

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 510**

51 Int. Cl.:
C12P 19/04 (2006.01)
C12P 19/12 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
A61K 8/97 (2006.01)
A61K 36/05 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08826786 .9**
96 Fecha de presentación: **23.06.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2167675**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.03.2010**

54 Título: **PROCESO DE CLIVAJE ENZIMÁTICO DE POLISACÁRIDOS PROCEDENTES DE ALGAS.**

30 Prioridad:
22.06.2007 FR 0704494

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.03.2012

73 Titular/es:
**UNIVERSITÉ DE PICARDIE JULES VERNE
CHEMIN DU THIL
80025 AMIENS, FR**

72 Inventor/es:
**EL BOUTACHFAITI, Redouan;
PHEULPIN, Patrice;
COURTOIS, Bernard y
COURTOIS-SAMBOURG, Josiane**

74 Agente/Representante:
Aznárez Urbietta, Pablo

ES 2 376 510 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proceso de clivaje enzimático de polisacáridos procedentes de algas

La presente invención se refiere a un proceso de clivaje enzimático de polisacáridos extraídos de algas del género *Ulva*.

5 Los polisacáridos son polímeros y constituyen los elementos esenciales de las algas verdes del género *Ulva*. Además, estas algas verdes están muy extendidas en las costas de todos los continentes y, por ello, están ampliamente disponibles a bajo coste.

10 Estos polímeros se denominan "ulvanos" y contienen osas ácidas, en particular ácido glucurónico (Glc

A

) y ácido idurónico (IdopA), así como osas neutras, entre las cuales se encuentran ramnosa (Rhap), galactosa (Galp), glucosa (Glc

p

) y xilosa (Xylp). Además, en estos polímeros, la ramnosa está sustituida con un grupo sulfato en el carbono 3, denominándose ramnosa-3-sulfato (Rhap3S).

Estos polímeros contienen compuestos interesantes, en particular ácido idurónico y ramnosa-3-sulfato, en especial para aplicaciones terapéuticas o cosméticas.

15 Sin embargo, las osas de estos polímeros se encadenan de forma relativamente aleatoria, de modo que resulta difícil extraer una composición relativamente homogénea. Se han identificado dos secuencias principales, denominadas ácidos aldobiurónicos, que incluyen tales compuestos interesantes, una primera secuencia $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glc}pA\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}3\text{-sulfato}\text{-}(1\rightarrow)]_n$ y una segunda secuencia $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-IdopA}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}3\text{-sulfato}\text{-}(1\rightarrow)]_m$. También se han descrito secuencias que contienen los enlaces de ácido glucurónico, que son: $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glc}pA\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glc}pA\text{-}(1\rightarrow)]_x$; pudiendo estar estas secuencias de glucuronano integradas en las 2 secuencias principales constituidas de los ácidos aldobiurónicos ya citados. Sin embargo, aunque no se ha demostrado, estas secuencias de glucuronano podrían estar
20 presentes también en otros polímeros diferentes de los ulvanos, pero también extraídos del alga al mismo tiempo que el polímero compuesto en su mayoría por secuencias de ácidos aldobiurónicos.

Estos compuestos son comparables respectivamente a los glucosaminoglicanos, en especial a la heparina y al sulfato de heparano, así como al sulfato de condroitina y sulfato de dermatano.

25 Sin embargo, por muy interesantes que sean, estos polímeros extraídos de las algas verdes presentan una heterogeneidad demasiado alta como para poder ser utilizados e incorporados tal cual en preparaciones farmacéuticas o cosméticas. Por ello, que se intentado fraccionarlos en compuestos elementales mediante composiciones enzimáticas específicas.

30 Así, ya se ha identificado una primera enzima del tipo liasa, la glucuronano-liasa, que presenta activad en el clivaje de las secuencias de glucuronano presentes en los polisacáridos tipo ulvanos. Además, esta enzima se obtiene a partir de un microorganismo fúngico, en particular de la cepa *Trichoderma* CNCM I-3400. Se remite al documento FR 2 885 911, que describe este microorganismo para degradar las secuencias glucuronano de los polisacáridos.

Sin embargo, esta composición enzimática no permite clivar de forma precisa las secuencias principales compuestas de los ácidos aldobiurónicos ya mencionados, cuyo fruto es de gran interés.

35 Por otra parte, se conoce otra composición enzimática del tipo liasa, la ulvano- liasa, que permite, a priori, el clivaje de las secuencias primera y segunda de los ácidos aldobiurónicos citados en lo que se refiere a los enlaces osídicos, entre las unidades Rhap3-sulfato y Glc

A

 de una parte, y entre las unidades Rhap3 e IdopA de otra, y siguiendo una reacción de β -eliminación.

Esta composición enzimática se describe en la publicación de M. Lahaye y col., (Carbohydrate Research 1997, 304:325-333) y procede de una bacteria marina. Permite fraccionar los polímeros de ulvano en sus oligómeros.

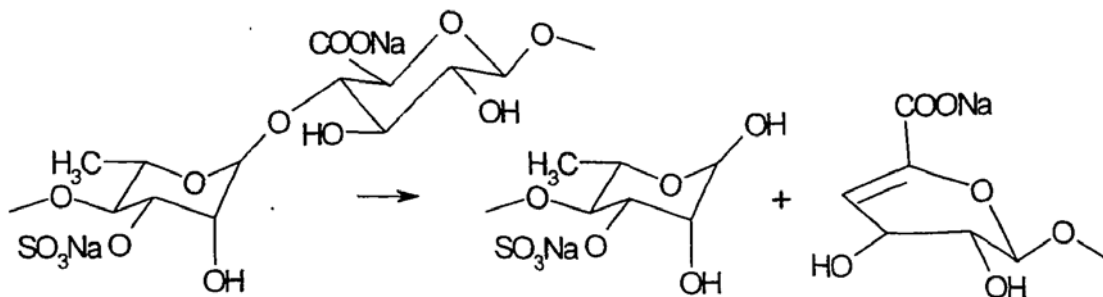
40 Sin embargo, la composición enzimática descrita en esta publicación y especialmente su actividad enzimática con respecto al sustrato compuesto de polímeros ulvano es relativamente débil, y además, disminuye rápidamente con la degradación, de modo que es necesario reintroducir enzimas en la composición enzimática para que la degradación prosiga. Efectivamente, la publicación citada indica que la degradación del ulvano por el extracto enzimático aislado es lenta y alcanza rápidamente una meseta. Así, se describe que el incremento de los azúcares reductores sobre el ulvano sometido a la degradación enzimática, incremento que es idéntico lógicamente al de los azúcares en posición terminal no reductora, es del 7,1% con respecto a la dosificación de estos azúcares antes de la incubación en presencia de la enzima; además, esta degradación, completada en 200 minutos, necesita repetidas adiciones de enzima, cada 25 minutos como promedio, para compensar la inactivación enzimática debida a productos de degradación. Por consiguiente, no es factible utilizar esta composición enzimática para producir industrialmente oligómeros de
45 composición y peso molecular homogéneos, ya que el coste para obtener estos oligómeros sería prohibitivo.

50 Asimismo, un problema que se plantea y que la presente invención pretende resolver consiste en proporcionar, según un primer aspecto, un proceso de clivaje enzimático que permita no sólo clivar los polímeros ulvano entre las unidades Rhap3-sulfato y Glc

A

 y entre las unidades Rhap3 e IdopA, sino también hacerlo con un rendimiento que permita obtener oligómeros de tamaño reducido a un coste ventajoso.

Con el fin de resolver este problema, la presente invención propone un proceso de clivaje enzimático de polisacáridos que comprenden una primera secuencia $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glc}pA\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}3\text{-sulfato}\text{-}(1\rightarrow)]_n$ y una segunda secuencia $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Idop}A\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}3\text{-sulfato}\text{-}(1\rightarrow)]_m$, estando compuestas respectivamente ambas secuencias de dos unidades o sea unidas por un enlace osídico, dicho proceso siendo del tipo según el cual: se proporcionan dichas secuencias de polisacárido; se proporciona un microorganismo apto para producir una sustancia enzimática del tipo liasa; y se pone en contacto dicha sustancia enzimática con las secuencias de polisacáridos de modo que se provoque el clivaje del enlace osídico según una reacción de β -eliminación, siguiendo el mecanismo esquemático:



Según la invención, se selecciona un microorganismo que pertenece a las bacterias del género *Ochrobactrum* para producir dicha sustancia enzimática.

Así, una característica de la invención consiste en proporcionar estas bacterias del género *Ochrobactrum* para producir una sustancia enzimática apta para romper específicamente el enlace osídico mediante β -eliminación, pero sin provocar la aparición de productos de degradación que alterarían la precisión de la actividad enzimática. Y ello, contrariamente al caso de las sustancias enzimáticas descritas en la técnica anterior y procedentes de bacterias marinas, cuya actividad enzimática se interrumpe muy rápidamente y para las cuales entonces es necesario introducir en el medio de reacción nuevas sustancias enzimáticas con el fin de continuar la degradación.

Por lo demás, la β -eliminación corresponde a un clivaje del enlace osídico de una secuencia osídica generando 2 fragmentos de moléculas sacáridas y que hace aparecer, al nivel del extremo terminal no reductor creado, un heterociclo que presenta un enlace etilénico entre el carbono 4 y el carbono 5, correspondiendo el residuo del extremo terminal no reductor a un ácido 4-desoxi-(hex-4-eno)piranosilurónico. Por otra parte, tal como se explicará más adelante, gracias a la aparición de este enlace etilénico, se podrá medir fácilmente la velocidad de reacción mediante espectroscopía UV, entre 230 y 240 nm y especialmente a 235 nm.

Igualmente, se observará que el clivaje entre las unidades Rhap3-sulfato y Glc pA y entre las unidades Rhap3 e IdopA lleva exactamente a los mismos productos de reacción, aunque, por un lado, para la primera secuencia se tenga en el polímero ácido glucurónico, mientras que para la segunda secuencia se tenga el ácido idurónico. Ello se debe a que estos dos ácidos difieren simplemente en la configuración de su carbono 5. Así, debido a que el carbono 5 presenta una hibridación sp^3 inicialmente y que después se convierte en sp^2 tras la reacción de β -eliminación, sólo existe una configuración posible.

Por tanto, la sustancia enzimática obtenida gracias a la bacteria del género *Ochrobactrum* no sólo permite obtener oligómeros de bajo peso molecular con mayor rendimiento que las sustancias enzimáticas obtenidas con bacterias marinas, sino que además el proceso según la invención permite obtener oligómeros homogéneos con un rendimiento importante.

De forma particularmente ventajosa, la cepa bacteriana seleccionada pertenece a la especie *Ochrobactrum tritici*, que se encuentra en el suelo. En especial, esta cepa bacteriana marcada con PEC.2 lleva la referencia CNCM I-3776, debidamente depositada y registrada en la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM) con sede en el Instituto Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, F-75724 Paris cedex 15.

Según una forma preferente de realización de la invención, se incuban dichas bacterias con un sustrato polisacárido para producir la sustancia enzimática y después se aíslan las bacterias incubadas de dicha sustancia enzimática con el fin de utilizar ésta última en la producción de los oligómeros buscados.

Ventajosamente, esta sustancia enzimática se purifica tras haberse incubado las bacterias, de manera que se retenga exclusivamente la enzima específica del clivaje para el enlace osídico. Así, la actividad enzimática de la sustancia enzimática, que sólo contiene entonces la enzima, es por ello óptima cuando se compara con la cantidad de moléculas clivadas por minuto y con la cantidad empleada de la misma.

Preferentemente además, la sustancia enzimática obtenida gracias a la cepa bacteriana de la especie *Ochrobactrum* provoca el clivaje de un número de enlaces osídicos de dichas secuencias de polisacárido de entre $6 \cdot 10^{16}$ y $6 \cdot 10^{20}$ por minuto y por miligramo de la sustancia enzimática, por ejemplo entre $6 \cdot 10^{17}$ y $6 \cdot 10^{19}$ y especialmente $6 \cdot 10^{18}$. Así, tal como se explicará más adelante, esta actividad enzimática corresponde esencialmente a 10 U/mg, según la medida

usual; representando aquí U de enzima la cantidad de extracto enzimático que provoca la aparición de un micromol de ácido 4-desoxi-(hex-4-eno)piranosilurónico.

5 Según otra forma de realización preferente de la invención, dichos polisacáridos comprenden no sólo secuencias glucuronano dentro de las secuencias de ácidos aldobiurónicos, sino también muy probablemente glucuronano en forma de un polímero distinto extraído al mismo tiempo que el polímero rico en ácidos aldobiurónicos, eliminándose entonces dicho glucuronano. Así, se obtiene un polisacárido que contiene esencialmente los dos ácidos aldobiurónicos y que contiene también las secuencias de glucuronano atrapadas en las secuencias $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcpA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap3-sulfato-(1}\rightarrow]_n$, $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-IdopA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap3-sulfato-(1}\rightarrow]_m$, pero el polisacárido extraído del alga se libera del glucuronano libre. Tal como se explicará más adelante, gracias a esta separación, se facilita la actividad de la ulvano-
10 liasa.

Según otra forma de realización preferente de la invención, dichos polisacáridos comprenden además heparanos y/o sulfatos de heparano, que incluyen polímeros compuestos de $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcpA-2-sulfato-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcNsulfo-6-sulfato-(1}\rightarrow]_x$ y/o de $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-IdopA-2-sulfato-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcNsulfo-6-sulfato-(1}\rightarrow]_y$.

15 La degradación del polímero permite obtener entonces, según las cantidades de enzima empleadas y el tiempo de incubación, oligómeros de heparano y de sulfato de heparano con bajo grado de polimerización.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a una sustancia enzimática adaptada al proceso de clivaje enzimático descrito anteriormente, obteniéndose dicha sustancia enzimática a partir de un microorganismo que pertenece a las bacterias del género *Ochrobactrum*. En particular, estas bacterias pertenecen a la especie *Ochrobactrum tritici*, cuya cepa registrada lleva la referencia CNCM I-3776.

20 Otras características y ventajas de la invención se pondrán en evidencia de la lectura de la descripción realizada a continuación de formas de realización particulares de la invención, dados a título ilustrativo pero no limitativo, con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

Figura 1: representa un diagrama que muestra la actividad enzimática específica de distintos elementos de una sustancia enzimática;

25 Figura 2: gráfico que ilustra la medida de la actividad enzimática de dicha sustancia enzimática;

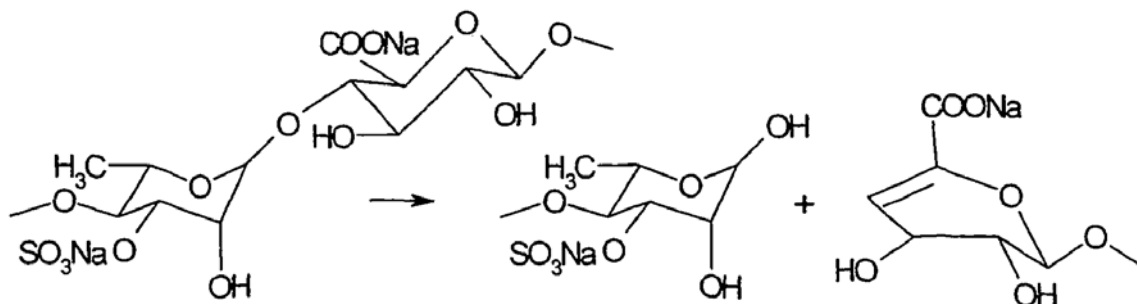
Figura 3: dos espectros superpuestos que corresponden a productos de degradación de la actividad enzimática según una primera forma de realización, uno obtenido mediante cromatografía de exclusión estérica sobre Biogel P2 y el otro, debajo, mediante espectroscopía de masas; y

30 Figura 4: espectro obtenido mediante cromatografía de exclusión estérica sobre Biogel P6, que corresponde a los productos de degradación de la actividad enzimática según una segunda forma de realización.

Ventajosamente, se seleccionará un sustrato que incluya secuencias de polisacáridos procedentes de un alga del género *Ulva*, denominados ulvanos. Estas secuencias de polisacáridos tipo ulvano comprenden, en particular, una primera secuencia $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcpA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap3-sulfato-(1}\rightarrow]_n$ y una segunda secuencia $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-IdopA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap3-sulfato-(1}\rightarrow]_m$.

35 Estos polímeros de ulvano son pobres en glucuronano para optimizar la producción de la actividad ulvano-liasa. Sin embargo, para algunas aplicaciones, se degradarán por vía enzimática polímeros de ulvano que contengan glucuronano.

40 Antes de describir este modo de separación, se describirá el modo de preparación de una cepa bacteriana de la especie *Ochrobactrum tritici* PEC2, en particular la cepa de referencia CNCM I-3776, apta para producir una sustancia enzimática y especialmente una ulvano-liasa. Esta ulvano-liasa está adaptada para provocar el clivaje del enlace osídico según una reacción de β -eliminación entre las unidades Rhap3-sulfato y GlcpA y entre las unidades Rhap3 e IdopA de las secuencias polisacárido primera y segunda ya mencionadas respectivamente y según el esquema de reacción:



Esta cepa se cultiva en un medio nutritivo mínimo mineral que contiene: NaCl, 22 g; Na₂SO₄, 3,7 g; KCl, 0,6 g; KBr, 0,1 g; MgCl₂·6H₂O, 10 g; CaCl₂·2H₂O, 2,94 g; NaHCO₃, 0,16 g; NaNO₃, 25 mg; NaH₃PO₄·12H₂O, 5 mg y H₂O QSP 1L; siendo el pH de 7,2. Se añade ulvano (2 g/l) al medio nutritivo, constituyendo éste la única fuente de carbono.

- 5 La cepa apta para degradar el ulvano se aísla en una placa petri que contiene el mismo medio nutritivo junto con gelosa. Tras la incubación, se recogen las colonias más desarrolladas. Por supuesto, se seleccionan las cepas que metabolizan el sustrato degradándolo según una β-eliminación.

10 A continuación se describe el modo de separación del glucuronano y del sustrato ulvano. Para ello, a partir de un extracto procedente de la extracción en caliente de los polímeros de *ulva* y tras la eliminación de los insolubles, se reduce a 2 el pH del extracto en presencia de un ácido diluido. De esta forma se obtiene un precipitado P que incluye residuos de ácido glucurónico y la solución S recuperada se lleva a un pH neutro próximo a 7. Esta solución S recuperada se concentra, se purifica, por ejemplo mediante ultrafiltración, y después se liofiliza o precipita en alcohol. Así, se obtiene un polímero P2 que incluye esencialmente secuencias de ácidos aldobiurónicos, siendo las secuencias de glucuronano que quedan las que se integran dentro de las secuencias principales.

- 15 Tratando el precipitado P que contiene los residuos de ácido glucurónico, se puede obtener glucuronano no sustituido. Dicho polímero tiene aplicaciones en muy diversos sectores industriales.

20 Ventajosamente, la mezcla de polímeros P2 se utiliza como sustrato para cultivar la cepa de *Ochrobactrum* PEC2 e inducir la producción de la enzima "ulvano-liasa", la cual por una parte rompe específicamente, mediante el proceso de β-eliminación, el enlace entre Rha₃S (ramnosa-3-sulfato) y Glc₁A (ácido glucurónico) de la primera secuencia de ácido aldobiurónico y correspondiente al encadenamiento [→4)-α-L-Rha₃-sulfato-(1→4)-β-D-Gl-cpA-(1→]_n y, por otra parte, rompe el enlace entre Rha₃S (ramnosa-3-sulfato) e IdopA (ácido idurónico) de la segunda secuencia de ácido aldobiurónico correspondiente al encadenamiento [→4)-α-L-Rha₃-sulfato-(1→4)-α-L-IdopA-(1→]_m.

25 A continuación se describe el modo de preparación de la actividad enzimática. La cepa de *Ochrobactrum tritici* PEC2 se inocula primero en un biorreactor con una capacidad de 2 litros lleno de 1,5 l de medio mineral: NaCl, 22 g; Na₂SO₄, 3,7 g; KCl, 0,6 g; KBr, 0,1 g; MgCl₂·7H₂O, 5 mg; NaNO₃, 25 mg; NaH₃PO₄·12H₂O, H₂O QSP 1l; ajustado a un pH 7,2 y suplementado con extracto de levadura: 1 g/l, peptona: 5 g/l y polímeros de ulvano, preferentemente ulvanos enriquecidos con ácidos aldobiurónicos (2 g/l).

30 La incubación se lleva a cabo preferentemente entre 25 y 35°C, por ejemplo a 30°C, bajo agitación, durante un promedio de 48 horas. Durante la incubación, aumenta la concentración de ulvano-liasa en el medio de cultivo de la cepa *Ochrobactrum tritici* PEC2 y, por consiguiente, también aumenta la actividad enzimática del medio de cultivo. Así, el medio de cultivo utilizado tal cual permite obtener ya la degradación del ulvano en oligómeros después de que se haya eliminado la bacteria mediante filtración o centrifugación. Ventajosamente, las bacterias se eliminan del medio mediante centrifugación del medio de cultivo a 30.000 g durante aproximadamente 30 minutos.

Se concentra y purifica la ulvano-liasa según 3 niveles de purificación. Un primer nivel A de preparación de la enzima corresponde al medio de cultivo liberado de las bacterias después de la incubación.

35 Un segundo nivel de preparación B se obtiene mediante la adición en primer lugar de sulfato de amonio (60% p/v) al medio de cultivo procedente del primer nivel A de preparación, para precipitar las proteínas que contiene. Las proteínas incluyen por supuesto la enzima ulvano-liasa. Después, se procede a una centrifugación del medio de cultivo precipitado a 30.000 g durante 30 minutos y se recupera el depósito proteico. Finalmente, el depósito proteico se reintroduce en aproximadamente 10 ml de una solución tampón Tris/HCl 20 mM a pH 7,5.

40 Se obtiene un tercer nivel de purificación C fraccionando mediante cromatografía con una resina de intercambio aniónico, por ejemplo en columna DEAE-metacrilato, el fruto de la preparación del segundo nivel B y recuperando exclusivamente la fracción correspondiente a la ulvano-liasa.

45 En cuanto a la actividad de las preparaciones enzimáticas, ésta se mide por el valor U (unidad) que corresponde a la cantidad de extracto enzimático que provoca la aparición de un micromol (μM) de moléculas de ácido 4-desoxi-(hex-4-eno)piranosilurónico por minuto, es decir esencialmente 6·10¹⁷ moléculas.

50 La aparición de este último compuesto se mide mediante espectroscopía UV a una longitud de onda entre 230 y 240 nm y especialmente a 235 nm, que permite visualizar la aparición del doble enlace. Asimismo, el valor de una unidad U corresponde a 6·10¹⁷ enlaces osídicos clivados. Además, el coeficiente de extinción molar ε es de 5.000 l/mol/cm, lo que permite, tras la aplicación de la ley de Beer-Lambert, después de haber medido la absorción, calcular las concentraciones.

En cambio, la actividad específica corresponde al número de μM de moléculas de ácido 4-desoxi-(hex-4-eno)piranosilurónico formadas por minuto y por miligramo de proteínas.

55 Con referencia a la Figura 1, se muestra el perfil de elución en la cromatografía de intercambio aniónico en columna DEAE-metacrilato semipreparativa, de las proteínas presentes en el medio de cultivo de la cepa *Ochrobactrum tritici* PEC2. El eluyente es Tris-HCl 0,02 M, a pH = 8,5 y gradiente NaCl. Como se observa en esta Figura 1, la curva de línea

continua, que representa la elución de las distintas proteínas procedentes del medio de cultivo precipitadas con sulfato de amonio y luego purificadas por cromatografía de intercambio aniónico, así como la curva de línea discontinua, la actividad enzimática específica, se pueden obtener fácilmente, según el tercer nivel de purificación C ya mencionado, las enzimas específicas de la actividad de la ulvano-liasa. Por supuesto, el volumen de elución en el eje de abscisas corresponde al tiempo de paso de las proteínas a través de la columna, siendo este tiempo discriminante para la enzima ulvano-liasa; mientras que la actividad específica se obtiene midiendo la absorbancia a 235 nm del producto de elución en contacto con un sustrato ulvano.

Por otra parte, en la Tabla siguiente se muestra, además de la actividad y características de las proteínas obtenidas en el tercer nivel C de preparación, las proteínas obtenidas según los otros dos niveles de purificación A y B.

Tabla

Nivel de purificación	Proteínas totales (mg)	Actividad total U	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento %	Rendimiento %
Medio de cultivo sin bacterias (A)	130	15,65	0,12	100	1
Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ (B)	20,76	10,7	0,515	16	43
Purificación cromatografía (C)	0,76	7,20	9,48	0,6	80

Se observa que la actividad específica de la sustancia o de la preparación enzimática procedente del primer nivel A de preparación y que contiene el conjunto de proteínas presentes en el medio de cultivo de la cepa *Ochrobactrum* PEC.2 liberado de las bacterias es esencialmente 100 veces menos importante que la actividad específica de la sustancia enzimática que incluye exclusivamente la ulvano-liasa. Además, se observa que el segundo nivel de purificación B permite obtener una actividad específica aproximadamente cinco veces superior a la actividad específica del medio de incubación de la cepa de *Ochrobactrum* liberado solamente de las bacterias.

Asimismo, conviene calcular los costes de purificación del medio de cultivo según los tres niveles con el fin de apreciar convenientemente el rendimiento de la degradación de los polisacáridos.

20 Ejemplo 1

En este ejemplo se ilustra, en referencia a la Figura 2, las mediciones de la velocidad de degradación enzimática.

Se aplica una preparación enzimática obtenida según el tercer nivel de purificación C (0,5 U) a 100 ml de una solución de sustrato de 2 g/l, correspondiendo el sustrato a ulvano compuesto esencialmente de ácidos aldobiurónicos. En efecto, este sustrato se obtiene liberándolo de los glucuronanos según el proceso descrito anteriormente.

25 La masa molecular media del ulvano utilizado como sustrato se determina mediante cromatografía de exclusión estérica acoplada a un detector de difusión de luz en línea con un refractómetro (Technologie SEC-MALLS, para "Size Exclusion Chromatography Coupled to Multi-angle Laser-Light-Scattering", en lengua inglesa); esta masa media es de $6 \cdot 10^5$.

30 El experimento de degradación se lleva a cabo a 30°C durante un período de tiempo total de 8 horas y, tal como se muestra en la Figura 2, es seguido del análisis de la masa molecular del ulvano por SEC-MALLS al inicio del experimento, $t = 0$, media hora y una hora después, $t = 30$ minutos y $t = 60$ minutos, dos horas después, $t = 120$ minutos; cuatro horas después, $t = 240$ minutos; seis horas después, $t = 360$ minutos y finalmente ocho horas después, $t = 480$ minutos.

35 Así, al inicio del experimento, $t = 0$, la masa molar media de la muestra es de $6 \cdot 10^5$ g/mol y se evidencian fracciones de baja masa molar especialmente a partir del momento $t = 120$ minutos de incubación. Ello revela la degradación del sustrato por una actividad endoglucosidasa.

Tras 8 horas de incubación, ya no se detecta más ulvano de alta masa, de $6 \cdot 10^5$ g/mol, correspondiente al sustrato inicial.

40 La evolución del perfil cromatográfico según la tecnología SEC-MALLS evidencia la posibilidad de obtener fracciones de ulvano cuya masa media dependerá del tiempo de incubación de la enzima en presencia del sustrato. Según el tiempo de incubación y la concentración de enzima adicionada de una sola vez en el momento de la constitución de la mezcla reactiva, se modula el grado de polimerización medio de los oligómeros de ulvano. Con una incubación de 8 horas, los oligómeros obtenidos presentan un grado de polimerización comprendido esencialmente entre 2 y 25.

Ejemplo 2

De acuerdo con el ejemplo 2, se producen, siguiendo el proceso de clivaje enzimático según la invención, oligómeros con un grado de polimerización DP esencialmente equivalente a 2. En primer lugar se describirá cómo se obtienen estos oligómeros y después, con referencia a la Figura 3, se ilustra un perfil de elución y, debajo, el espectro de masas correspondiente a estos oligómeros.

Tras incubar durante 72 horas a 30°C una preparación de 100 ml de ulvano enriquecido con ácidos aldobiurónicos a razón de 20 g/l y adicionada con la preparación enzimática obtenida en el tercer nivel de purificación C (1 U de extracto purificado C) de una sola vez en el momento de la constitución de la mezcla, se calienta la mezcla a 100°C, por ejemplo durante cinco minutos, para inactivar la enzima. Después, se filtra el producto con un filtro de porosidad de 0,2 µm para eliminar las proteínas desnaturalizadas. Se añade entonces isopropanol (2 v) a la preparación para que precipiten aquellos compuestos sacáridos cuyo peso molecular es superior a 2.000 Da (g/mol) y que no hubieran sido degradados por la enzima. Los compuestos precipitados se recuperan tras centrifugación, por ejemplo a 30.000 g durante 30 minutos, luego se liofilizan. El sobrenadante se somete a evaporación para eliminar el isopropanol y concentrar la muestra, la cual entonces se liofiliza.

El rendimiento de la degradación se obtiene después de medir la masa de los productos presentes en el precipitado y en el sobrenadante. En este Ejemplo 2, se recupera en el sobrenadante el 65% de oligómeros de ulvano de bajo grado de polimerización; no habiéndose degradado en pequeñas moléculas el 35% del ulvano de partida. El análisis del producto que resulta de la degradación por cromatografía de exclusión estérica sobre Biogel P2 (detección por refractometría) evidencia una degradación del 65% del sustrato inicial en pequeñas moléculas. Como se muestra en la Figura 3, la fracción mayoritaria eluida entre 310 y 380 ml, es analizada alrededor de 360 ml, mediante espectrometría de masas de tipo ESI-Q/TOF (para electrospray-cuadrupolo-tiempo de vuelo). Los resultados muestran que el 80% de los oligómeros procedentes de la degradación del ulvano presenta un grado de polimerización DP igual a 2, siendo la masa del ión de 401,1, mientras que el 20% de los oligómeros presenta un grado de polimerización DP igual a 4, siendo la masa del ión de 824,8.

Ejemplo 3

Según el ejemplo 3, se producen oligómeros con un grado de polimerización DP esencialmente superior a 2.

Para ello, la incubación de la enzima (preparación C, 1 U) en presencia de 100 ml del sustrato de ulvano enriquecido con ácidos aldobiurónicos a razón de 20 g/l se prolonga aquí a 36 horas.

Entonces, la elución en columna Biogel P6 evidencia la presencia de oligómeros eluidos entre 60 y 170 ml, tal como se ilustra en el perfil de elución representado en la Figura 4. Se distinguen con más precisión unos oligómeros de pequeño tamaño o con un grado más bajo de polimerización DP, eluidos más tarde entre 150 y 170 ml, así como oligómeros de tamaño mayor con un grado de polimerización superior a 4 y eluidos entre 60 y 140 ml. Así, se pone de manifiesto la posibilidad de obtener oligómeros de ulvano del tamaño que se desea modulando especialmente los parámetros de tiempo de incubación y cantidad de sustancia enzimática.

Por supuesto, estos resultados obtenidos para cantidades modestas de materias primas, ya sean de sustancia enzimática o de sustrato de ulvano, se pueden trasladar fácilmente a nivel industrial con el fin de producir los oligómeros deseados a un coste ventajoso.

En la técnica anterior no se deja constancia de la producción de oligosacáridos procedentes de ulvanos enriquecidos con ácidos aldobiurónicos. Los oligosacáridos según la técnica anterior tienen grados de polimerización DP de 2 ó 4 y excepcionalmente 8, ya que se producen pocos oligómeros por medio de los procesos descritos y sólo se han descrito los mayoritarios.

En el caso del proceso según la invención, los oligómeros se componen en su mayoría de ácidos aldobiurónicos, ya que dicho proceso permite eliminar el glucuronano presente en el extracto bruto. Permite asimismo ajustar el tamaño de los oligómeros deseados, es decir con un grado de polimerización DP de 2 ó 4 degradando mayoritariamente durante 72 horas el polímero enriquecido con ácidos aldobiurónicos. En este caso, se obtiene un rendimiento del 65% en oligómeros con DP 2 y DP 4 y un 35% del producto resultante de la degradación presenta un grado de polimerización DP superior a 4.

En el caso de una degradación de 36 horas, se forman pocos oligómeros con DP 2, teniendo mayoritariamente los oligómeros un DP > 4, tal como se ilustra en la Figura 4. Según las condiciones de incubación del sustrato de ulvano en presencia de la enzima producida por *Ochrobactrum*, es posible modular el tamaño de los oligómeros de ulvano. Con 8 horas de incubación, el polímero de peso molecular medio $6 \cdot 10^5$ Da se degrada en oligómeros con un DP mayoritariamente comprendido entre 2 y 25.

Por tanto, mediante el proceso aquí descrito es posible modular el DP medio de los oligómeros de ulvano enriquecidos con ácidos aldobiurónicos. Además, se pueden obtener familias compuestas de oligómeros con grados de polimerización DP más próximos, ya sean oligómeros con DP 2, 4 u oligómeros cuyo DP se sitúa entre 2 y 8; o también

oligómeros cuyo DP está entre 2 y 25 y entre 4 y 25 mediante extracción de los oligómeros con un DP de 2. Para estas purificaciones se utilizarán procesos de nanofiltración o procesos de cromatografía.

- 5 Así, los oligómeros obtenidos son comparables a los glucosaminoglicanos, en particular a la heparina y al sulfato de heparano, así como al sulfato de condroitina y al sulfato de dermatano. Por consiguiente, su aplicación se encuentra en los campos terapéuticos y cosméticos.

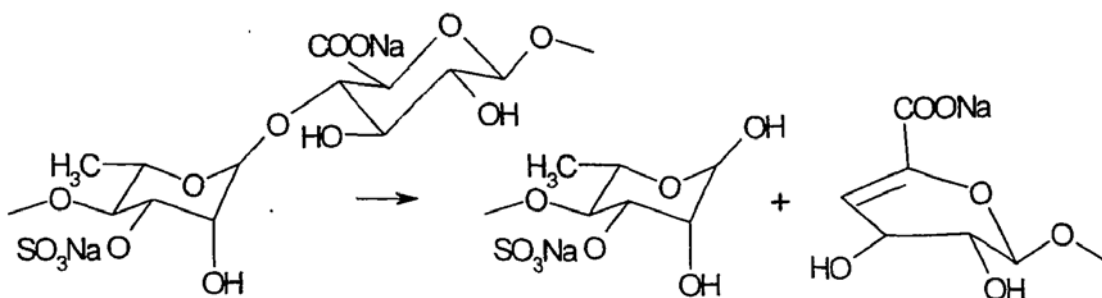
Por ello, se prevén aplicaciones de los oligosacáridos de ulvano en el campo de la cosmética, en particular para tratar la piel contra lesiones causadas por el medioambiente, la edad y para proteger y mejorar su aspecto y su estado fisiológico. Se prevé también la utilización de los oligosacáridos de ulvano para modular la adhesión y proliferación de células tumorales.

- 10 Se prevén también aplicaciones en el campo fitosanitario; por ejemplo como agente de fertilización para plantas. Se plantean asimismo composiciones a partir de familias de oligómeros con un grado de polimerización DP entre 2 y 25 y enriquecidos con ácidos aldobiurónicos como estimulante de las defensas naturales de los vegetales contra el estrés biótico y abiótico.

REIVINDICACIONES

1. Proceso de clivaje enzimático de polisacáridos que comprenden una primera secuencia $[\rightarrow 4]\text{-}\beta\text{-D-GlcpA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap3-sulfato-(1}\rightarrow]_n$ y una segunda secuencia $[\rightarrow 4]\text{-}\alpha\text{-L-IdopA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap3-sulfato-(1}\rightarrow]_m$, estando compuestas las secuencias primera y segunda de dos unidades osas unidas por un enlace osídico respectivamente,

- 5
- se proporcionan dichas secuencias de polisacárido;
 - se proporciona un microorganismo apto para producir una sustancia enzimática del tipo liasa; y,
 - se pone en contacto esta sustancia enzimática con dichas secuencias de polisacárido de modo que se provoca el clivaje del enlace osídico según una reacción de β -eliminación siguiendo el mecanismo esquemático:



10

caracterizado porque se selecciona un microorganismo que pertenece a las bacterias del género *Ochrobactrum* para producir la mencionada sustancia enzimática.

2. Proceso de clivaje enzimático según la reivindicación 1, caracterizado porque la cepa bacteriana seleccionada pertenece a la especie *Ochrobactrum tritici*.
- 15 3. Proceso de clivaje enzimático según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque se incuban dichas bacterias con un sustrato polisacárido con el fin de producir la sustancia enzimática y porque se aíslan las bacterias incubadas de dicha sustancia enzimática.
4. Proceso de clivaje enzimático según la reivindicación 3, caracterizado porque dicha sustancia enzimática se purifica para retener la enzima específica del clivaje del enlace osídico.
- 20 5. Proceso de clivaje enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la sustancia enzimática provoca el clivaje de un número de enlaces osídicos de dichas secuencias de polisacárido comprendido entre $6 \cdot 10^{16}$ y $6 \cdot 10^{20}$ por minuto y miligramo de dicha sustancia enzimática.
6. Proceso de clivaje enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque se extraen dichas secuencias de polisacáridos a partir de un alga del género *Ulva*.
- 25 7. Proceso de clivaje enzimático según la reivindicación 6, caracterizado porque, comprendiendo además dichos polisacáridos secuencias que incluyen glucuronano, se elimina dicha secuencia que incluye glucuronano, de las citadas secuencias primera y segunda $[\rightarrow 4]\text{-}\beta\text{-D-GlcpA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap3-sulfato-(1}\rightarrow]_n$, $[\rightarrow 4]\text{-}\alpha\text{-L-IdopA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap3-sulfato-(1}\rightarrow]_m$.
- 30 8. Proceso de clivaje enzimático según la reivindicación 6 ó 7, caracterizado porque dichos polisacáridos comprenden además heparanos que incluyen polímeros compuestos de $[\rightarrow 4]\text{-}\beta\text{-D-GlcpA-2-sulfato-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcNsulfo-6-sulfato-(1}\rightarrow]_x$ y/o de $[\rightarrow 4]\text{-}\alpha\text{-L-IdopA-2-sulfato-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcNsulfo-6-sulfato-(1}\rightarrow]_y$.
9. Sustancia enzimática del tipo de las liasas adaptada al proceso de clivaje enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada porque se obtiene a partir de un microorganismo que pertenece a las bacterias del género *Ochrobactrum*.
- 35 10. Sustancia enzimática según la reivindicación 9, caracterizada porque la cepa bacteriana pertenece a la especie *Ochrobactrum tritici*.
11. Sustancia enzimática según la reivindicación 10, caracterizada porque la cepa bacteriana es la cepa *Ochrobactrum tritici* CNCM I-3776.

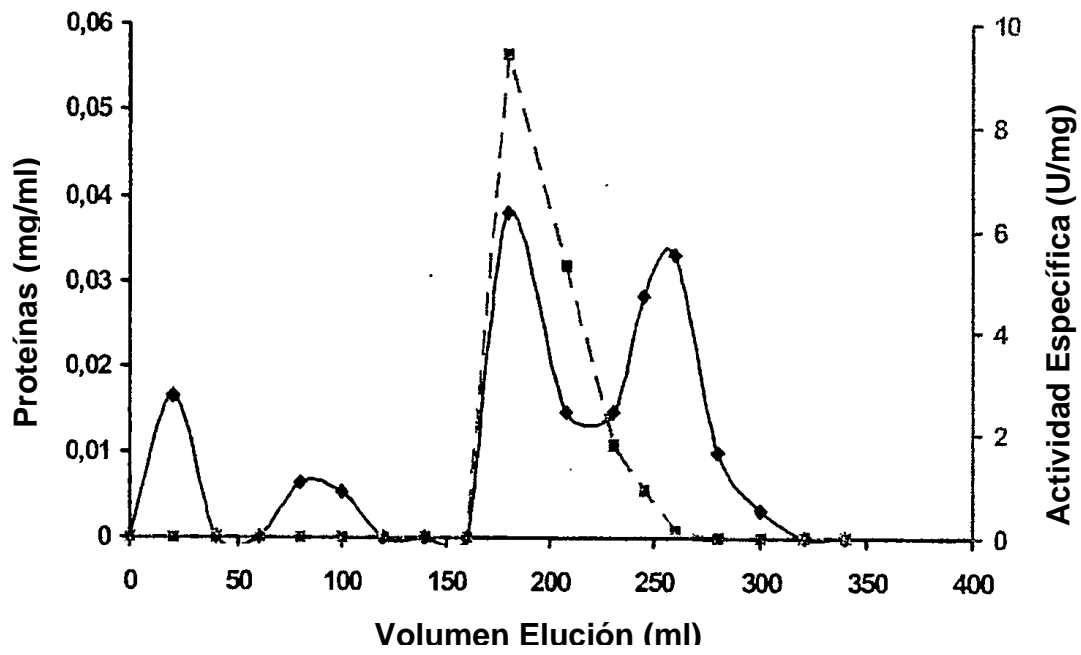


FIG. 1

FIG. 2

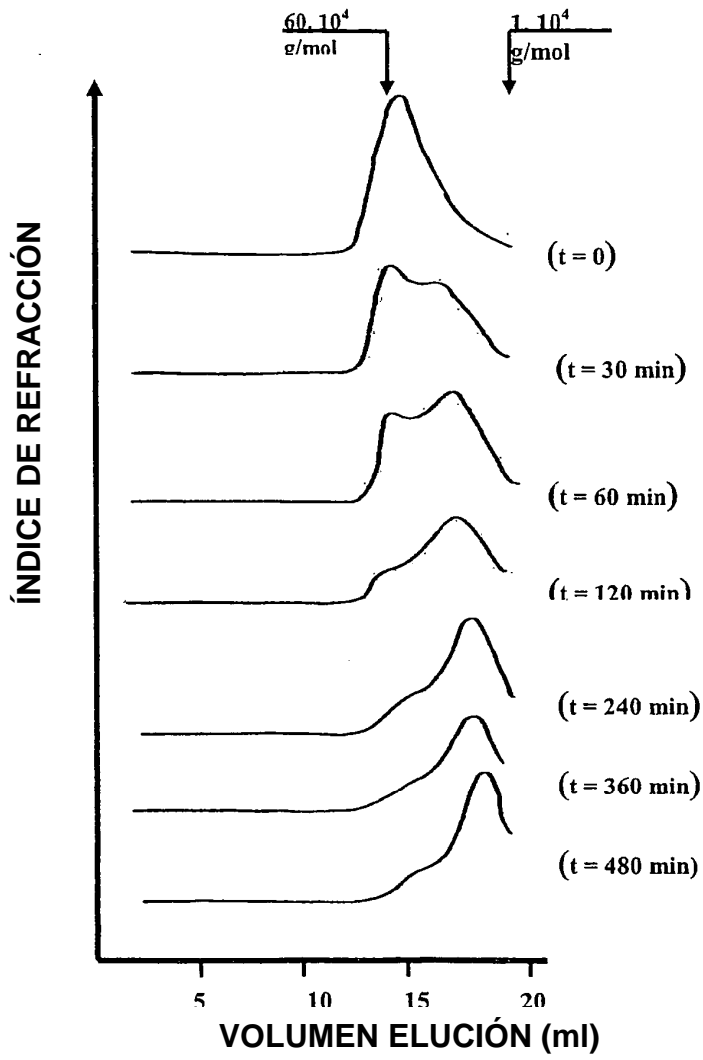


FIG. 3

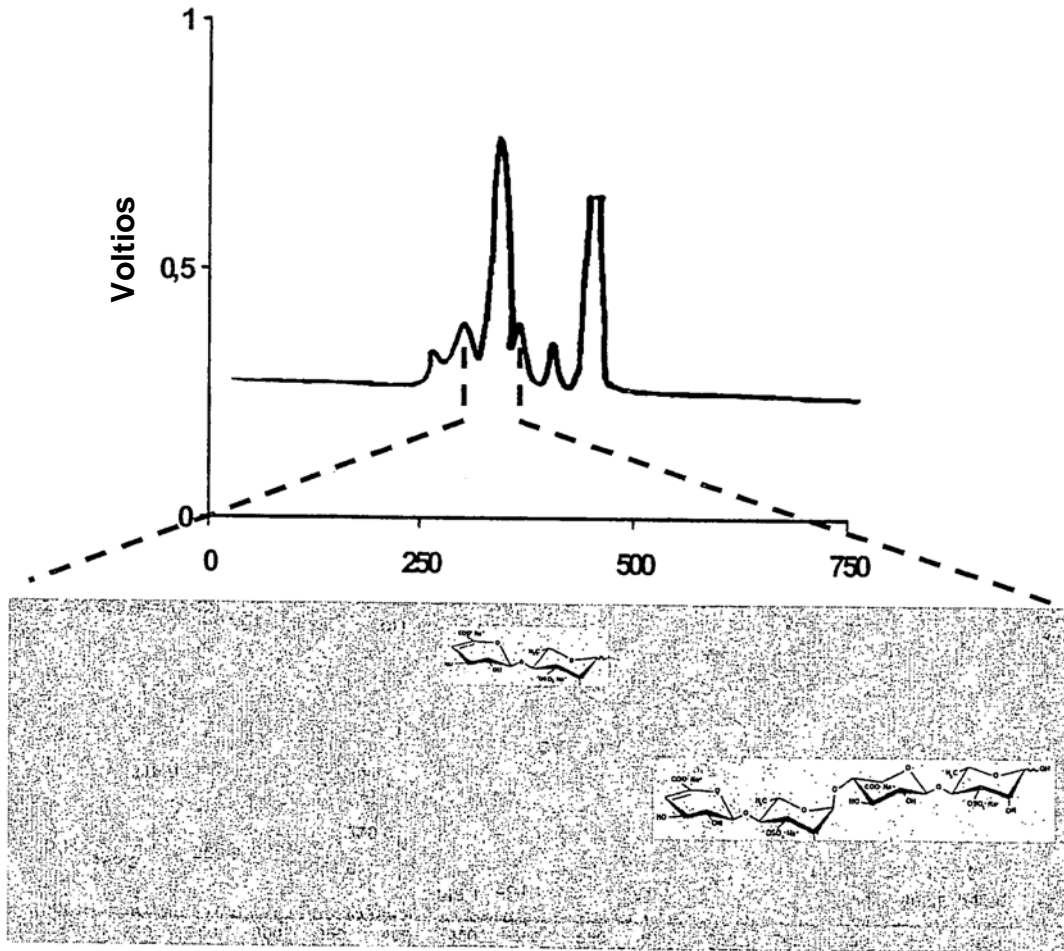


FIG . 4

