenido por el método del “ordeñado bacteriano”) mezclado con 1 ml de solución sustrato de un cultivo en fase estacionaria. Esta mezcla de ensayo se incubó a 30°C durante 30 minutos en microtubos estériles de 2 ml. La reacción se paró mediante incubación a 100°C durante 4 minutos en termobloque y 2 minutos a -20°C. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro Hitachi U-2000 a una longitud de onda de 410 nm. La solución sustrato (SS) se preparó mezclando 10 ml de solución A (30 mg de pNPP en 10 ml de isopropanol) con 90 ml de solución B (0,1 g de goma arábiga y 0,4 ml de Tritón X-100 en 90 ml tampón Tris-HCl 50 mM pH8). La mezcla de solución A y B se agitó suavemente hasta su total disolución. La Fig. 2 muestra los valores de tolerancia de las cepas aisladas.

55

Ejemplo 2

Ensayo de xeroprotección de microorganismos

60 El objetivo de este ensayo fue determinar la capacidad para proteger células vivas de *Escherichia coli* MC4100 frente a desecación mediante el empleo del producto de ordeñado bacteriano (POB) así como los extraídos por Secado mediante Incubación al Aire (POBSIAs) de diversas cepas xerotolerantes de forma análoga a la descrita por Manzanera *et al.*, (2002) (Manzanera *et al.*, 2002. Applied and Environmental Microbiology 68: 4328-33). Para ello se utilizó un preinóculo de *E. coli*, a partir del cual se inoculó medio mínimo más glucosa como fuente de carbono adicionados de 0,6 M de NaCl hasta alcanzar una densidad óptica inicial de 0,05. Tras 12 horas de incubación a 37°C en agitación, se centrifugaron alícuotas de 1 ml del cultivo crecido. Las células de *E. coli* se resuspendieron en una solución al 10% de los POBs o POBSIAs extraídos de las células xerotolerantes (extraídos según se describe anteriormente) y

ES 2 361 308 A1

además, 1,5% de polivinilpirrolidona (PVP). Igualmente se realizó la misma experiencia mediante la combinación y mezcla de sustratos comerciales identificados en POBs y POBSIAs en iguales proporciones, a los que se llamaron POB *sintético* o POBSIA *sintético* en contraposición al directamente extraído de células que llamamos *natural*. En el caso de los POB/POBSIA *sintéticos* la mezcla se realizó en una solución al 34,2%. La suspensión de células en las 5 distintas soluciones se sometieron a condiciones de desecación por vacío sin congelación, en un congelador-desecador modificado (Dura - Stop μ P; FTS Systems, Stone Ridge, NY) a 30°C de temperatura media y 100 mTorr (2Pa; 2×10^{-5} atmósferas) durante 20 segundos, con una rampa de temperatura de 2,5°C/min con 15 minutos de pausa después de cada incremento de 2°C, hasta llegar a la temperatura máxima de 40°C.

10 Las muestras se sellaron al vacío y se almacenaron a 30°C hasta su ensayo de viabilidad a tiempo 1, 15 y 30 días. Pasado este tiempo las muestras se resuspendieron en 1 ml de LB y se realizaron ensayos de viabilidad mediante siembra en placa de LB sólido que se incubaron 24 horas a 37°C, para el conteo de UFC y comparación con las UFC 15 antes del secado, para de esta forma poder calcular la supervivencia de las muestras.

15 En la Fig. 4 se observa cómo las composiciones sintéticas POBs y POBSIAs de la cepa 4J2A2 produjeron un aumento de la supervivencia de los microorganismos respecto de la supervivencia experimentada por dichos microorganismos mediante una solución de trehalosa, cuando las soluciones estaban al 34,2% de dichos compuestos xeroprotectores y durante el primer día de conservación así como a las dos semanas. Se observa que la aportación del PVP 20 1,5% a la supervivencia es nula.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Microorganismo de la especie bacteriana *Rhodococcus* sp. con número de acceso CECT7625.
- 5 2. Población bacteriana que comprende el microorganismo según la reivindicación 1.
3. Uso del microorganismo según la reivindicación 1 o de la población bacteriana según la reivindicación 2 para la producción de una composición xeroprotectora.
- 10 4. Composición xeroprotectora producida por el microorganismo según la reivindicación 1 o por la población bacteriana según la reivindicación 2.
- 15 5. Composición según la reivindicación 4 que comprende fructosa, ácido glutámico, β -hidroxibutirato, acetato y lactato.
6. Composición según la reivindicación 5 que comprende una proporción de fructosa:ácido glutámico:acetato, de entre (35 y 45):(1,4 y 3,4):(0,5 y 1,5) respectivamente.
- 20 7. Composición según la reivindicación 6, donde la proporción de fructosa:ácido glutámico:acetato es de entre (38 y 44):(2 y 3):(0,7 y 1,3), respectivamente.
8. Composición según la reivindicación 5 que comprende una proporción de fructosa:ácido glutámico: β -hidroxibutirato:acetato:lactato, de entre (14 y 18):(3 y 5):(0,6 y 1):(0,5 y 1,5):(1 y 2), respectivamente.
- 25 9. Composición según la reivindicación 8, donde la proporción de fructosa:ácido glutámico: β -hidroxibutirato:acetato:lactato es de entre (15 y 17):(3,5 y 4,5):(0,7 y 0,9):(0,7 y 1,2):(1,2 y 1,6), respectivamente.
10. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9 para la conservación de material biológico con un contenido de humedad residual igual o inferior al 10%.
- 30 11. Uso de la composición según la reivindicación 10, donde el material biológico es un microorganismo o una célula.
12. Uso de la composición según la reivindicación 10, donde el material biológico es un organismo invertebrado, una semilla, una plántula, un órgano aislado o un tejido biológico aislado.
- 35 13. Uso de la composición según la reivindicación 10, donde el material biológico es una molécula con actividad biológica.
14. Uso de la composición según la reivindicación 13, donde la molécula con actividad biológica es una enzima.
- 40 15. Uso de la composición según la reivindicación 14, donde la enzima es una lipasa.
16. Método de obtención de la composición xeroprotectora según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9 que comprende:
- 45 a) cultivar el microorganismo de la reivindicación 1 o la población de la reivindicación 2 en un medio mineral con fructosa como fuente de carbono,
- b) deshidratar los microorganismos obtenidos en el cultivo del paso (a) hasta que tengan una humedad residual igual o inferior al 10%,
- 50 c) rehidratar los microorganismos deshidratados del paso (b) en un medio hipotónico, y
- d) seleccionar la fracción líquida del producto obtenido en el paso (c) que comprende la composición xeroprotectora.
- 55 17. Método según la reivindicación 16, donde el medio mineral del paso (a) es sólido.
18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 16 ó 17, donde la deshidratación de los microorganismos según el paso (b) se lleva a cabo por medio de una solución hipertónica o por medio de una corriente de aire.
- 60 19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, donde el medio hipotónico para la rehidratación de los microorganismos según el paso (c) es agua parcial o totalmente destilada, desionizada o desmineralizada.

ES 2 361 308 A1

20. Método según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, donde además, la fracción líquida del paso (d) se deshidrata hasta que el producto xeroprotector tenga una humedad residual igual o inferior al 10%.

21. Método para la conservación de material biológico que comprende:

- 5 a) mezclar la composición xeroprotectora según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9 con una muestra de material biológico, y
- 10 b) deshidratar el producto obtenido en el apartado (a) hasta una humedad residual igual o inferior al 10%.

22. Método según la reivindicación 21, donde el material biológico es un microorganismo o una célula.

23. Método según la reivindicación 21, donde el material biológico del paso (a) es un organismo invertebrado, una 15 semilla, una plántula, un órgano aislado o un tejido biológico aislado.

24. Método según la reivindicación 21, donde el material biológico es una molécula con actividad biológica.

25. Método según la reivindicación 24, donde la molécula con actividad biológica es una enzima.

20 26. Método según la reivindicación 25, donde la enzima es una lipasa.

25 27. Método según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26, donde la deshidratación de la mezcla de la composición xeroprotectora y del material biológico según el paso (b) se lleva a cabo por medio de una solución hipertónica o por medio de una corriente de aire.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 361 308 A1

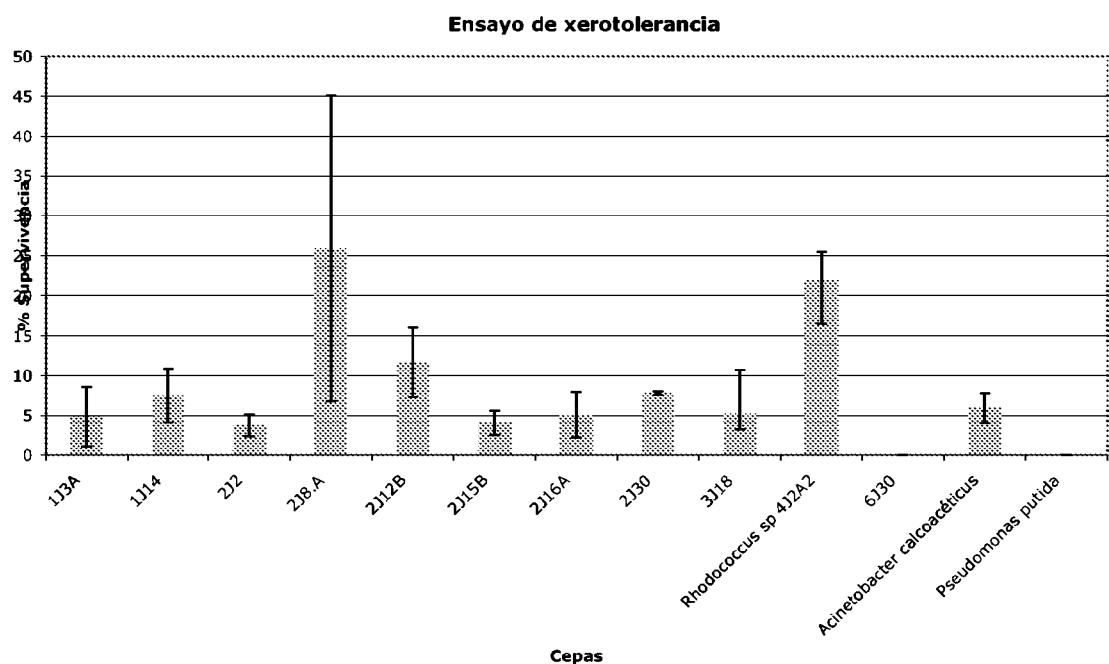


FIG. 1

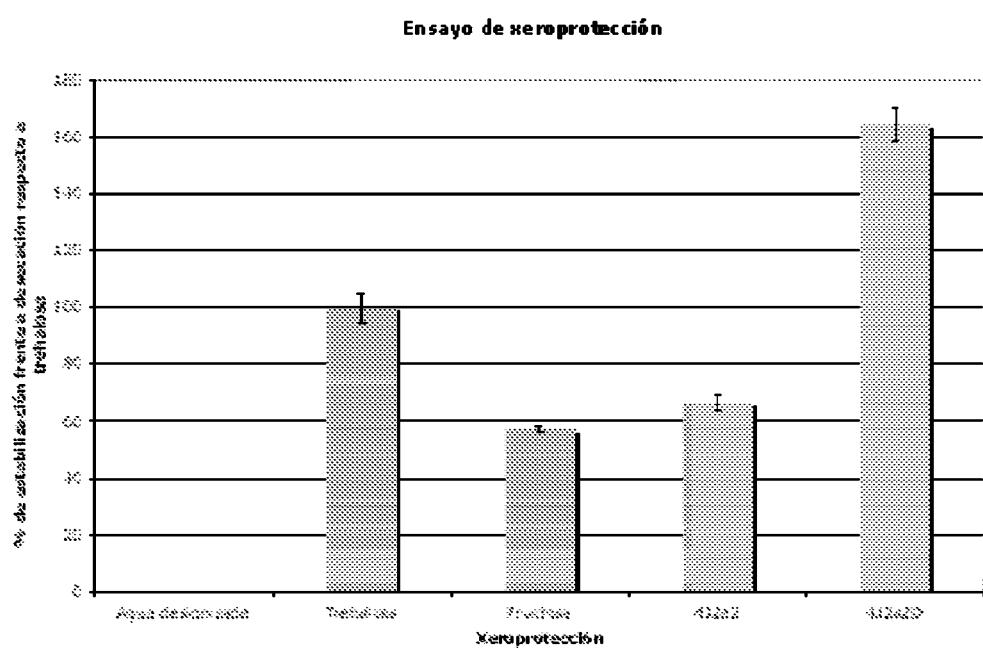


FIG. 2

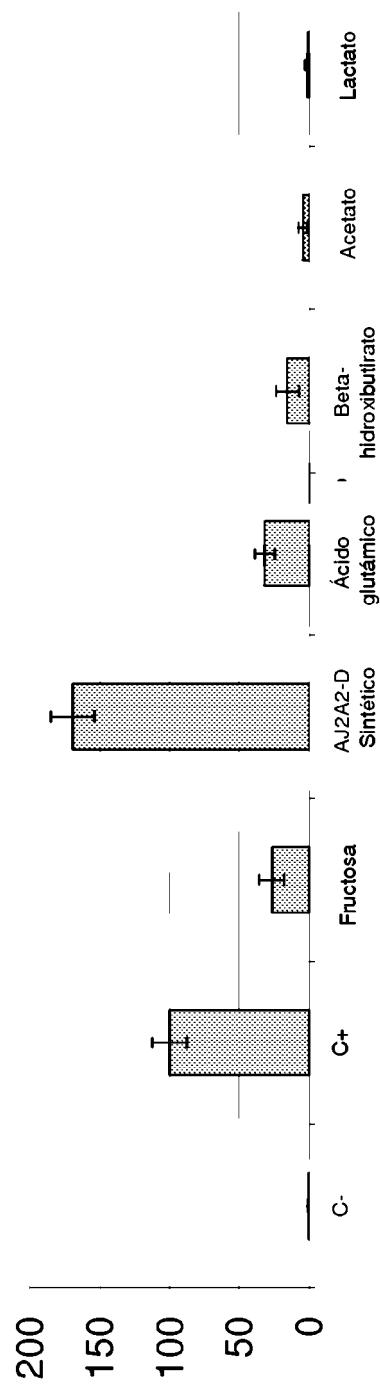


FIG. 3

Evolución de la supervivencia en el tiempo

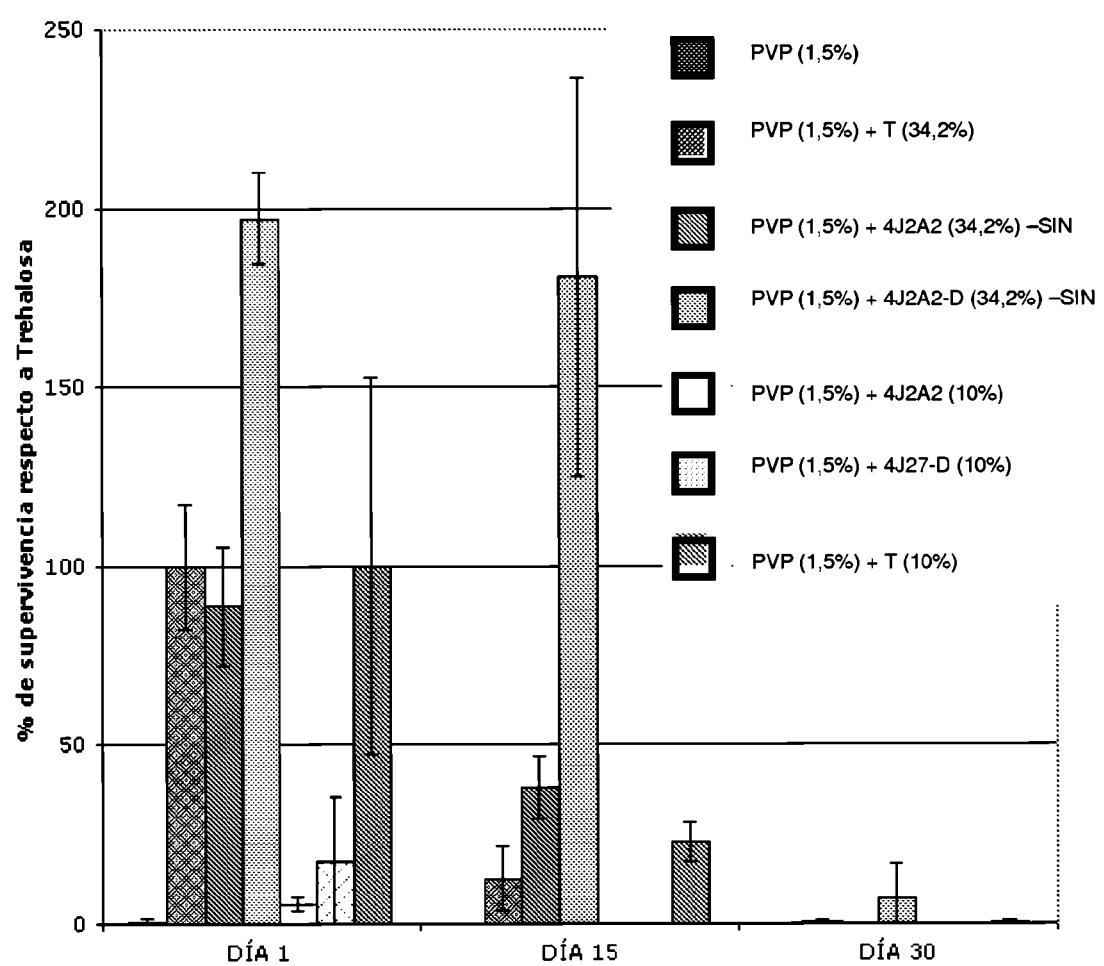


FIG. 4



②1 N.º solicitud: 200931117

②2 Fecha de presentación de la solicitud: 04.12.2009

③2 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤1 Int. Cl.: **C12N1/20** (2006.01)
C12R1/01 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	LEBLANC J.C., et al. Global response to desiccation stress in the soil actinomycete <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1. 2008. <i>Applied and Environmental Microbiology</i> . Vol. 74, No. 9, páginas 2627-2636.	1-27
A	SHUKLA M., et al. Multiple-stress tolerance of ionizing radiation-resistant bacterial isolates obtained from various habitats: correlation between stresses. 2007. <i>Current Microbiology</i> . Vol. 54, páginas 142-148.	1-27
A	ALVAREZ H.M., et al. Physiological and morphological responses of the soil bacterium <i>Rhodococcus opacus</i> strain PD630 to water stress. 2004. <i>FEMS Microbiology Ecology</i> . Vol. 50, páginas 75-86.	1-27
A	WANG Y., et al. Sequence and expression of the <i>bpdC1C2BADE</i> genes involved in the initial steps of biphenyl/chlorobiphenyl degradation by <i>Rhodococcus</i> sp. M5. 1995. <i>Gene</i> . Vol. 164, páginas 117-122.	1-27

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 09.05.2011	Examinador I. Rueda Molins	Página 1/4
--	-------------------------------	---------------

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.05.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-27 Reivindicaciones	SI NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-27 Reivindicaciones	SI NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	LEBLANC J.C., et al. Global response to desiccation stress in the soil actinomycete <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1. <i>Applied and Environmental Microbiology</i> . Vol. 74, No. 9, páginas 2627-2636.	2008
D02	SHUKLA M., et al. Multiple-stress tolerance of ionizing radiation-resistant bacterial isolates obtained from various habitats: correlation between stresses. <i>Current Microbiology</i> . Vol. 54, páginas 142-148.	2007
D03	ALVAREZ H.M., et al. Physiological and morphological responses of the soil bacterium <i>Rhodococcus opacus</i> strain PD630 to water stress. 2004. <i>FEMS Microbiology Ecology</i> . Vol. 50, páginas 75-86.	2004
D04	WANG Y., et al. Sequence and expression of the <i>bpdC1C2BADE</i> genes involved in the initial steps of biphenyl/chlorobiphenyl degradation by <i>Rhodococcus</i> sp. M5. <i>Gene</i> . Vol. 164, páginas 117-122.	1995

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud de patente divulga un microorganismo de la especie bacteriana *Rhodococcus* sp. con número de acceso CECT7625, así como una composición xeroprotectora producida por dicho microorganismo.

Los documentos D01, D02 y D03 divulgán especies del género *Rhodococcus* sp. que presentan tolerancia frente a condiciones de desecación.

Ninguno de los documentos citados refleja de manera detallada las características de la especie bacteriana *Rhodococcus* sp. empleada, por lo que, no se puede afirmar que éstas tengan similares características a las que presenta *Rhodococcus* sp. con número de acceso CECT7625. Por tanto, las reivindicaciones 1-27 presentan novedad y actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP11/1986.