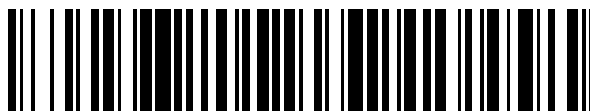


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 373**

51 Int. Cl.:

C12N 1/12 (2006.01)

C07K 14/405 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2010** **E 10755519 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014** **EP 2412796**

54 Título: **Método de obtención y producción masiva de una especie de cianobacteria aislada productora de ficotoxinas paralizantes**

30 Prioridad:

24.03.2009 CL 7222009

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.11.2014

73 Titular/es:

PROTEUS S.A. (100.0%)
Cerro San Luis 9971, Bodega 3, Quilicura
Santiago, CL

72 Inventor/es:

LAGOS GONZÁLEZ, MARCELO SANTIAGO

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 523 373 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

Método de obtención y producción masiva de una especie de cianobacteria aislada productora de ficotoxinas paralizantes.

CAMPO DE APLICACIÓN DE LA INVENCION

- 5 Esta invención se relaciona con un método de producción de cianobacterias (algas verdes-azules fotosintéticas), específicamente al desarrollo de un proceso artificial, masivo, en condiciones controladas, útil para generar metabolitos de interés, tales como toxinas paralizantes, a nivel industrial. El método está caracterizado por su eficiencia, alto rendimiento, simpleza y alta rentabilidad.

DESCRIPCIÓN DEL ARTE PREVIO

- 10 Neosaxitoxina y Saxitoxina son componentes del denominado veneno paralizante, estas toxinas son producidas por dinoflagelados de los géneros *Alexandrium* sp., *Piridinium* sp., y *Gymnodinium* sp. y por ende, también a veces se encuentran en los mariscos bivalvos filtradores y gastrópodos carnívoros contaminados por florecimientos algales nocivos, conocidos comúnmente como mareas rojas, (Lagos, N. (1998)) Microalgal blooms: a global issue with negative impact in Chile. Biol. Res. 31: 375-386). Estas ficotoxinas, además de ser producidas por dinoflagelados en el mar, también son producidas por cianobacterias en agua dulce (algas verdes-azules fotosintéticas).

Existen publicadas en la literatura, sólo 5 especies de cianobacterias productoras de ficotoxinas paralizantes de mariscos, cada una de ellas con composición característica tanto en cantidad como tipo de ficotoxinas producidas (perfil de ficotoxinas paralizantes):

- 20 - *Cylindrospermopsis raciborskii* aislada de Brasil (Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P.A., Andrinolo, D., Azevedo, S.M.F.Q., and Oshima, Y., 1999, The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil.; TOXICON, 37: 1359 - 1373; Molica, R., Onodera, H., García, C., Rivas, M., Andrinolo, D., Nascimento, S., Meguro, H., Oshima, Y., Azevedo, S., and Lagos, N., 2002, Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Pernambuco, Brazil, Phycologia, 41 (6): 606 – 611).

- 25 - *Aphanizomenon flos-aquae* aislada en Portugal (Pereira, P., Onodera, H., Andrinolo, D., Franca, S., Araujo, F., Lagos, N., and Oshima, Y; 2000, paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacteria *Aphanizomenon flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal. Toxicon, 38: 1689 – 1702.

- *Anabaena circinalis* aislada de Australia (Lagos, 1999)

- *Lyngbya wollei* aislada en Norte América (Lagos, 1999)

- 30 - *Aphanizomenon(Aph) gracile (Lemm) Lemm*, (Pereira P LMECYA40). Esta alga verde-azul unicelular fotosintética, es la única cianobacteria de este tipo, productora solamente de las tetrahidropurinas: neosaxitoxina y saxitoxina, en una relación de 78 a 82% de neosaxitoxina y 22 a 18% de saxitoxina.

- 35 El método propuesto en la presente solicitud, es el cultivo continuo y bajo condiciones controladas de una cianobacteria que produce un perfil simple de ficotoxinas paralizantes. Este perfil depende de la especie cultivada, e incluye a neosaxitoxina y saxitoxina o Gonyaulotoxinas 2 y 3. Además, este método de cultivo, incluye aditamentos de micro nutrientes, permitiendo la producción más alta de estos compuestos farmacológicamente activos por peso húmedo de microalga hasta ahora descrita.

- 40 Neosaxitoxina, saxitoxina y gonyaulotoxinas, son compuestos que presentan una estructura básica que corresponde a las tetrahidropurinas y son producidos por las cianobacterias mencionadas como metabolitos secundarios. Estos compuestos, como todo metabolitos secundario, se encuentran dentro de las células pero también son liberadas al medio de cultivo. Así, se generan dos fuentes de estos productos: en la fracción de la pella celular y en el medio donde se cultivan las cianobacterias.

- 45 El cultivo masivo y continuo de estas cianobacterias, tanto en reactores de iluminación abierta o natural, como en reactores de iluminación cerrada, donde la luz se provee por medios artificiales, como por ejemplo tubos fluorescentes u otro, incluidos led de luz blanca, permite la producción permanente y continua de la cianobacteria, la cual es estrictamente necesaria para la posterior producción a nivel industrial de neosaxitoxina, principal componente a purificar a partir de esta cianobacteria. Sin embargo, dependiendo de la cianobacteria cultivada y de las condiciones del cultivo, se pueden purificar posteriormente no sólo neosaxitoxina, sino también saxitoxina y otros

análogos de saxitoxina, como gonyaulatoxinas y otros. Todos estos compuestos pertenecen al grupo de las denominadas ficotoxinas paralizantes.

El proceso de producción industrial y continua con alto rendimiento de cianobacterias, no se ha realizado anteriormente. Hasta ahora no se ha descrito el desarrollo de un procedimiento artificial, para una especie de cianobacteria que tiene un perfil de ficotoxina característico y único; por ejemplo, una composición única con sólo neosaxitoxina y saxitoxina en una proporción definida de 5 a 1 respectivamente o solamente de gonyaulatoxinas en ausencia de otras ficotoxinas paralizantes.

Otra característica ventajosa, es la altísima producción de ficotoxinas en las condiciones y procedimientos de cultivo seleccionadas, y que se describen en la presente invención, lo que permite definir a las cianobacterias como la mejor fuente de estas ficotoxinas, especialmente neosaxitoxina para el caso de *Aphanizomenon(Aph) gracile* (Lemm) Lemm, el componente mayoritario y el de mayor interés para producir masivamente.

Esta especie de cianobacteria *Aphanizomenon(Aph) gracile* (Lemm) Lemm, es productora de saxitoxina y mayoritariamente neosaxitoxina, y fue colectada en el Lago Crato, un reservorio de aguas en Portugal, aislada y codificada como **LMECYA 41** y fue identificada como *Aphanizomenon (Aph) gracile* (Lemm) Lemm, primero en función de su morfología y posteriormente de acuerdo a su secuencia génica del 16S rRNA (Paulo Pereira, et al., 2001. 5th Internacional conference on toxic cianobacteria, 15-20 Julio 2001, Queensland, Australia).

Inicialmente esta cepa fue recolectada en una muestra de agua cruda del reservorio, que presentaba una dominancia alta de filamentos de *Aphanizomenon (Aph) gracile* (Lemm) Lemm, siendo esta la segunda especie dominante, encontrándose en un rango de 32 a 40 % de la masa de la especies encontradas en la muestra original. Posteriormente, en el laboratorio, usando técnicas convencionales y de rutina y por repetitivos y sucesivos lavados y aislados de los tricomas, aislados individualmente y sucesivamente en pequeñas gotas de clonación, tomadas con pinzas (pequeños anillos estériles de aislamiento), todos en medio de cultivo estériles y observados en microscopio invertido, se logra obtener un solo tricoma el cual se transfiere a un frasco estéril de un volumen total de 10 mililitros conteniendo 5 mililitros de medio. El cultivo de esta cianobacteria única (unialgal), creció a 25° C entre dos a cuatro semanas, hasta lograr el desarrollo adecuado para la producción posterior. De este desarrollo original se comienza la expansión y producción masiva de esta cianobacteria unialgal, haciendo replicaciones continuas del cultivo según necesidad, guiándose siempre y de acuerdo al recuento de filamentos mantenidos, siempre, en fase exponencial de crecimiento. Durante esta etapa de crecimiento y de desarrollo del cultivo unialgal, se mantiene la cepa en ciclos de luz-oscuridad de 16:8 horas. Los filamentos son contados usando tinción de lugol en cámaras de conteo tipo sedge-wich-rafter y Palmer-Maloney, controlando así el desarrollo del cultivo.

Este método de aislar una cianobacteria y obtener un cultivo puro, se puede aplicar a cualquiera de las otras cianobacterias productoras de ficotoxinas paralizantes anteriormente mencionadas.

Una vez obtenido el cultivo puro, se utiliza como inóculo para la producción masiva de cianobacterias de acuerdo al presente invento.

Las ventajas de la presente invención, a través de producción masiva y en condiciones controladas de cianobacteria productora de ficotoxinas paralizantes, son:

- Una producción continua, permanente y en condiciones controladas de cianobacteria productora de ficotoxinas paralizantes
- Bajo costo productivo porque el medio de cultivo es muy elemental, sin nutrientes de alto valor y sólo requiere control de luz, lo cual significa un fácil manejo de la cianobacteria,
- Proveer una fuente continua, independiente de las condiciones y cambios de medios ambientes, de ficotoxinas paralizantes (saxitoxina , neosaxitoxina y gonyaulatoxinas)
- Relación costo-producción-rendimiento muy favorable, no logrado hasta ahora y tampoco descritos en proceso industrial alguno.

El documento de Pomati et al, Pomati et al: "Evidence for differences in the metabolism of saxitoxin and C1+2 toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* T3", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA - GENERAL SUBJECTS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 1674, no. 1, 6 Septiembre 2004 (2004-09-06), pags 60-67, describe el crecimiento de la cianobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii* en medio MLA suplementado con 10 mM arginina y describe que dichos niveles de arginina incrementan la producción de saxitoxina en la cepa T3 de *Cylindrospermopsis raciborskii*.

El documento de Pomati et al, Pomati et al: "The purine degradation pathway: Possible role in paralytic shellfish toxin metabolism in the cyanobacterium *Planktothrix* sp", ENVIRONMENT INTERNATIONAL, PERGAMON PRESS, US, vol. 27, no. 6, 1 Diciembre 2001 (2001-12-01), pags 463-470, describe que el ácido alantoico estimula la producción de saxitoxina en las especies de *Planktothrix*.

- 5 El documento de Soto et al, Soto et al: "The effects of chloramphenicol, arginine and temperature on PST-production by *Cylindrospermopsis raciborskii* strain D9", PROCEEDINGS OF THE 12TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMFUL ALGAE. COPENHAGEN 2008, INTERNATIONAL SOCIETY FOR THE STUDY OF HARMFUL ALGAE AND INTERGOVERNMENTAL OCEANOGRAPHIC COMMISSION OF UNESCO, 1 Enero 2008 (2008-01-01), pags 330-333, describe que la cepa D9 de *Cylindrospermopsis raciborskii* tiene una reducción del 48% en producción de saxitoxina después de estimulación con arginina (en medio MLA) mientras que la cepa T3 de la misma especie tiene un incremento del 476%.

- 10 Los documentos de Shimizu et al, Shimizu et al: "BIOSYNTHESIS OF SAXITOXIN ANALOGS THE UNEXPECTED PATHWAY", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 106, no. 21, 1984, pags 6433-6434, y de Quintero et al, Quintero et al: "Arginine catabolism in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 involves the urea cycle and arginase pathway.", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 182, no. 4, 1 Febrero 2000 (2000-02-01), pags 1008-1015, describen que para fabricar moléculas de saxitoxina, se necesita arginina, acetato y metionina.

OBJETIVOS DE LA INVENCION

- 20 El objetivo general de la presente invención es la producción masiva, continua e industrial, en condiciones controladas y de bajo costo de una cianobacteria productora fundamentalmente de las ficotoxinas paralizantes como saxitoxina, neosaxitoxina y/o gonyaulatoxinas.

Un objetivo específico de la invención, es el desarrollo de un procedimiento de producción optimizada, en una especie de cianobacteria monocultivo a un costo bajo y comercialmente competitivo.

- 25 Otro objetivo específico de la invención, es el logro de un procedimiento industrial y continuo, en forma perpetua de esta cepa, como fuente de compuestos de alto valor agregado, no disponible comercialmente y con aplicaciones en terapia clínica de varias patologías.

Otro objetivo específico de la invención, es el logro de un cultivo continuo de esta cepa de cianobacteria, dirigida a favorecer la producción de fundamentalmente neosaxitoxina, con una pequeña cantidad de saxitoxina (un quinto de neosaxitoxina) o de producción fundamental de gonyaulatoxinas 2/3 como componente mayoritario y primordial

- 30 Otro objetivo específico de la invención, es lograr una alta producción de neosaxitoxina y/o gonyaulatoxinas por célula de cianobacteria.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 35 FIGURA 1: Producción de filamentos en un día de cultivo considerando el medio de cultivo de la presente invención (Medio MLA modificado con metionina, arginina y ácido alantoico) en condiciones de luz continua y medio de cultivo no modificado (Medio MLA simple) con ciclo de luz:oscuridad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente solicitud se presenta un método de obtención y producción masiva de una cianobacteria a través de un cultivo continuo. Las cianobacterias susceptibles de cultivo continuo, son entre otras:

- *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Aphanizomenon flos-aquae*;
- 40 - *Aphanizomenon*(*Aph*) *issatschenkoi* (*Usacev*) *Proskina-Lavrenco*;
- *Anabaena circinalis*, *Lyngbya wollei* y *Aphanizomenon gracile* (*Lemm*) *Lemm*.

- 45 El conocimiento de las cianobacterias productoras de ficotoxinas paralizantes se encuentra asociado al problema de salud pública, en donde la contaminación de moluscos por estas ficotoxinas, relacionadas a floraciones de dinoflagelados productoras de ficotoxinas, tiene un grave impacto en salud pública y en la industria conservera de mariscos en las regiones donde se presentan las mareas rojas, es decir donde hay floración de dinoflagelados productores de ficotoxinas (Lagos 1998).

Estas especies de cianobacterias, cuando fueron descritas, se caracterizaron sólo de acuerdo a sus características anatómicas y clásicas de la taxonomía. Estas especies no fueron estudiadas y ni caracterizadas inicialmente en función de los compuestos que producen y cuando se hizo el estudio de las ficotoxinas que producen, se hizo con el objetivo de comprender y solucionar los problemas a nivel de toxicidad y salud pública, pero hasta la presentación de esta solicitud, nunca se ha propuesto una producción masiva de ficotoxinas paralizantes (todos análogos de saxitoxinas) y derivados a partir de las cianobacterias y tampoco se ha propuesto el cultivo de cianobacterias como una fuente continua y perpetua de ficotoxinas paralizantes.

En la presente solicitud, se presenta un método de obtención y producción masiva de una cianobacteria a través de un cultivo continuo, tomando como ejemplo el cultivo de (*Aph*) gracile (Lemm) Lemm. Sin embargo, el método de cultivo continuo es aplicable a los géneros de cianobacterias señalados: *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Aphanizomenon(Aph) issatschenkoi* (Usacev) Proskina-Lavrenco, *Anabaena circinalis*, *Lyngbya wollei*, y *Aphanizomenon gracile* (Lemm) Lemm.

La disponibilidad de estas cianobacterias aisladas, ha permitido desarrollar estudios continuos e inventar este proceso de producción masiva.

Para el cultivo y desarrollo de una cianobacteria, se requieren reactores en serie, abiertos o cerrados y con iluminación directa que cubra a todos los reactores.

El cultivo sólo requiere agua dulce, sales minerales y micronutrientes en bajas cantidades, todos de bajo costo y simples de preparar.

Otro requerimiento preferido es un ciclo de luz permanente sin oscuridad, esta también es una innovación de este procedimiento masivo de cultivo, ya que las cianobacterias son organismos fotosintéticos y requieren luz, y se mantienen a su máximo desarrollo siempre en fase exponencial de crecimiento. En relación a esto, es importante destacar que también se pueden usar ciclos de luz y oscuridad de diferentes rangos horarios, durante el desarrollo de este cultivo continuo, incluso utilizando los ciclos dados por luz natural. Otra innovación del proceso descrito en esta solicitud, es el mantenimiento permanente del cultivo en crecimiento en fase exponencial y en producción permanente de ficotoxinas, esto último, realizando cosechas selectivas y cuantificadas, dependiendo del desarrollo cuantitativo del cultivo en cada reactor.

El cultivo de cianobacterias requiere medios estériles, para mantener los cultivos en las mejores condiciones, sin embargo, estos cultivos no requieren condiciones extremas de esterilidad como en el caso de cultivo de células eucariontes, como por ejemplo células de mamíferos.

Estas cianobacterias son muy resistentes a las contaminaciones y debido a que los requerimientos de su desarrollo son mínimos, los medios de cultivo utilizados en la presente invención, son demasiados "pobres" para el desarrollo de otros microorganismos, es un medio natural de selección donde sólo se reproducen estos organismos fotosintéticos.

El rango de temperatura óptimo, para el crecimiento de estas cianobacterias, se encuentran dentro del rango normal de las variaciones de temperatura ambientales de un clima Chaparral-Mediterráneo como el del área Central de Chile (entre Arica hasta Temuco).

Cuando la cianobacteria se ha desarrollado, se retira un volumen adecuado para ser utilizada, por ejemplo, en la purificación de un metabolito producido por la cianobacteria, y se repone el volumen retirado del cultivo celular, agregando un volumen equivalente de medio esterilizado. De acuerdo al recuento de filamentos en el tiempo, una vez alcanzado un desarrollo determinado, se puede volver a colectar otro volumen adecuado de cianobacterias, siempre manteniendo el mismo volumen final del medio de cultivo, renovando con un volumen equivalente de recambio cada vez que se colecta un volumen determinado de células.

Se obtiene así un sistema de cianobacterias en cultivo, como fuente continua de producción de cianobacterias.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Para iniciar el cultivo a nivel industrial de la cianobacteria productora de ficotoxinas paralizantes, se requiere partir de una cianobacteria aislada y caracterizada, que puede ser, entre otros, de los géneros *Cylindrospermopsis sp.*, *Aphanizomenon sp.*, *Anabaena sp.*, y *Lyngbya sp.*

El cultivo de cianobacterias, considerando una especie particular elegida, se realiza en reactores aireados apropiados, con agitación y luz permanente. La luz puede ser artificial, por ejemplo, emitida por tubos fluorescentes.

El medio de cultivo considerado para la reproducción de las cianobacterias, consiste en agua destilada, sales minerales y micronutrientes, todos ellos esterilizados.

5 El medio de cultivo se prepara en base a el medio MLA X 40 (MLA medium, CSIRO marine research, CSIRO microalgae research center, Hobart, Australia, for cyanobacterial culture(microalgae@)marine.csiro.au), que contiene, entre otros, los siguientes componentes $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , K_2HPO_4 , H_3BO_3 , H_2SeO_4 , Biotina, vitamina B12 y tiamina-HCl, EDTA-Na, cloruro férrico hexahidratado, carbamato de sodio y cloruro de manganeso hidratado, NaHCO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Además, el medio de cultivo de la presente invención, incorpora arginina, metionina y ácido alantoico.

10 En la tabla a continuación, se presentan rangos de concentración de los componentes antes mencionados, útiles para el método de la presente invención.

Compuesto	Concentración mínima (g/l)	Concentración máxima (g/l)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,71E-02	6,18E-02
NaNO_3	1,28E-01	2,13E-01
K_2HPO_4	2,61E-02	4,35E-02
H_3BO_3	1,85E-03	3,09E-03
H_2SeO_4	9,68E-04	1,61E-03
Biotina	3,75E-08	6,25E-08
Vitamina B12	3,75E-08	6,25E-08
Tiamina HCl	7,50E-05	1,25E-04
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	7,50E-06	1,25E-05
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,65E-05	2,75E-05
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	7,50E-06	1,25E-05
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,50E-06	7,50E-06
Na_2EDTA	3,27E-03	5,45E-03
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,19E-03	1,98E-03
NaHCO_3	4,50E-04	7,50E-04
$\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,70E-04	4,50E-04

Adicionalmente, el medio de cultivo comprende entre 2 y 3,5 mM final de arginina, entre 1 y 2,2 mM de metionina y entre 0,7 y 1,3 mM de ácido alantoico.

15 La preparación del medio de cultivo, se realiza usando soluciones "stock" que se preparan separadamente y se esterilizan, ya sea por filtración o por autoclave.

Se conoce el medio de cultivo MLA de CSIRO para el crecimiento de cianobacterias, sin embargo, el medio de cultivo completo descrito en la presente invención considera sales minerales, micronutrientes y vitaminas que no se encuentran en dicho medio ni en ninguna otra publicación respecto al cultivo de cianobacterias.

Una vez preparado el medio, se inoculan las cianobacterias en un rango de 20 a 40 millones de filamentos por cada 3 litros del medio de cultivo de la invención.

Las condiciones de cultivo consideran iluminación constante, proveída por tubos fluorescentes a una temperatura controlada de entre 15 a 35°C, preferentemente en un rango de entre 20 a 25°C con un óptimo de $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

5 En particular, dependiendo del ciclo de división de la cepa utilizada en el cultivo, es posible retirar un volumen de entre 20 a 40% del total del volumen en el reactor para procesar las cianobacterias, y reemplazarlo por un volumen equivalente de medio de cultivo fresco. Por ejemplo, si el ciclo de división es de 0,33 por día, es posible retirar un tercio del volumen del cultivo y reemplazarlo por un volumen equivalente de medio de cultivo fresco, cada 1 ó 2 días.

10 Para determinar el momento de recolección de cianobacterias, se monitorea el crecimiento a través del conteo de los filamentos y cuidando de restituir un volumen equivalente de medio de cultivo fresco cada vez que se realiza una recolección de cianobacterias.

15 Existe una publicación donde se describe el cultivo de la cepa de *Aphanizomenon (Aph) gracile (Lemm) Lemm LMECYA40*, el medio descrito en la publicación, es totalmente distinto al medio MLA modificado descrito en esta invención. Esta es la primera vez, donde se describe el uso del medio MLA como base para el cultivo de cianobacterias. Para adaptarse al cultivo de las cianobacterias de la presente invención, el medio MLA ha sido modificado, se le ha agregado los componentes arginina, metionina y ácido alantoico, compuestos que sorprendentemente han demostrado ser potentes estimuladores de la producción de las ficotoxinas saxitoxina, neosaxitoxina y gonyaulatoxinas.

20 En primer lugar, el método de la invención comprende generar un inóculo en un rango de 20 a 40 millones de filamentos, este inóculo se desarrolla en matraces pequeños de 250 mililitros en una cámara de cultivo con luz-oscuridad (16:8 horas) y temperatura controlada a $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

El inóculo obtenido se traspa a reactores, los que deben estar en condiciones estériles y mantenidos en condiciones aisladas.

25 La temperatura de cultivo del método de la presente invención, es controlada entre 20 - 25 ° C. Por ejemplo, si se quiere producir *Aphanizomenon (Aph) gracile (Lemm) Lemm* se debe considerar que esta cepa se cultiva bien en el rango de 15 - 30 °C, siendo sus condiciones óptimas entre $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

Las células de *Aphanizomenon (Aph) gracile (Lemm) Lemm*, tienen un ciclo de división ya conocido de 0,33 por día. Esto significa que en tres días el cultivo duplica su masa celular. Esto permite, coleccionar un litro de cultivo de cada reactor de 3 litros, cada 1 a 2 días máximo.

30 Se repone el volumen retirado del cultivo celular agregando un litro de medio esterilizado. Al día siguiente o a los dos, según recuento de filamento, se puede volver a coleccionar otro litro de cianobacterias, siempre manteniendo un volumen de 3 litros del medio de cultivo.

35 Se obtiene un sistema de cianobacterias en cultivo como fuente continua de producción de cianobacterias en forma perpetua. La colección de medio de cultivo con cianobacterias se puede realizar convenientemente cada dos días, lográndose así un mayor número de filamentos. Bajo las condiciones de producción máxima no es conveniente espaciar la cosecha por periodos de más de 4 días, ya que al aumentar la concentración de filamentos en el cultivo este se deteriora y se produce una disminución de producción de ficotoxina.

40 El pellet celular corresponde a las cianobacterias formando filamentos. Estos filamentos tienen desde 20 a 100 células e incluso más células unidas en un filamento. Por eso se denominan cianobacterias filamentosas. Cuando están "sanas" y creciendo muy bien forman los filamentos, pues ahí es donde se dividen celularmente. Esta característica filamentosa se utiliza como control de crecimiento, ya que es un control positivo de desarrollo de la cianobacteria. La capacidad de formar filamentos permite un mejor control de la contaminación del medio, ya que cuando el medio se contamina y se produce una infección, las cianobacterias no forman filamentos.

45 El pellet celular está constituido de filamentos y son estos los que se cuantifican en el microscopio de fase invertida, ya que las células individuales son muy pequeñas, difíciles de contar y no existen en un cultivo sano.

Adicionalmente se recolecta el medio libre de células, el sobrenadante de la centrifugación para obtener el pellet, la centrifugación se realiza convenientemente a $10.000 \times g$ x 20 minutos. En este sobrenadante de forma soluble, se encuentran también las ficotoxinas.

Este sobrenadante, corresponde a la segunda fuente de ficotoxinas, en buenas condiciones de cultivo, con filamentos sanos y sin contaminación y en fase de crecimiento exponencial permanente, tiende a ser menos del 5 % del contenido total obtenido en la fracción del pellet.

5 La productividad descrita en la presente invención, es entre 60 - 125 veces mayor que las productividades descritas por Paulo Pereira, et al., 2001, (5th Internacional conference on toxic cyanobacteria, 15-20 Julio 2001, Queensland, Australia).

10 La cepa fue cultivada en condiciones convencionales (sin estos reactores desarrollados y usados aquí), con otros nutrientes y micronutrientes y manteniendo ciclos de luz:oscuridad de 16:8 horas y a otras temperaturas. Sin duda en la presente invención, donde se describe una producción masiva e industrial, que incluye no sólo una manera nueva de cultivar en forma continua, sino que además hay un procedimiento con infraestructura novedosa, la cual lleva una propuesta innovadora y cuyo efecto resultante es sorprendente por su alto rendimiento, nunca descrito y demostrado.

15 Aunque la descripción anterior, contiene muchas especificaciones, esas especificaciones no se deben tomar como limitantes del alcance de la invención, sino sólo como ilustraciones de algunas de las modalidades actualmente preferidas de la invención.

El proceso industrial piloto desarrollado, presenta un cultivo continuo de 200 reactores, permitiendo la recolección diaria de 200 litros de cianobacterias productoras de ficotoxinas paralizantes (neosaxitoxina, saxitoxina o gonyaulatoxinas).

EJEMPLO 1: Preparación de medio de cultivo

20 Para la elaboración del medio de cultivo se preparan soluciones "stock" más concentradas de micronutrientes, sales minerales y vitaminas. Todas las soluciones se prepararon en agua destilada.

El Stock Vitamina (solución A) se prepara de acuerdo a las indicaciones en la siguiente tabla:

	Concentración (mg/ml)	Volumen (ml)	Concentración final (mg/ml)
Biotina	0,1	0,05	0,00005
Vitamina B12	0,1	0,05	0,00005
Tiamina HCl			0,1

25 Es decir, se tomó 1 mg de biotina y se disuelve en 10 ml de agua destilada. De igual manera, se disolvió 1 mg de vitamina B12 y se disolvió en 10 ml de agua destilada. De estas dos soluciones anteriores, se tomaron 0,05 ml de cada una y se mezclaron con 10 mg de tiamina HCl en un volumen final de 100ml completado con agua destilada.

El stock de micronutrientes (solución B) se preparó a partir de soluciones primarias de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1 g/l), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2,2 g/l), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 g/l), $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,6 g/l).

30 A 800 ml de una solución como la que se indica en la tabla de abajo se agregaron 10 ml de cada una de las soluciones primarias.

	Concentración (g/l)	Cantidad (g) en 800ml
Na_2EDTA	5,45	4,36
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,975	1,58

(continuación)

	Concentración (g/l)	Cantidad (g) en 800ml
NaHCO ₃	0,75	0,6
MnCl ₂ · H ₂ O	0,45	0,36

- 5 Finalmente, se completó el volumen a 1 litro con agua destilada, para obtener 1 litro de solución stock de micronutrientes (solución B).

Para la preparación de un stock concentrado del medio MLA x40 de 250 ml, a 130 ml de agua destilada se agregaron los volúmenes indicados para cada componente en la siguiente tabla:

Componente	Solución (g/l)	Volumen (ml)
MgSO ₄ 7H ₂ O	49,4	10
NaNO ₃	85	20
K ₂ HPO ₄	6,96	50
H ₃ BO ₃	2,47	10
H ₂ SeO ₄	1,29	10
Stock Vitamina (solución A)		10
Stock micronutrientes (solución B)		10

- 10 Finalmente, para preparar un litro de medio de cultivo MLA para ser esterilizado por filtración con membranas de 0,22 micrómetros, se mezclan los volúmenes indicados:

	(g/l)	Volumen (ml)
Agua Destilada		964
Stock MLA x40		25
NaHCO ₃	16,9	10
CaCl ₂ ·2H ₂ O	29,4	1

En caso de utilizar autoclave, a 121°C por 15 minutos, se usan las cantidades indicadas abajo, ajustando el pH a 7,5 a 8,0 con HCl u otro ácido apropiado.

ES 2 523 373 T3

	(g/l)	Volumen (ml)
Agua Destilada		973
Stock MLA x40		25
NaHCO ₃	16,9	1
CaCl ₂ .2H ₂ O	29,4	1

Las concentraciones de los componentes finales son las que se indican en la tabla a continuación:

Compuesto	Concentración en medio listo para usar (g/l)
MgSO ₄ 7H ₂ O	4,94E-02
NaNO ₃	1,70E-01
K ₂ HPO ₄	3,48E-02
H ₃ BO ₃	2,47E-03
H ₂ SeO ₄	1,29E-03
Biotina	5,00E-08
Vitamina B12	5,00E-08
Tiamina HCl	1,00E-04
CuSO ₄ 5H ₂ O	1,00E-05
ZnSO ₄ 7H ₂ O	2,20E-05
CoCl ₂ 6H ₂ O	1,00E-05
NaMoO ₄ 2H ₂ O	6,00E-06
Na ₂ EDTA	4,36E-03
FeCl ₃ 6H ₂ O	1,58E-03
NaHCO ₃	6,00E-04
MnCl ₂ H ₂ O	3,60E-04

- 5 Además de NaHCO₃ y CaCl₂.2H₂O cuya concentración depende de si el medio se esteriliza por filtración o autoclave.

Todas las soluciones se pueden guardar por no más de 1 mes refrigeradas.

Finalmente, para obtener el medio de cultivo de la presente invención, se agregó arginina, metionina y ácido alantoico hasta una concentración final de 2,8 mM de arginina, 1,7 mM de metionina y 1 mM de ácido alantoico.

Esta mezcla final es determinante para la obtención de estos resultados y estos componentes no son parte del MLA Medium (CSIRO Marine Research) anteriormente descrito.

5 EJEMPLO 2: Cultivo de *Aphanizomenon (Aph) gracile* (Lemm) Lemm

Se inoculó cada reactor de 3 litros de capacidad con el medio de cultivo descrito en el ejemplo 1, con 35 millones de filamentos, de *Aphanizomenon (Aph) gracile* (Lemm) Lemm. Los reactores se mantuvieron a temperatura controlada de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, con luz permanente proporcionada por tubos fluorescentes. Una vez que el cultivo alcanzó la fase exponencial, se colectó un tercio del volumen total del reactor (1 litro) y se reemplazó con 1 litro de medio fresco. El cultivo anterior presentó una velocidad de duplicación de 0,33 veces diarias.

Posteriormente, el medio de cultivo con las cianobacterias se centrifugó a 10.000g por 20 minutos.

Los rendimientos del presente invento siempre están expresados en función del número de filamentos obtenidos, debido que la presencia de filamentos (asociación de muchas células individuales), es indicador de la calidad del cultivo, y en permanente reproducción y desarrollo. Un cultivo rico en filamentos, corresponde a un cultivo "sano" y en desarrollo permanente. El pellet de células corresponde a pellet de filamentos, y a partir de ellos se comienza la purificación de ficotoxinas.

TABLA 1: Número de filamentos de *Aphanizomenon (Aph) gracile* (Lemm) por mililitro de cultivo en función del tiempo

Lote	Fecha	Pellet filam Ciano /ml	Volumen colectado (ml)
1	Día 1	590.000	1000
2	Día 2	598.000	1000
3	Día 3	630.000	1000
4	Día 4	596.000	1000
5	Día 5	626.000	1000
6	Día 6	788.000	1000
7	Día 7	534.000	1000
8	Día 8	756.000	1000
9	Día 9	754.000	1000
10	Día 10	614.000	1000
11	Día 11	622.000	1000
12	Día 12	608.000	1000
13	Día 13	770.800	1000

El pellet celular de cada lote, corresponde al volumen de un litro de cultivo recolectado de cada reactor cada día. Esto también se puede realizar cada dos días, lográndose mayor número de filamentos. Bajo estas condiciones de producción máxima es preferible nunca cosechar por periodos de más de 4 días, por deterioro del cultivo y disminución de producción de ficotoxina.

EJEMPLO 3: Comparación de cultivo con medio MLA simple (no modificado) y medio MLA modificado de la presente invención.

La figura 1, muestra la diferencia entre un cultivo de *Aphanizomenon gracile* en el medio MLA simple (no modificado) y un cultivo de *Aphanizomenon gracile* con el medio de cultivo de la presente invención, MLA modificado. Es fácil apreciar que el medio modificado de la presente invención, con una concentración final de 2,8 mM de arginina, 1,7 mM de metionina y 1 mM de ácido alantoico, es sorprendentemente superior al cultivo usando el medio MLA simple (no modificado).

La tabla 2 a continuación, muestra la concentración en el sobrenadante de las distintas ficotoxinas y el rendimiento por filamento de cianobacteria de las mismas. También indica la concentración de filamentos por ml. de medio de cultivo, de acuerdo al método de la presente invención.

TABLA 2: Producción de neosaxitoxina y saxitoxina en función del número de filamentos y pellet peso húmedo de *Aphanizomenon gracile* en medio MLA modificado (con arginina, metionina y ácido alantoico).

Concentración en sobrenadante				Concentración ficotoxina por filamento		Ciano fil/ml*
neoSTX mM	STX mM	neoSTX ug /ml	STX ug /ml	neoSTX pg/fil.	STX pg/fil	
8,98	3,5	2,83	1,05	2,42	0,9	1.170.000,00
13,66	4,91	4,3	1,47	3,44	1,18	1.250.000,00
3,42	1,03	1,08	0,31	1,71	0,49	630.000,00
17,82	4,78	5,61	1,43	9,42	2,41	596.000,00
17,81	4,02	5,61	1,21	13,17	2,83	426.000,00
7,66	1,47	2,41	0,44	4,94	0,91	488.000,00
10,87	2,19	3,42	0,66	10,25	1,97	334.000,00
10,52	2,07	3,31	0,62	4,38	0,82	756.000,00
10,77	1,96	3,39	0,59	7,47	1,3	454.000,00
17,24	2,99	5,43	0,9	13,12	2,16	414.000,00
5,31	0,41	1,67	0,12	5,19	0,38	322.000,00
12,26	2,17	3,86	0,65	9,47	1,59	408.000,00
9,84	1,94	3,1	0,58	17,42	3,27	178.000,00

STX: saxitoxina

neoSTX: neosaxitoxina

Ciano fil: filamentos de cianobacteria

* Los filamentos de cianobacterias corresponden a asociaciones de 20 a 100 células de cianobacterias. Estas cianobacterias forman filamentos en solución y estos son los que se cuentan usando microscopio de fase invertida.

La tabla 3, muestra distintos lotes de producción de ficotoxinas. Se observa claramente en el promedio que el rendimiento de ficotoxina por filamento es mucho mayor cuando se usa el medio de cultivo MLA modificado junto a

las condiciones de crecimiento de la presente invención, comparado con el medio de cultivo MLA simple (no modificado), que representa el estado de la técnica anterior.

TABLA 3: Producción de neosaxitoxina y saxitoxina en función del número de filamentos en medio MLA modificado (invención) y medio MLA simple.

5

	Producción de ficotoxinas en Medio MLA modificado y luz permanente		Producción de ficotoxinas en Medio MLA simple, ciclo luz:oscuridad	
	neoSTX	STX	neoSTX	STX
	pg/fil.	pg/fil	pg/fil.	pg/fil
	2,42	0,9	0,09	0,03
	3,44	1,18	0,13	0,04
	1,71	0,49	0,06	0,02
	9,42	2,41	0,35	0,09
	13,17	2,83	0,49	0,1
	4,94	0,91	0,18	0,03
	10,25	1,97	0,38	0,07
	4,38	0,82	0,16	0,03
	7,47	1,3	0,28	0,05
	13,12	2,16	0,48	0,08
	5,19	0,38	0,19	0,01
	9,47	1,59	0,35	0,06
	17,42	3,27	0,65	0,12
Promedio	7,88	1,55	0,29	0,06

10

Los rendimientos obtenidos corresponden a una producción sorprendente, no esperada de ficotoxinas puras (neosaxitoxina y saxitoxina), por filamento de cianobacteria cultivada en medio MLA modificado (Tabla 2), cuando se compara a la producción de filamentos de cianobacterias puestas en cultivo en condiciones habituales (Medio MLA simple) y descritas hasta ahora en frascos pequeños de cultivo, sin micro-aeración continua y con ciclos de luz: día y sin luz : noche (Tabla 3).

15

En el ejemplo descrito aquí, las cianobacterias están siempre en crecimiento logarítmico, con luz permanente las 24 horas y cosechando permanentemente las cianobacterias, induciendo un permanente crecimiento, mediante el aporte de nutrientes nuevos en volúmenes equivalentes al volumen cosechado en cada recambio.

Como se demuestra en la tabla 3, el método de la invención logra un rendimiento cerca de 25 veces mayor que los métodos conocidos.

REIVINDICACIONES

1. Método de obtención y producción masiva de una especie de cianobacteria aislada productora de ficotoxinas paralizantes seleccionadas del grupo que consiste en *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Aphanizomenon(Aph) issatschenkoii* (Usacev) Proskina-Lavrenko, *Anabaena circinalis*, *Lyngbya wollei* y *Aphanizomenon gracile* (Lemm) Lemm., CARACTERIZADO porque dicho método comprende los pasos de:
 - 5 a. inocular entre 20 y 40 millones de filamentos de cianobacteria por cada 3 litros de medio de cultivo MLA que comprende $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $NaNO_3$, K_2HPO_4 , H_3BO_3 , H_2SeO_4 , biotina, vitamina B12, tiamina HCl, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, Na_2EDTA , $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, $NaHCO_3$, $MnCl_2 \cdot H_2O$ complementado con entre 2 y 3,5 mM de arginina, entre 1 y 2,2 mM de metionina y entre 0,7 y 1,3 mM de ácido alantoico;
 - 10 b. cultivar la cianobacteria en el medio de cultivo a una temperatura de entre 15 y 35°C, con luz permanente natural o artificial;
 - c. recolectar un volumen de medio de cultivo de entre un 20 a un 40% del volumen total cada 1 a 3 días y reponer el volumen retirado con medio de cultivo fresco;
 - d. mantener el cultivo en modo continuo;
 - 15 e. centrifugar el medio con las cianobacterias recolectado en c) entre un rango de 5.000 a 15.000 x g por un período de tiempo de entre 5 y 30 minutos y obtener dicha cianobacteria del pellet resultante de la centrifugación.
2. Método de acuerdo a la reivindicación 1, en el que la temperatura de cultivo se encuentra en un rango de 15 y 25°C.
3. Método de acuerdo a la reivindicación 2, en el que dicha temperatura es 22±2°C.
- 20 4. Método de acuerdo a la reivindicación 1, en el que el medio de cultivo tiene una concentración de arginina final de 2,8 mM.
5. Método de acuerdo a la reivindicación 1, en el que el medio de cultivo tiene una concentración de metionina final de 1,7 mM.
- 25 6. Método de acuerdo a la reivindicación 1, en el que el medio de cultivo tiene una concentración de ácido alantoico final de 1,0 mM.

FIGURA 1

