

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 891**

21 Número de solicitud: 202330188

51 Int. Cl.:

C12N 1/10 (2006.01)

B01D 15/08 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

07.03.2023

43 Fecha de publicación de la solicitud:

03.10.2024

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE GRANADA (100.0%)

Avda. del Hospicio, s/n

18071 Granada (Granada) ES

72 Inventor/es:

DE PABLOS TORRÓ, Luis Miguel;

OSUNA CARRILLO DE ALBORNOZ, Antonio;

MARTÍNEZ MARTÍNEZ, Rosario;

CARREIRA DE PAULA, Jéssica;

GARCÍA OLMEDO, Pedro y

PORRES FOULQUIE, Jesus María

74 Agente/Representante:

SAN MARTÍN ALARCIA, Esther

54 Título: **Sustancias poliméricas extracelulares extraídas de protozoos tripanosomátidos**

57 Resumen:

La presente invención describe el uso de protozoos tripanosomátidos, en concreto los de ciclo monoxeno, entre los que destacan *Lotmaria passim* o *Crithidia mellificae*, para la obtención de sustancias poliméricas extracelulares, métodos de obtención de estas sustancias poliméricas extracelulares, las propias sustancias poliméricas extracelulares obtenidas y sus usos.

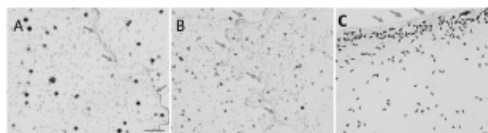


FIG. 2

DESCRIPCIÓN

Sustancias poliméricas extracelulares extraídas de protozoos tripanosomátidos

CAMPO DE LA TÉCNICA

La presente invención se enmarca en el campo de la biotecnología, en concreto, dentro de
 5 las tecnologías para la obtención de sustancias poliméricas extracelulares de interés a partir de microorganismos.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Las **sustancias poliméricas extracelulares**, también conocidas como exopolisacáridos o
 “**EPS**”s por sus siglas en inglés, son polímeros de origen biológico y de alto peso molecular
 10 secretados por numerosos microorganismos. Estos biopolímeros se consideran los responsables de la integridad estructural y funcional de las biopelículas o biofilms microbianos confiriendo las principales propiedades fisicoquímicas y biológicas a los organismos secretores y su entorno circundante. Los EPSs se componen de una gran cantidad de polisacáridos, proteínas, glucoproteínas, lípidos, ADN extracelular (ADNe) y
 15 cationes divalentes. Los EPSs sirven como andamios para que los demás componentes, como otros hidratos de carbono, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos se adhieran formando una red, variando la cantidad de cada compuesto que forma la matriz, según el entorno y la especie de microorganismo que lo secreta.

En función de su la estructura polisacáridica los EPSs se pueden dividir en dos categorías
 20 principales: los homopolisacáridos (HoPS) y los heteropolisacáridos (HePS). Los HoPS son biopolímeros compuestos de un tipo de polisacárido, principalmente d-glucosa o d-fructosa unidos por enlaces α - o β -, dando lugar a α - o β - glucanos o β -fructanos . Por su parte, los HePS se componen de dos o más tipos de monosacáridos, principalmente la d-glucosa, la d-galactosa y la l-ramnosa aunque también la N-acetil-glucosamina (GlcNAc) y N-acetil-
 25 galactosamina (GalNAc), y L-fucosa, ácido D-glucurónico, D-manosa y el glicerol, están ocasionalmente presentes en HePS. La gran variedad y diversidad de estructuras de HePS en la naturaleza varía según la composición de monosacáridos, la posición de enlace, los patrones de ramificación y las modificaciones con piruvato y fosfato. Según el grado de unión con la célula productora los EPSs se clasifican en estrechamente unidos a la
 30 superficie de la célula productora (“tightly bound” o “**TB**” por sus siglas en inglés), unidos de una manera débil (“loosely bound” o “**LB**” por sus siglas en inglés) o solubles (**S**),

caracterizados por una estructura y composición diferentes y distintas propiedades funcionales.

Además, la composición tanto física como química del medio de cultivo *in vitro* del microorganismo secretor de EPS puede modificar su composición y naturaleza de los mismos. Por ejemplo, la temperatura, el pH, el momento dentro de la curva de crecimiento (logarítmica temprana, intermedia, tardía o estacionaria), el tipo de cultivo (estático o en agitación) pueden ser variables que cambien la producción de EPS, así como las fuentes de nutrientes (tanto nitrógeno, carbono o fósforo) y distintas fuentes de azúcares (como glucosa, fructosa o manosa).

Debido a la amplia diversidad de estructuras, composición, formas y propiedades biofísicas, los EPS tienen potencial para múltiples aplicaciones en diversas industrias como en alimentaria, farmacéutica, biomédica y medioambiental. Muchos EPS microbianos brindan propiedades útiles y versátiles como conservantes alimentarios naturales, agentes gelificantes y estabilizadores, agentes antivirales, antioxidantes, inmunomoduladores o promotores de la formación de flóculos en estaciones depuradoras.

A pesar de la gran diversidad de estructuras moleculares descritas y potenciales aplicaciones de los EPSs, solo unos pocos (como los dextranos, xantanos y gelanos en bacterias, o el escleroglucano y pululano en hongos) se han desarrollado industrialmente.

El xantano o goma xantana, es un polisacárido complejo liberado extracelularmente por la bacteria *Xhantomonas campestris*. Principalmente es utilizado en reología para mejora de la composición de alimentos tanto en su textura, liberación de aroma y apariencia. También se utiliza en industria farmacéutica y cosmética como agente emulsificante y para dar cuerpo a los productos finales. Otros usos incluyen aplicaciones agrícolas como agente espesante o de suspensión en fungicidas, pesticidas o herbicidas, para impresión de chorros de tinta en imprentas o para la eliminación de metales en suspensión en minería. El proceso de extracción y purificación del xantano ha sido descrito en la patente número US5595892A, donde se utiliza choque térmico seguido de tratamiento con proteasas alcalinas y lisozimas para recuperar el producto de secreción.

El dextrano, es un polímero polisacarídico liberado extracelularmente por bacterias acidolácticas como *Leuconostoc mesenteroides* y *Streptococcus mutans*. El dextrano posee numerosas aplicaciones en la industria alimentaria como criopreservante o estabilizador de proteínas. También se ha utilizado para proveer de consistencia y solidez a fármacos, en

soluciones intravenosas y como anticoagulantes entre otras aplicaciones. Se conocen varios métodos de extracción y purificación, como el descrito en la patente con número de solicitud EP 84400909 A, donde al medio de cultivo se le añade un poliéter tipo polietilén glicol para generar dos fases inmiscibles en el medio y posteriormente se procede a la retirada del biopolímero y de las enzimas sacarosas productoras del mismo de la fase inferior.

El escleroglucano es una clase de glucano de estructura similar producidos por hongos, especialmente los del género *Sclerotium*. El escleroglucano encuentra varias aplicaciones industriales debido a su inusual reología propiedades y su resistencia a la hidrólisis, temperatura y electrolitos. Se utiliza también en la industria alimentaria como espesante, gelificante o estabilizante. También se utiliza para la extracción de petróleo como aditivo viscosificante así como en industrias cosméticas para tratamiento facial o en agricultura como antisedimentante en productos fitosanitarios. Existen varios métodos para su extracción y purificación previamente descritos como el que se menciona en la patente con número CN102127171B, donde el proceso alterna centrifugaciones con precipitaciones en etanol para obtener escleroglucano a partir de líquido de fermentación del hongo, o la patente con número CN103951762A donde se utiliza la filtración para eliminación del micelio del hongo y posterior concentración con amonio sulfato, diálisis y precipitación etanólica.

El pululano es un producto producido a partir del almidón mediante fermentación por el hongo *Aureobasidium pullulans*. Este polímero tiene propiedades adhesivas, moldeabilidad en fibras y capacidad de formación de películas fuertes e impermeables al oxígeno. Posee numerosos usos en la industria farmacéutica, electrónica y alimentaria. Por ejemplo, se ha utilizado como fuente de fibra en la dieta o prebiótico en industria alimentaria, producción de capsulas gelatinosas en suplementos dietéticos o productos farmacéuticos. Además, las propiedades del pululano y sus derivados también tienen aplicaciones fotográficas, litográficas y electrónicas. La purificación y extracción de pululano y sus derivados se ha descrito en la solicitud internacional número WO2018189587A1, donde se logra aumentar la concentración de polisacárido cambiando fuentes de azúcares y proteínas en el medio de cultivo y en la patente con número US4004977A donde se describe un método donde la separación se realiza por en una serie de precipitaciones en alcoholes, ésteres y éteres, para posteriormente recuperar y deshidratar el producto.

Una de las principales limitaciones para la comercialización de estos EPS son sus bajos rendimientos de producción Las microalgas, las cianobacterias (como *Dunaliella salina* o *Arthrospira platensis*), o las bacterias (como *Lactobacillus delbrueckii*) dan rendimientos de

producción de EPSs en el rango de mg L⁻¹ para compuestos como el escleroglucano (30 g L⁻¹) o el xantano (50 g L⁻¹) (Nouha et al., 2018; Schmid et al., 2015).

Además, en el caso concreto de las microalgas, los proceso de cultivo son otro factor limitante importante ya que requieren mucho más tiempo (15 a 50 días) en comparación con bacterias u hongos (2 a 5 días) (Medina-Cabrera et al., 2020).

Otra cuestión que dificulta su explotación a nivel industrial es la necesidad de realizar procesos de procesamiento posterior a su extracción y purificación.

Un factor determinante que afecta al rendimiento de extracción de EPS es el método de extracción escogido para ello. La pureza, así como la composición y propiedades funcionales del EPS, dependen directamente del método de extracción utilizado. Existen distintos tipos de métodos de extracción que incluyen distintos tipos de separaciones tanto físicas como químicas o una combinación de ambas. Los métodos físicos incluyen ultrasonido, calentamiento en baño de agua o resinas de intercambio catiónico (RIC) (Nouha et al., 2018). Los dos primeros pueden facilitar la separación del contenido celular del biopolímero pero pueden dar lugar a una alteración de la matriz de EPS, mientras que las RIC pueden aumentar la pureza del EPS pero disminuir el rendimiento y la producción. Por su parte, los métodos químicos pueden basarse en el uso de ácido sulfúrico, NaOH, formaldehído, EDTA o Tritón X-100 (Nouha et al., 2018). Aunque estos puedan aumentar el rendimiento, los métodos que incluyen un álcali pueden dar lugar a la desprotonización de los grupos carboxílicos de azúcares y/o proteínas en el EPS lo que aumenta las fuerzas de repulsión en los EPSs. Por su parte la extracción agentes quelantes como el EDTA o detergentes como Tritón X-100 pueden dar como consecuencia un aumento de la lisis celular. Varios autores han reportado que los métodos físicos resultan en una menor lisis celular y por tanto pueden evitar la presencia de contaminantes provenientes del contenido celular (Comte et al., 2006; Liu and Fang, 2002). Por su parte la combinación de métodos físicos y químicos (por ejemplo NaOH y calor, RIC y centrifugación, formaldehído y sonicación) aumentan el tiempo de extracción y la complejidad del proceso.

Se han descrito otros métodos de extracción de EPS, como en la patente NL2012987B1 donde el EPS se extrae a partir de lodos granulados mediante pH alcalino, tamizado y posterior eliminación física del lodo por sedimentación, centrifugación, separación ciclónica, decantación, filtración, tamizado y flotación. La patente de invención con número US9125883B2 describe el aislamiento y modificación de EPSs sulfatados excretados por bacterias marinas mesófilas de un ambiente hidrotermal profundo. Por su parte, en la

solicitud internacional número WO2015117985A1 el exopolisacárido derivado de *Pseudomonas* sp. es purificado mediante filtración. En la solicitud internacional número WO2015011266A1 la separación se lleva a cabo mediante filtración, centrifugación y resinas de intercambio iónico.

- 5 El interés en la búsqueda de nuevos EPSs en más microorganismos proviene de la gran cantidad y diversidad de tipos de grupos funcionales (acetilo, carboxilo, metilo o sulfato) que presentan estos EPSs y que dan lugar a nuevas características que pueden ser posteriormente explotadas en numerosas aplicaciones industriales. Idealmente, una nueva fuente ideal de EPS debería constar de un microorganismo con una gran capacidad de
10 producción del EPS mediante un método rápido, escalable y reproducible.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

- La secreción de EPS y su utilización industrial se ha descrito tanto en bacterias como en algas, hongos o levaduras, sin embargo, no ha sido descrita en protozoos. **El descubrimiento de los parásitos tripanosomátidos como organismos productores de
15 EPS representa una nueva fuente para su explotación industrial.**

- Así, la presente invención describe una metodología para la extracción de sustancias poliméricas extracelulares (EPSs) solubles a partir de protozoos tripanosomátidos** (orden kinetoplastea, familia trypanosomatidae). Estos organismos unicelulares han sido en su amplia mayoría descritos como parásitos cuyos hospedadores incluyen un gran número
20 de especies del Orden Insecta, habiéndose descubierto más de 10 géneros con ciclo monoxenos (es decir con un único hospedador) y siendo uno de los grupos de parásitos más extensos en la naturaleza. Estos 19 géneros de protozoos tripanosomátidos de ciclo monoxeno son los siguientes: *Crithidia*, *Lotmaria*, *Angomonas*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Strigomonas*, *Novymonas*, *Obscuromonas*, *Wallacemonas*, *Jaenimonas*, *Kentomonas*,
25 *Lafontella*, *Paratrypanosoma*, *Sergeia*, *Vickermania*, *Paratrypanosoma*, *Bleptomonas*, *Herpetomonas*, y *Zelonía* (Frolov et al., 2021). Estos parásitos se pueden aislar de insectos y cultivar de manera axénica en medios de cultivo líquido (Buendía-Abad et al., 2021), siendo así posible la extracción sencilla y escalable de los EPSs producidos por los mismos. El cultivo de protozoos parásitos es sencillo y es escalable pudiendo hacerse en cualquier
30 tipo de plataforma para cultivo (frascos roux, matraces o biorreactores). Los tiempos de cultivo y de duplicación (4-10h) son uno de los más rápidos en organismos eucariotas, mucho más que hongos utilizados también en procesos parecidos de extracción de EPSs, pudiéndose obtener masa celular suficiente para el proceso de extracción rápidamente.

Cabe destacar que los organismos tripanosomátidos de ciclo monoxeno no son patógenos de humanos categorizándose como organismos con un nivel de bioseguridad 1 (NBS-1).

El método de la invención combina la extracción física (separación mecánica) y la extracción química (precipitación etanólica) del EPS seguida de un proceso de diálisis, dando lugar a un proceso sencillo, rápido y de alto rendimiento.

El método desarrollado consigue rendimientos de extracción del rango de g L-1 lo que lo sitúa entre los mayores rendimientos de producción de EPSs a partir de microorganismos y constituye un rendimiento de producción comparable a los obtenidos por bacterias.

Tanto el sistema de cultivo como el de extracción son totalmente escalables. En la actualidad se están valorando las aplicaciones que éstos EPSs puedan tener tanto en nutrición como en determinados estados patológicos e inflamatorios.

El EPS purificado de tripanosomátidos monoxenos es un producto totalmente novedoso nunca antes obtenido a partir de organismos del Reino Protozoa. Esto abre la puerta a EPS con una nueva estructura y composición y por tanto con propiedades derivadas totalmente novedosas y nuevas aplicaciones industriales. Por ejemplo, el uso de EPS se ha aplicado para la generación de floculantes, espesantes o emulsificantes en la ciencia de los alimentos (Widyaningrum and Meindrawan, 2020b). También, se han utilizado como transportadores de fármacos, desarrollo de productos bioactivos con propiedades antioxidantes, inmunomoduladoras o antivirales (Abdelhamid et al., 2020; Young et al., 2021) y como biofloculantes para la biosorción de metales pesados en el tratamiento de aguas residuales y restauración ambiental (Pal and Paul, 2008). En este sentido, existen distintos trabajos que revisan las aplicaciones tanto medioambientales, agroalimentarias como biomédicas de los EPSs (Freitas et al., 2011; Siddharth et al., 2021; Widyaningrum and Meindrawan, 2020b).

La purificación descrita en la presente invención en base a precipitación etanólica es fácil, y sencilla, no requiriendo de grandes requerimientos instrumentales o preparación técnica.

Los rendimientos de extracción se sitúan en el rango de gramos L-1, siendo uno de los mayores obtenidos, particularmente dentro de los organismos eucariotas.

El descubrimiento de la capacidad de secreción de EPS de los parásitos tripanosomátidos monoxenos los convierte en una fuente rica y prometedora de nuevos productos bioactivos nunca antes explorados.

Un **primer aspecto** de la invención refiere al uso de un protozoo tripanosomátido para la obtención de sustancias poliméricas extracelulares, preferiblemente el protozoo tripanosomátido es de ciclo monoxeno, preferiblemente perteneciente al género *Crithidia*, *Lotmaria*, *Angomonas*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Strigomonas*, *Novymonas*, *Obscuromonas*, *Wallacemonas*, *Jaenimonas*, *Kentomonas*, *Lafontella*, *Paratrypanosoma*, *Sergeia*, *Vickermania*, *Paratrypanosoma*, *Blechomonas*, *Herpetomonas*, o *Zelonia*, y más preferiblemente es de la especie *Lotmaria passim* y/ o *Crithidia mellificae*.

Un **segundo aspecto** de la invención refiere al método de obtención de sustancias poliméricas extracelulares, en adelante, método de obtención de la invención, que comprende:

- a) el cultivo de un protozoo tripanosomátido de ciclo monoxeno.
- b) la separación de las sustancias poliméricas extracelulares de las células de cultivo, y
- c) la precipitación y purificación de las sustancias poliméricas extracelulares.

En una realización preferida del método de obtención de la invención, el protozoo tripanosomátido pertenece al género *Crithidia*, *Lotmaria*, *Angomonas*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Strigomonas*, *Novymonas*, *Obscuromonas*, *Wallacemonas*, *Jaenimonas*, *Kentomonas*, *Lafontella*, *Paratrypanosoma*, *Sergeia*, *Vickermania*, *Paratrypanosoma*, *Blechomonas*, *Herpetomonas*, o *Zelonia*, y preferiblemente es *Lotmaria passim* o *Crithidia mellificae*.

En otra realización preferida el paso a) se realiza en medio líquido. En una realización aún más preferida el paso a) además se realiza en agitación.

En otra realización preferida, de forma previa al paso b) se lleva a cabo el raspado de las sustancias poliméricas extracelulares unidas a las paredes del soporte de cultivo.

En otra realización preferida de forma previa al paso b) se procede a la agitación del volumen de cultivo.

En otra realización preferida el paso b) se lleva a cabo al final de la fase logarítmica de crecimiento.

En otra realización preferida el paso b) se realiza por filtración, cromatografía de intercambio aniónico, solubilización mediante formaldehído e hidróxido de sodio y posterior centrifugación, o por centrifugación directa.

En otra realización preferida en el paso c) la precipitación se realiza por precipitación etanólica y la purificación por un proceso de diálisis.

En otra realización preferida, de forma posterior al paso c) se lleva cabo una segunda precipitación etanólica.

Un **tercer aspecto** de la invención refiere a las sustancias poliméricas extracelulares o EPSs aisladas de un cultivo de protozoos tripanosomátidos. Nos referiremos a ellas como EPSs de la invención. En una realización preferida los protozoos tripanosomátidos son de ciclo monoxeno, preferiblemente perteneciente al género *Crithidia*, *Lotmaria*, *Angomonas*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Strigomonas*, *Novyomonas*, *Obscuromonas*, *Wallacemonas*, *Jaenimonas*, *Kentomonas*, *Lafontella*, *Paratrypanosoma*, *Sergeia*, *Vickermania*, *Paratrypanosoma*, *Blechomonas*, *Herpetomonas*, o *Zelonia*. Y en una realización aún más preferida el protozoo tripanosomátido es *Lotmaria passim* o *Crithidia mellificae*.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, las sustancias poliméricas extracelulares son obtenibles de protozoos tripanosomátidos de ciclo monoxeno mediante el método de obtención de la invención.

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere a una **composición** que comprende las sustancias poliméricas extracelulares de la invención y más preferiblemente, la composición es una composición farmacéutica.

Un **quinto aspecto** de la invención refiere al uso de los EPSs de la invención, preferiblemente a su uso en la industria alimentaria, preferiblemente para la generación de floculantes, espesantes y /o emulsificantes, en la industria farmacéutica, preferiblemente como transportadores de fármacos, en la industria biomédica, preferiblemente para el desarrollo de productos bioactivos con propiedades antioxidantes y/o inmunomoduladoras en la industria biomédica y/o en la industria medioambiental, preferiblemente como biofloculantes para la biosorción de metales pesados en el tratamiento de aguas residuales y restauración ambiental.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1; Representación esquemática del proceso de purificación de EPSs a partir de cultivos axénicos de parásitos tripanosomátidos en medio líquido. Sb; sobrenadante.

Figura 2; Tinción de Giemsa de un cultivo de *L. passim* al final de la fase logarítmica de crecimiento en (A) cultivos estáticos y (B) en cultivos agitados. Nótese que en cultivos agitados se observan más parásitos agrupados en forma de roseta que libres. En ambos cultivos se forma la malla de EPS formando estructuras fibrilares. (C) Tinción de Giemsa de un cultivo de *C.mellificae* en condiciones de agitación (B) al final de la fase logarítmica de crecimiento. Las flechas señalan EPS secretado al medio.

Figura 3; Rendimiento en peso seco de extracción de la precipitación etanólica tras centrifugación directa ("Etanólica") vs tras solubilización utilizando formaldehído (CH_2O) e hidróxido de sodio (NaOH) y posterior centrifugación ("NaOH-CH₂O") del EPS liberado por *L. passim*.

Figura 4; Imagen de microscopía óptica con una magnificación 20x de EPS extraído mediante (A) extracción etanólica vs (B) solubilización utilizando formaldehído (CH_2O) e hidróxido de sodio (NaOH) y posterior centrifugación ("NaOH-CH₂O") del EPS liberado por *L. passim*.

Figura 5; (A) Imagen de microscopía óptica con una magnificación 20x de EPS extraído mediante extracción etanólica a un cultivo de *L. passim* en agitación y teñido mediante tinción de GIEMSA. (B) Imagen de microscopía óptica con una magnificación 10x de EPS extraído mediante extracción etanólica a un cultivo *L. passim* en estático y teñido mediante tinción de GIEMSA.

Figura 6; Rendimiento (pg EPS/cel) de la extracción de EPS realizada sobre *L. passim* (LP) y *C. mellificae* (CM) mediante extracción etanólica. *** Indica la existencia de diferencias significativas ($p < 0.001$).

Figura 7; (A) Imagen por microscopía electrónica de barrido de EPS extraído de *C. mellificae* mediante protocolo de extracción etanólica; (B) Imagen por microscopía electgiemsa de barrido de EPS extraído de *L. passim* mediante protocolo de extracción etanólica.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A continuación se describe el método de extracción de EPS, el cual resulta sencillo, rápido, reproducible y escalable y permite obtener EPS de alto grado de pureza a partir de protozoos tripanosomátidos.

Los tres pasos principales en el método de extracción son:

- 5 1. Cultivo de tripanosomátidos monoxenos.
2. Separación de EPS y células de cultivo.
3. Precipitación y purificación de EPSs

Cultivo de tripanosomátidos monoxenos

10 Los tripanosomátidos monoxenos seleccionados para los ejemplos de puesta en práctica de la invención son *Lotmaria passim* y *Crithidia mellificae*.

Los cultivos se realizan en medio líquido nutritivo BHT modificado compuesto de Brain Heart Infusion (BHI) 28.8 g/L, triptosa 4.5 g/L (DIFCO), glucosa 5.0 g/L, Na₂HPO₄ 0.5 g/L, KCl 0.3 g/L, Suero Fetal Bovino inactivado 2% v/v, pH 6.5. Otros medios de cultivo de fases parasitarias de insecto como Grace's Insect culture Media o Schneider's insect culture
15 Media también pueden usarse para el crecimiento de microorganismos. El crecimiento se realiza en un rango de 26-32°C según las necesidades de la especie de tripanosomátido en una atmosfera sin aireación.

Las concentraciones del inoculo comienzan preferentemente en 1x10⁵ células por ml. En general, esta concentración se considera como punto inicial para la curva de crecimiento
20 aunque puede comenzar entre 1x10⁴ a 1x10⁶ según la facilidad del protozoo para crecer a baja densidad y el tiempo de duplicación del mismo. En general, parásitos coanomastigotes del género *Crithidia* pueden comenzar sus cultivos a densidades por debajo de 1x10⁴ y poseen una tasa de duplicación de entre 3-5h y parásitos cuya forma de crecimiento es promastigote o epimastigote necesitan crecer a partir de densidades superiores 1x10⁵
25 siendo sus tasas de duplicación entre 8 hasta 12h.

Los cultivos pueden realizarse de manera estática o en agitación, siendo más elevada la producción en el segundo caso. En ambos tipos de cultivos se obtiene una elevada cantidad de EPS **siendo mayor en cultivo en agitación**, donde además las formas promastigotes se

alargan y extienden su flagelo, no diferenciándose a formas haptomonas como ocurre en cultivos estáticos.

Los cultivos son escalables en distintos volúmenes para los distintos frascos de cultivo (T25, T75, T125, T225 o superiores), hasta su volumen recomendado preferentemente según las recomendaciones del fabricante, aunque pueden incrementarse hasta en un 50% consiguiendo un rendimiento y crecimiento óptimo (por ejemplo T225 máximo volumen recomendado= 200ml, máximo volumen ensayado con crecimiento óptimo= 300 ml).

La máxima capacidad de producción de EPS de la curva de crecimiento se produce al final de la fase logarítmica de crecimiento (=late log), variando la densidad del cultivo entre especies, desde una densidad de $1-2 \times 10^7$ células/ml en el caso de *Lotmaria passim* hasta 1×10^8 células/ml en el caso de *Crithidia mellificae*. La extracción de EPS se realiza preferentemente en esta etapa aunque también podría realizarse durante la fase estacionaria de la curva de crecimiento.

Separación de EPS y células de cultivo

Una vez llegado al punto óptimo de crecimiento del cultivo, el EPS unido a las paredes del frasco de cultivo o cualquier otro soporte de cultivo se “rasca” con un raspador de células (= *cell scraper*) y todo el volumen de cultivo celular se agita en agitador magnético durante 1h para conseguir la separación del EPS unido a las células de éstas. Tras ese tiempo, la separación se puede llevar a cabo mediante:

a) Filtración en filtros de 0,45 µM (Sartorius)

b) Cromatografía de intercambio aniónico.

c) Solubilización de EPS mediante formaldehído (CH_2O) al 0,4% e incubación a 4°C durante 1h para fijar las células, aunque el rendimiento es menor también. Posteriormente, se tratan con hidróxido de sodio (NaOH) al 0,5% para solubilizar EPS e incubación a 4°C durante 30 min. Tras ese tiempo, preferentemente se centrifugan los cultivos previamente agitados a $2500 \times g$ durante 5 min y se procede a la precipitación y purificación de EPS s con los sobrenadantes obtenidos.

d) Centrifugación directa de los cultivos previamente agitados, a $2500 \times g$ durante 5 min. Posteriormente, se descarta el pellet o botón celular y se obtiene un sobrenadante donde se

incluyen EPS solubles (**EPS-S**) como aquellos que estaban unidos débilmente (**EPS-LB**) a la superficie de los protozoos.

La técnica preferida es la centrifugación directa, ya que es un proceso que dura solamente 5 minutos, lo que lo convierte en un procedimiento de separación rápido.

- 5 Se realización pruebas con las técnicas de separación c) y d), es decir, por solubilización utilizando mediante formaldehído e hidróxido de sodio y posterior centrifugación, y por centrifugación directa.

Precipitación y purificación de EPSs.

- 10 El sobrenadante conteniendo EPS-S y EPS-LB se precipita en 1 volumen de EtOH absoluto 1:1 (v/v) a 4°C durante toda la noche. Al cabo de ese tiempo se centrifugó nuevamente a 4500 x g durante 20 minutos para obtener un pellet, el cual se dejó secar completamente en cámara de cultivo para asegurar su esterilidad.

- 15 Para eliminar cualquier tipo de sales y azúcares provenientes del medio de cultivo, los EPSs se someten a un proceso de diálisis para eliminar sustancias procedentes del medio de cultivo con un peso molecular inferior a 12.000 dalton. Para el proceso de diálisis, se utilizan membranas de diálisis MWCO 12-14 kDa (Fisher), hidratadas en agua bidestilada durante 24h antes de su uso. Pasado ese tiempo, se procedió a hervirlas 10 min en una solución 10 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y 10 mM de Na₂CO₃. Tras este tratamiento, las membranas se lavaron con agua bidestilada y se procede a la diálisis en agitación
20 continua sumergiendo las membranas en agua bidestilada y se colocaron en un agitador rotatorio a 4°C, cambiando el agua bidestilada del falcón cada 4h durante 24h.

Tras la diálisis, el contenido en EPSs solubles se vuelve a precipitar en etanol absoluto 1:1 (v/v) a 4°C durante toda la noche para maximizar su concentración (**Figura 1**) y dejándose secar completamente o parcialmente según el interés.

- 25 Para determinar el rendimiento en peso seco se realizó una liofilización de 3 alícuotas de 500 µL del producto obtenido para determinar su peso seco.

- 30 La pureza, rendimiento y conformación del EPS obtenido se comprueba mediante técnicas estándar como tinción de Giemsa, Microscopía electrónica de Transmisión, Microscopía electrónica de barrido, peso seco/ célula y análisis mediante perfil proteico en condiciones no desnaturizantes.

Rendimiento y pureza de los métodos de extracción ensayados sobre cultivos en estático y en agitación.

Se tomaron alícuotas de los dos tipos de cultivo realizados en *L.passim* y se realizó una tinción de GIEMSA (**Figura 2**) donde se observan diferentes rasgos morfológicos y propiedades de los promastigotes en cada uno de los cultivos. Se pueden distinguir los parásitos tripanosomátidos monoxenos ya que estos microorganismos poseen núcleo, kinetoplasto, y un flagelo que emerge en posición anterior, características morfológicas propias de la fase promastigote de parásitos. El núcleo y kinetoplasto correspondiente al genoma nuclear y mitocondrial se tiñen con una coloración azul o púrpura debido a que el azul de metileno tiñe los componentes ácidos de la célula como los ácidos nucleicos y todas aquellas estructuras ricas en polianiones. En la **figura 2**, se observan rosetas de crecimiento, características de crecimiento en fase logarítmica de organismos flagelados, donde potencialmente se agregan mediante la capacidad adhesiva del flagelo de los mismos. Tanto en individuos libres como en roseta, podemos observar la presencia de un polímero coloreado de menor intensidad en forma de malla que indica la presencia de los EPSs secretados desde la membrana del parásito. Éste polímero se encuentra mucho más coloreado en estas zonas, debido a la mayor cantidad de parásitos presentes, que pueden fomentar la creación de la matriz mucho más rápido y ayuda a cohesionar las propias rosetas de crecimiento. Como se observa en la **figura 2**, en el cultivo en agitación destaca un mayor tamaño en las rosetas con respecto al cultivo en estático.

El número de parásitos por roseta es mayor en el cultivo agitado que en estático; esta condición puede ser resultado de que la agitación proporcione movimiento al cultivo, llevando a que los parásitos tengan mayor probabilidad para entablar un contacto físico entre ellos y de esta manera quedar unidos en mayor cantidad. Por otro lado, el número de rosetas en un mismo campo de visión difiere entre ambos cultivos, siendo menor en el cultivo estático (n=31) que en cultivo en agitación (n=40), aunque también destaca que en el cultivo en estático existen mayor número de parásitos comenzando a formar la roseta que en el cultivo en agitación. Además la secreción de EPS también se observa en cultivos de *C. mellificae* teñidos con GIEMSA (**Figura 2**).

En la **figura 3** se describen las diferencias en cuanto al rendimiento en peso seco de la producción de EPS en peso (g) según el protocolo ensayado (precipitación etanólica tras centrifugación directa vs tras solubilización mediante formaldehído e hidróxido de sodio y posterior centrifugación). Se puede concluir que el proceso de extracción por precipitación

etanólica tras centrifugación directa posee un mayor rendimiento tanto en cultivos agitados como estáticos.

Con respecto a la extracción etanólica, podemos concluir que es una extracción con un alto grado de pureza, ya que no se encontraron parásitos en las muestras estudiadas bajo microscopía óptica, por lo que durante la extracción, éstos fueron eliminados durante la centrifugación de la muestra (**Figura 4A y 4B**). Cabe destacar que la conformación de los EPSs en extracción etanólica no difiere si dicho EPS proviene de un cultivo agitado o estático ya que en todas las muestras obtenidas mostraban una conformación parecida. Podemos observar zonas con diferente intensidad de coloración en los EPSs de ambos cultivos, lo que nos muestra que existe diferente concentración de la composición de los EPSs, es decir, se constata que el EPS es una matriz heterogénea en su composición; las zonas de mayor coloración más teñidas por el azul de metileno podrían ser más ricas en componentes como ADNe y, fruto de la lisis celular de algunos parásitos cuyos componentes pasan a formar parte de los EPSs para conformar la matriz. Este dato apoya el uso preferente del protocolo con extracción etanólica sin el pretratamiento con NaOH y CH₂O que rompe diferentes componentes de los EPSs, como se puede observar en la **figura 5**, donde el pretratamiento con NaOH y CH₂O genera una tinción mucho más homogénea.

Diferentes especies de tripanosomátidos monoxenos poseen la capacidad para producir EPS.

En la **figura 6** se muestra el rendimiento de extracción de EPS entre dos especies de parásitos tripanosomátidos monoxenos: *L. passim* (**LP**) y *Crithidia mellificae* (**CM**), expresada en pg EPS/cél.

Pese a que *C. mellificae* es una especie con una tasa de duplicación es más rápida (aprox. 3,5h) que *L. passim* (9,2 h), su producción de EPS por célula es menor (121,96 pg/cél *L. passim* vs. 49,46 pg/cél *C. mellificae*) con diferencias significativas ($p < 0.001$). La producción de EPS en peso seco por litro de cultivo fue de $1,6 \pm 0,08$ g L⁻¹ para *L. passim* y de $1,8 \pm 0,08$ g L⁻¹ para *C. mellificae*.

Los EPSs de ambos parásitos se muestran bajo microscopía electrónica de barrido (SEM) en las **figuras 7A y 7B**. El análisis mediante SEM corrobora la pureza del método de extracción, ya que no se visualizaron parásitos en las muestras de EPS extraídos; en ambas imágenes podemos distinguir la estructura en malla propia de los EPSs y zonas con mayor

tinción correspondientes a zonas donde existe una mayor acumulación de proteínas y ADNe que proceden de la lisis celular de los parásitos o de la secreción activa de los mismos

En conclusión, la presente invención se describe un método para la obtención de EPSs de gran pureza de protozoos tripanosomátidos de ciclo monoxeno, pudiéndose alcanzar altos rendimientos de producción (121,96 pg/cél para *L. passim* y de 49,46 pg/cél para *C. mellificae*). Si bien el momento óptimo de obtención EPSs es la fase final de la etapa logarítmica de crecimiento, pueden ser también ser purificados a partir de ésta fase.

El protocolo de extracción preferido es el extracción etanólica, gracias al cual es posible generar EPSs con un rendimiento del rango de g L⁻¹ siendo de $1,6 \pm 0,08$ g L⁻¹ para el caso de *L. passim* y de $1,8 \pm 0,08$ g L⁻¹ para *C. mellificae*. Estos EPs presentan una alta pureza tal y como se muestra en las imágenes de microscopía óptica (**Figura 4A y 4B**) y microscopía electrónica de barrido (**Figuras 7A y 7B**).

Referencias

Abdelhamid, S.A., Mohamed, S.S., Selim, M.S., 2020. Medical application of exopolymers produced by marine bacteria. Bull Natl Res Cent 44, 69. <https://doi.org/10.1186/s42269-020-00323-x>.

Buendía-Abad, M., Higes, M., Martín-Hernández, R., Barrios, L., Meana, A., Fernández Fernández, A., Osuna, A., De Pablos, L.M., 2021. Workflow of *Lotmaria passim* isolation: Experimental infection with a low-passage strain causes higher honeybee mortality rates than the PRA-403 reference strain. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife 14, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.12.003>.

Comte, S., Guibaud, G., Baudu, M., 2006. Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and complexation properties of Pb and Cd with EPS. Enzyme and Microbial Technology 38, 246–252. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.06.023>.

Freitas, F., Alves, V.D., Reis, M.A.M., 2011. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. Trends in Biotechnology 29, 388–398. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.03.008>.

- Frolov, A.O., Kostygov, A.Y., Yurchenko, V. Development of Monoxenous Trypanosomatids and Phytomonads in Insects. *Trends in Parasitology*. 37, 538-551. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.02.004>.
- Liu, H., Fang, H.H.P., 2002. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of
 5 sludges. *Journal of Biotechnology* 95, 249–256. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00025-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00025-1).
- Medina-Cabrera, E.V., Rühmann, B., Schmid, J., Sieber, V., 2020. Optimization of growth and EPS production in two *Porphyridum* strains. *Bioresource Technology Reports* 11, 100486. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100486>.
- 10 Nouha, K., Kumar, R.S., Balasubramanian, S., Tyagi, R.D., 2018. Critical review of EPS production, synthesis and composition for sludge flocculation. *Journal of Environmental Sciences* 66, 225–245. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.05.020>.
- Pal, A., Paul, A.K., 2008. Microbial extracellular polymeric substances: central elements in heavy metal bioremediation. *Indian J Microbiol* 48, 49–64. [https://doi.org/10.1007/s12088-](https://doi.org/10.1007/s12088-008-0006-5)
 15 008-0006-5.
- Schmid, J., Sieber, V., Rehm, B., 2015. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00496>.
- Siddharth, T., Sridhar, P., Vinila, V., Tyagi, R.D., 2021. Environmental applications of microbial extracellular polymeric substance (EPS): A review. *Journal of Environmental*
- 20 Widyaningrum, D., Meindrawan, B., 2020b. The application of microbial extracellular polymeric substances in food industry. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 426, 012181. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/426/1/012181>.
- Young, I.D., Latousakis, D., Juge, N., 2021. The Immunomodulatory Properties of β -2,6 Fructans: A Comprehensive Review. *Nutrients* 13, 1309.
 25 <https://doi.org/10.3390/nu13041309>.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un protozoo tripanosomátido para la obtención de sustancias poliméricas extracelulares.
- 5 2. El uso según la reivindicación anterior caracterizado por que el protozoo tripanosomátido es de ciclo monoxeno.
3. El uso según la reivindicación anterior caracterizado por que el protozoo tripanosomátido es de ciclo monoxeno pertenece al género *Crithidia*, *Lotmaria*, *Angomonas*,
10 *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Strigomonas*, *Novymonas*, *Obscuromonas*, *Wallacemonas*, *Jaenimonas*, *Kentomonas*, *Lafontella*, *Paratrypanosoma*, *Sergeia*, *Vickermania*, *Paratrypanosoma*, *Blechomonas*, *Herpetomonas* o *Zelonia*.
4. El uso según la reivindicación anterior donde el protozoo tripanosomátido es
15 *Lotmaria passim* o *Crithidia mellificae*.
5. Método de obtención de sustancias poliméricas extracelulares que comprende:
 - a) el cultivo de un protozoo tripanosomátido de ciclo monoxeno,
 - b) la separación de las sustancias poliméricas extracelulares de las células de cultivo, y
 - 20 c) la precipitación y purificación de las sustancias poliméricas extracelulares.
6. El método de obtención según la reivindicación anterior caracterizado por que el protozoo tripanosomátido de ciclo monoxeno pertenece al género *Crithidia*, *Lotmaria*, *Angomonas*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Strigomonas*, *Novymonas*, *Obscuromonas*,
25 *Wallacemonas*, *Jaenimonas*, *Kentomonas*, *Lafontella*, *Paratrypanosoma*, *Sergeia*, *Vickermania*, *Paratrypanosoma*, *Blechomonas*, *Herpetomonas* o *Zelonia*.
7. El método de obtención según la reivindicación anterior caracterizado por que el protozoo tripanosomátido es *Lotmaria passim* o *Crithidia mellificae*.
30
8. El método de obtención según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 caracterizado por que el paso a) se realiza en medio líquido.
9. El método de obtención según la reivindicación anterior caracterizado por que el
35 paso a) además se realiza en agitación.

10. El método de obtención según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 caracterizado por que de forma previa al paso b) se lleva a cabo el raspado de las sustancias poliméricas extracelulares unidas a las paredes del soporte de cultivo.
- 5 11. El método de obtención según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 caracterizado por que de forma previa al paso b) se procede a la agitación del volumen de cultivo.
- 10 12. El método de obtención según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11 caracterizado por que el paso b) se lleva a cabo al final de la fase logarítmica de crecimiento.
13. El método de obtención según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12
15 caracterizado por que el paso b) se realiza por filtración, cromatografía de intercambio aniónico, solubilización mediante formaldehído e hidróxido de sodio y posterior centrifugación, o por centrifugación directa.
14. El método de obtención según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13
20 caracterizado por que en el paso c) la precipitación se realiza por precipitación etanólica y la purificación por un proceso de diálisis.
15. El método de obtención según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 14
25 caracterizado por que de forma posterior al paso c) se lleva cabo una segunda precipitación etanólica.
16. Sustancias poliméricas extracelulares aisladas de un cultivo de protozoos tripanosomátidos.
- 30 17. Las sustancias poliméricas extracelulares según la reivindicación anterior caracterizadas por que los protozoos tripanosomátidos son de ciclo monoxeno.
18. Las sustancias poliméricas extracelulares según la reivindicación anterior
35 caracterizadas por que los protozoos tripanosomátidos de ciclo monoxeno pertenecen al género *Crithidia*, *Lotmaria*, *Angomonas*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Strigomonas*,

Novymonas, Obscuromonas, Wallacemonas, Jaenimonas, Kentomonas, Lafontella, Paratrypanosoma, Sergeia, Vickermania, Paratrypanosoma, Blechomonas, Herpetomonas o Zelonía.

- 5 19. Las sustancias poliméricas extracelulares según la reivindicación anterior donde el protozoo tripanosomático es *Lotmaria passim* o *Crithidia mellificae*.
20. Sustancias poliméricas extracelulares obtenibles de protozoos tripanosomáticos de ciclo monoxeno mediante el método de obtención según cualquiera de las reivindicaciones 5
10 a 15.
21. Composición que comprende las sustancias poliméricas extracelulares según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20.
- 15 22. Composición según la reivindicación anterior caracterizada por ser una composición farmacéutica.
23. Uso de sustancias poliméricas extracelulares según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20 en la industria alimentaria, farmacéutica, biomédica y/o
20 medioambiental.
24. El uso según la reivindicación anterior para la generación de floculantes, espesantes y /o emulsificantes en la industria alimentaria.
- 25 25. El uso según la reivindicación 23 como transportadores de fármacos en la industria farmacéutica.
26. El uso según la reivindicación 23 para el desarrollo de productos bioactivos con propiedades antioxidantes y/o inmunomoduladoras en la industria biomédica.
- 30 27. El uso según la reivindicación 23 como biofloculantes para la biosorción de metales pesados en el tratamiento de aguas residuales y restauración ambiental.

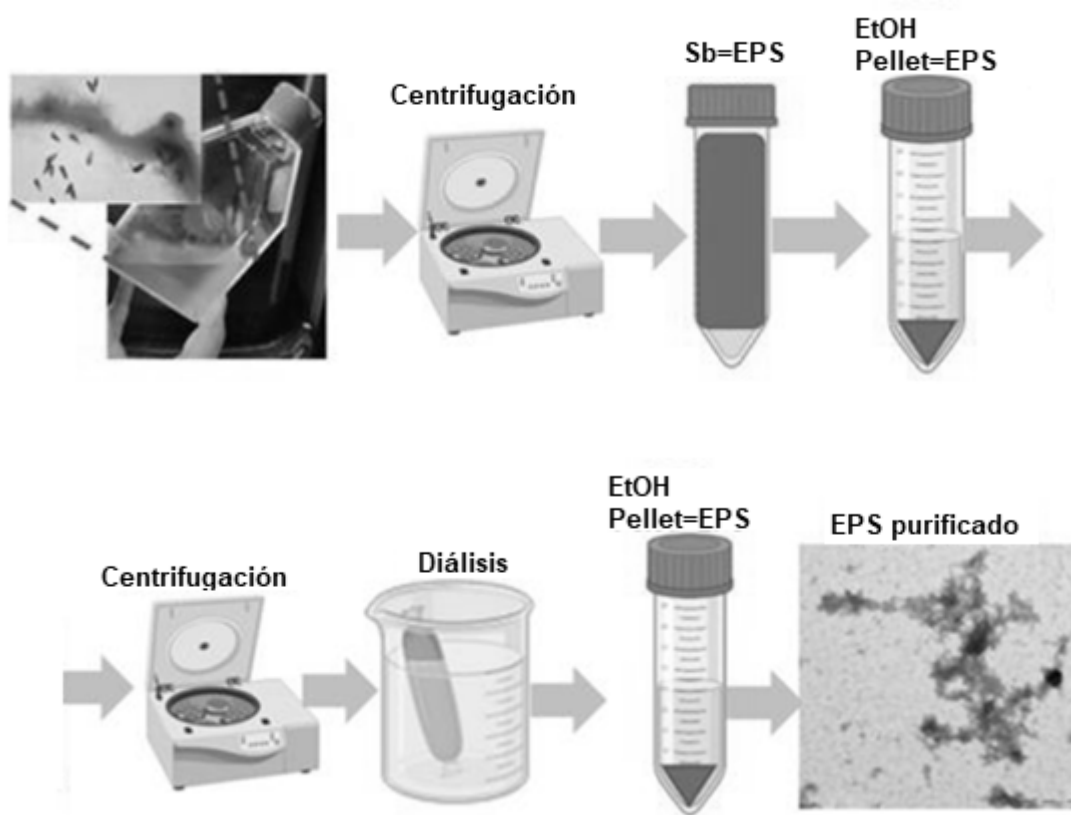


FIG. 1

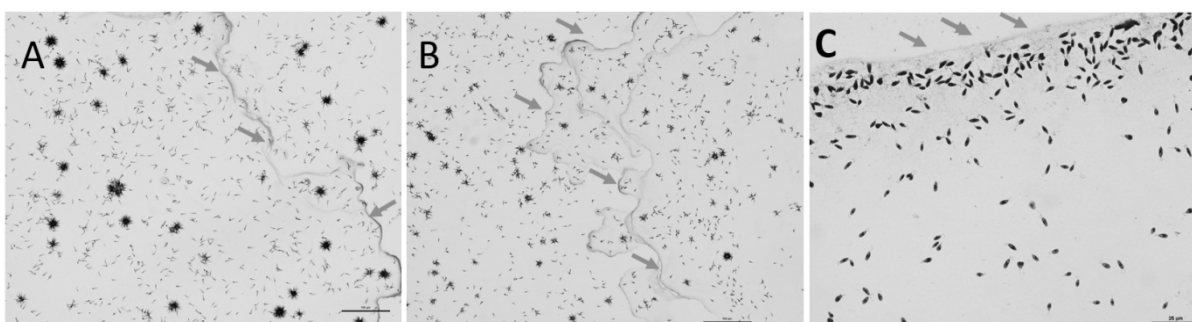


FIG. 2

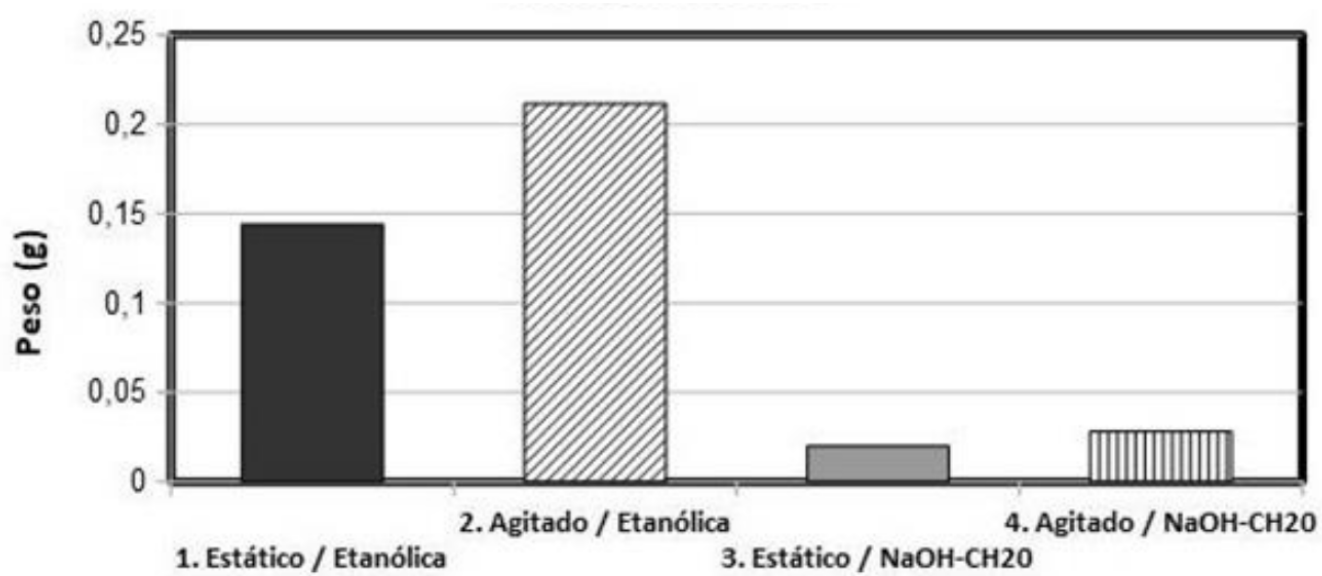


FIG. 3

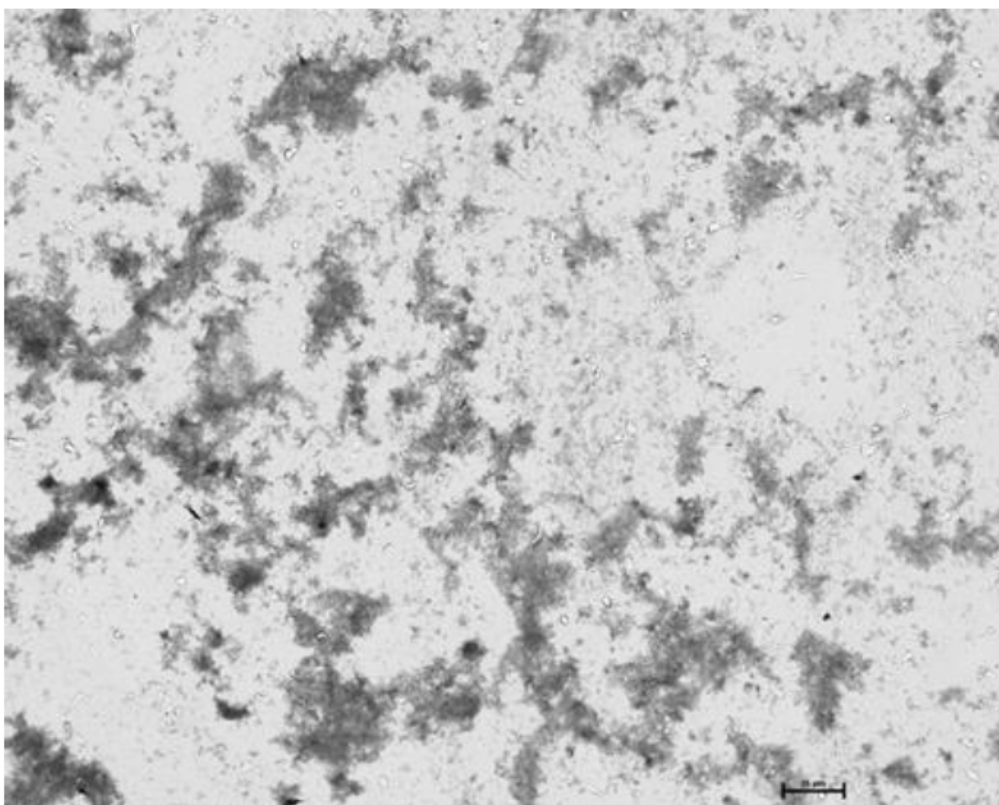


FIG. 4A

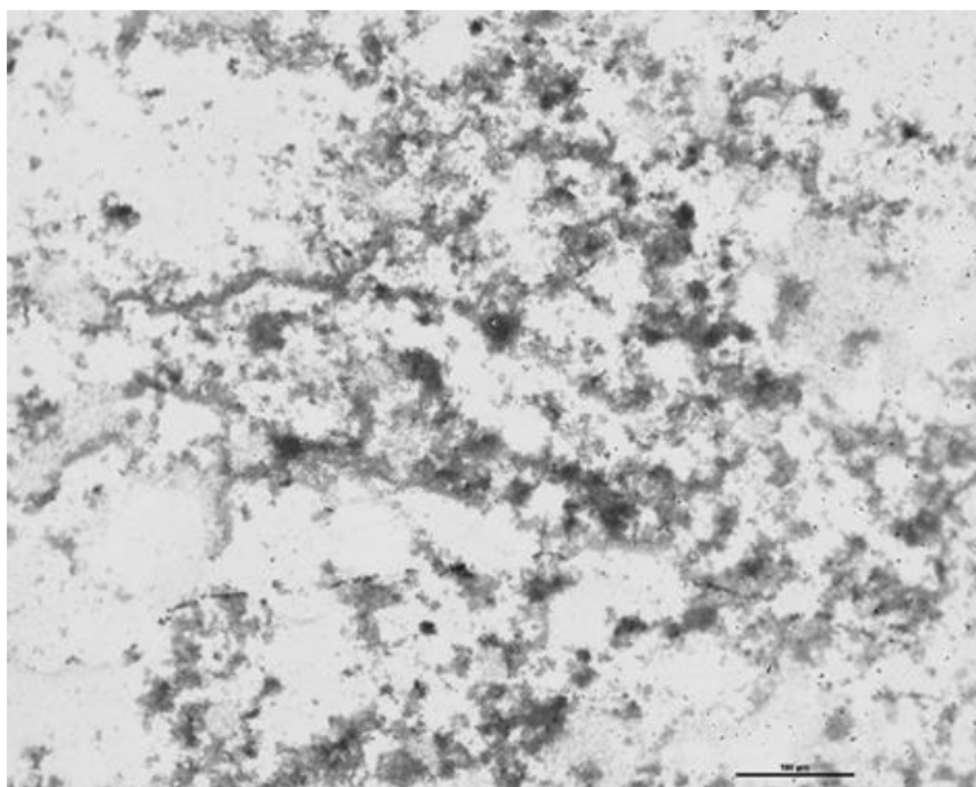


FIG. 4B

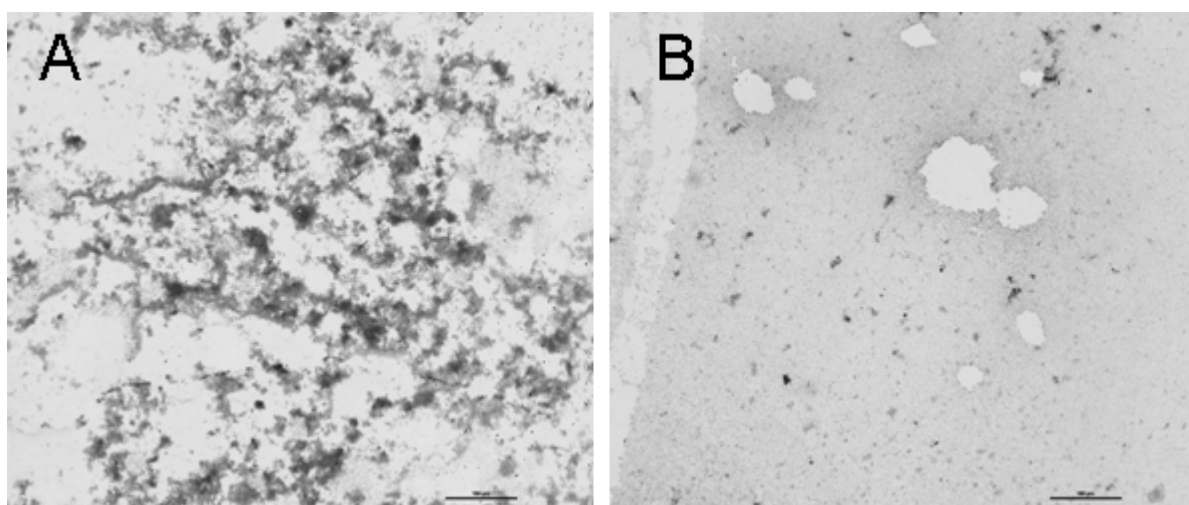


FIG. 5

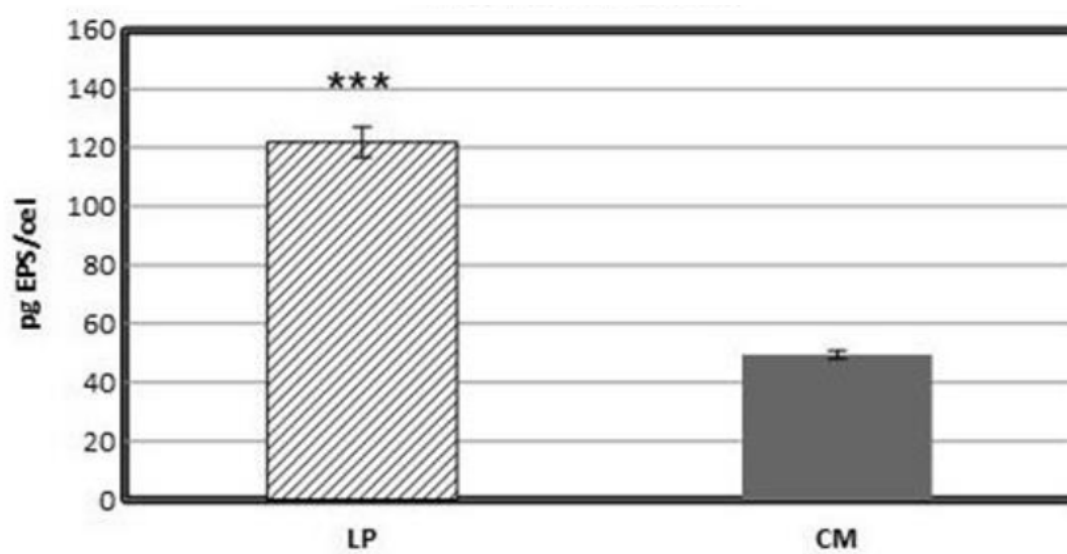


FIG. 6

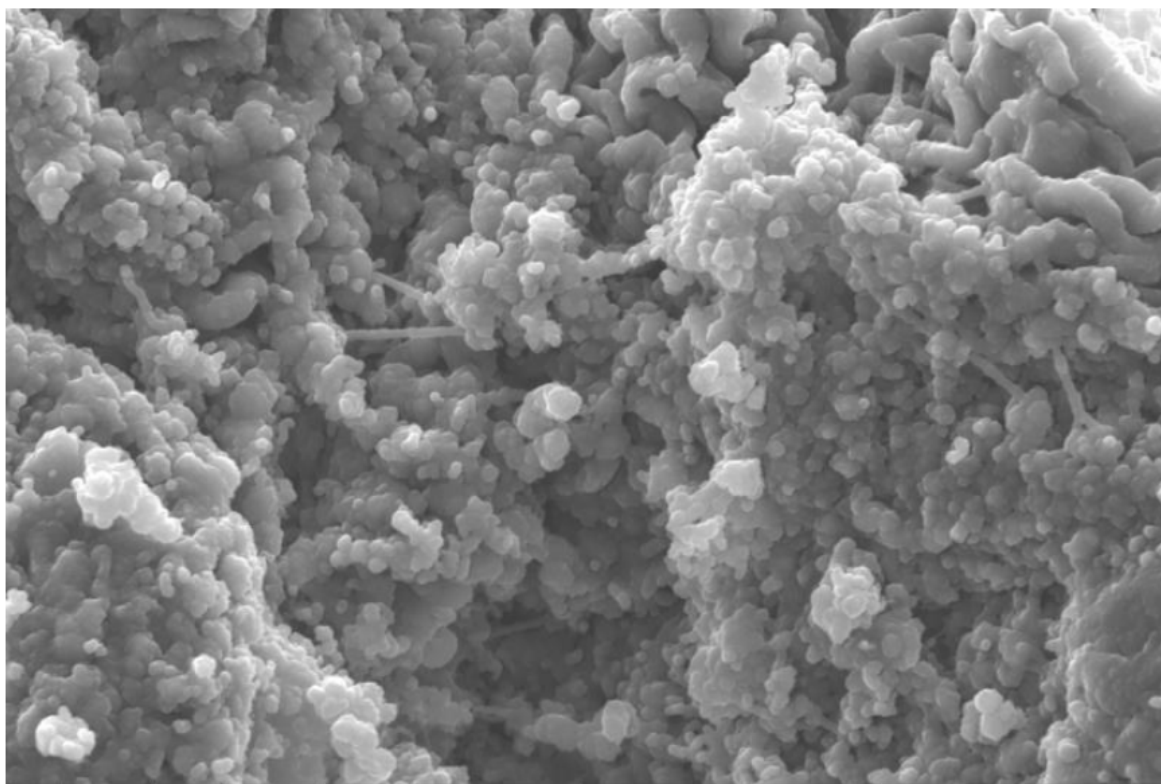


FIG. 7A

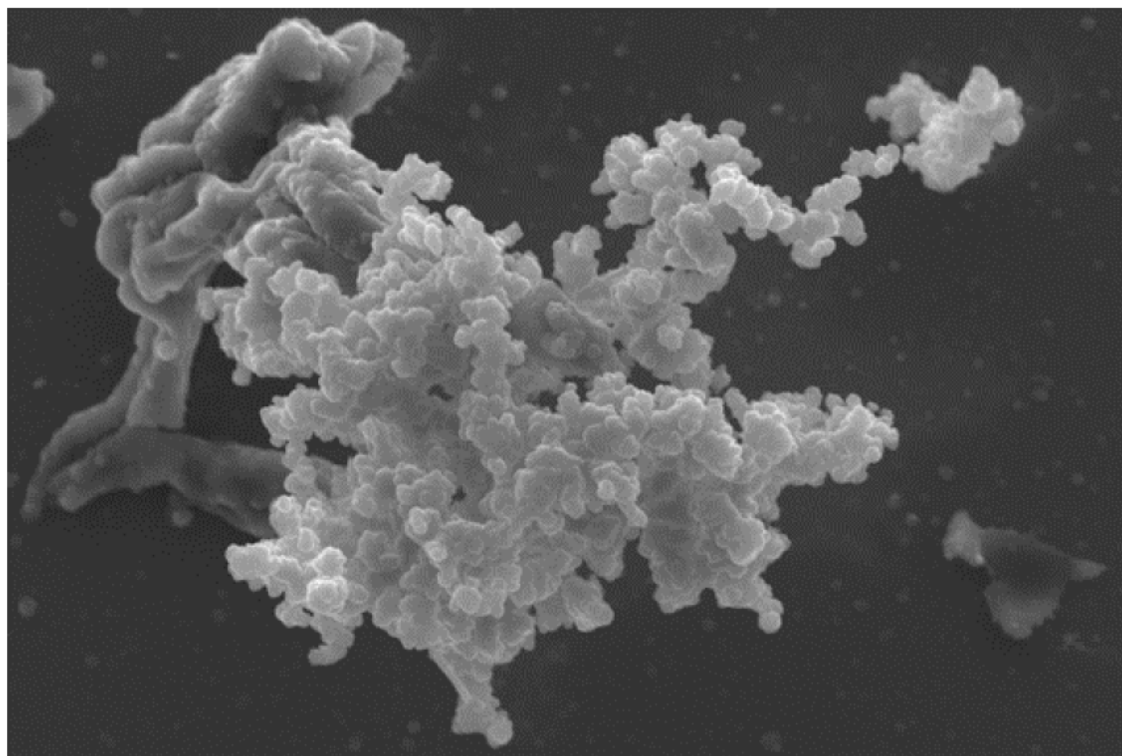


FIG. 7B



- 21 N.º solicitud: 202330188
22 Fecha de presentación de la solicitud: 07.03.2023
32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. cl.: C12N1/10 (2006.01)
B01D15/08 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	D'AVILA-LEVY, C. M. et al. A novel extracellular calcium-dependent cysteine proteinase from <i>Crithidia deanei</i> . Archives of Biochemistry and Biophysics. Diciembre 2003, Vol. 420, Nº 1, páginas: 1-8 [en línea][recuperado el 22 01 2024]. , <DOI:10.1016/j.abb.2003.09.033 >. resumen; página 2 "materiales y métodos".	1-27
X A	GEIGER, A. et al. Exocytosis and protein secretion in Trypanosoma. BMC Microbiology Enero 2010, Vol. 10, artículo nº 20 [en línea][recuperado el 22/01/2024]. <DOI: 10.1186/1471-2180-10-20>. Figura 1.	1-4 5-27
X A	MOREIRA, L. R. et al. Biophysical and biochemical comparison of extracellular vesicles produced by infective and non-infective stages of <i>Trypanosoma cruzi</i> . Int. J. Mol. Sci.. Mayo 2021, Vol. 22, Nº 10, artículo nº 5183, [en línea][recuperado el 22/01/2024]. , <DOI: doi.org/10.3390/ijms22105183>. Abstract; apartado 2.1. "Purification and Characterization of EVs".	1-4 5-27
X A	WO 0032796 A2 (UNIV GEORGIA RES FOUND et al.) 08/06/2000	1-4 5-27
A	US 2005098501 A1 (LEISER ROBERT-MATTHIAS et al.) 12/05/2005	1-27

<p>Categoría de los documentos citados</p> <p>X: de particular relevancia</p> <p>Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría</p> <p>A: refleja el estado de la técnica</p>	<p>O: referido a divulgación no escrita</p> <p>P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud</p> <p>E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud</p>
---	---

<p>El presente informe ha sido realizado</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> para todas las reivindicaciones</p> <p><input type="checkbox"/> para las reivindicaciones nº:</p>
--

<p>Fecha de realización del informe</p> <p>15.02.2024</p>	<p>Examinador</p> <p>A. Ugidos Valladares</p>	<p>Página</p> <p>1/2</p>
--	--	---------------------------------

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

C12N, B01D

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, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP, NPL y bases de texto TXT