

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 560 329**

51 Int. Cl.:

**C12P 19/04** (2006.01)

**C12N 9/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2011** **E 11787710 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2015** **EP 2627778**

54 Título: **Procedimiento de transformación de iota-carragenano en alfa-carragenano por medio de una clase novedosa de 4S-iota-carragenano sulfatasa**

30 Prioridad:

**15.10.2010 FR 1058420**

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

**18.02.2016**

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (CNRS) (100.0%)  
3, rue Michel Ange  
75016 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**HELBERT, WILLIAM;  
PRECHOUX, AURÉLIE y  
GENICOT-JONCOUR, SABINE**

74 Agente/Representante:

**POINDRON, Cyrille**

**ES 2 560 329 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

Procedimiento de transformación de iota-carragenano en alfa-carragenano por medio de una clase novedosa de 4S-iota-carragenano sulfatasa.

5

**Campo técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento de transformación de iota-carragenano en alfa-carragenano por medio de una clase novedosa de 4S-iota-carragenano sulfatasa.

10

La presente invención encuentra aplicación especialmente en la industria agro-alimentaria, farmacéutica y cosmética.

En la descripción a continuación, las referencias entre corchetes ([ ]) se refieren a la lista de referencias que se presenta al final del texto.

15

**Estado de la técnica**

Los carragenanos son galactanos sulfatados extraídos de la pared de algas rojas marinas. Los carragenanos están compuesto por una sucesión de D-galactosidas únicas alternativamente por enlaces alfa(1-3) y beta(1-4). Estos polisacáridos aniónicos se distinguen básicamente por la presencia o no de un puente 3,6 anhidro en el residuo galactosa unido en alfa(1-3), y por su tasa de sulfatación. Por ejemplo, las tres unidades de repetición disacáridas - denominadas motivo carrabiosa - que se encuentran en la mayor parte de los carragenanos explotados industrialmente se caracterizan por la presencia de un (kappa-carrabiosa), dos (iota-carrabiosa) o tres sulfatos (lambda-carrabiosa) (figura 1). Los carragenanos pueden estar compuestos por un motivo carrabiosa, por ejemplo, el kappa-carragenano del alga *Kappaphycus alvarezzi* está compuesto de aproximadamente el 90 % del motivo kappa-carrabiosa y el 10 % de iota-carrabiosa. El iota-carragenano extraído de *Eucheuma denticulatum* está compuesto por el 85 % de unidades iota-carrabiosa y el 15 % de unidades kappa-carrabiosa.

20

25

Las composiciones con respecto a una unidad carrabiosa pueden ser muy variables y dependen básicamente del origen botánico del alga. Se habla de kappa-carragenano cuando el polisacárido es rico en el motivo kappa-carrabiosa y cuando estas propiedades fisicoquímicas son similares a las de kappa-carragenano de *K. alvarezzi* que se usa a menudo como referencia. (Bixler y col., Food Hydrocolloids, 15: 619-630, 2001) [1].

30

Se ha descrito toda una gama de estructuras intermedias de kappa/iota-carragenanos híbridos en función del origen botánico de los polisacáridos (figura 2; Bixler y col., 2001, citado anteriormente) [1]. El tipo de carragenano presente en la pared de las algas puede también correlacionarse con la fase de vida de las algas. De hecho, en el caso de *Chondrus crispus*, los gametotipos son ricos en kappa/iota-carragenanos, mientras que los esporófitos contienen principalmente lambda-carragenano. Las estaciones y todos los factores ambientales que pueden afectar al crecimiento de las algas (iluminación, temperatura, sales, etc.) también tendrán un efecto sobre la estructura y la composición del carragenano. Por consiguiente, en función del origen y/o los procedimientos de extracción, puede observarse y amplio espectro de estructuras de tipo kappa-, iota- y lambda-carragenanos.

35

40

Estos polisacáridos tienen propiedades reológicas únicas y se usan como agentes de textura en la industria agro-alimentaria, farmacéutica y cosmética. Estos polisacáridos tienen un amplio espectro de propiedades funcionales que se explican por su gran diversidad estructural. Los kappa- e iota-carragenanos tienen la propiedad de formar genes ión- y termo-dependientes. El kappa-carragenano formará geles rígidos en presencia de potasio, mientras que el iota-carragenano forma geles flexibles y elásticos en presencia de calcio. La gran diversidad de estructura química de los carragenanos y su hibridez natural confieren a cada extracto de alga propiedades funcionales características.

45

50

Al año se venden aproximadamente 50.000 toneladas de carragenanos (Bixler y Porse, J. Appl. Phycol., 2010, en línea) [2]. Sin embargo, el tonelaje de los carragenanos explotados se limita por la cantidad de alga roja disponible. Actualmente, se cultivan ampliamente dos especies de alga roja: *Kappaphycus alvarezzi* y *Eucheuma denticulatum*, de las cuales se extraen kappa- e iota-carragenano, respectivamente. También se recogen numerosas algas salvajes (no cultivadas) en gran cantidad porque sus carragenanos, de naturaleza kappa/iota-híbrida, muestran propiedades funcionales muy interesantes. Sin embargo, una tonelada de estas algas es dos, e incluso diez veces más costosa que la de las algas cultivadas.

55

Además, cada aplicación industrial corresponde a extractos de carragenanos que proceden de una especie o de

varias especies de algas rojas. Las soluciones para satisfacer las necesidades industriales en cualquier campo residen principalmente en la formulación (la mezcla) de los carragenanos (Bixler y Porse, 2010, citado anteriormente) [2].

5 Por consiguiente, un procedimiento biotecnológico que permitirá obtener carragenanos híbridos a partir de algas cultivadas será económicamente muy rentable. Tendrá la ventaja de ser menos dependiente de la fuente de las algas, y abrirá novedosas perspectivas en cuanto a la explotación y la valoración de la biomasa de las algas rojas.

A fin de controlar la estructura química y, por extensión, las propiedades fisicoquímicas de los carragenanos, los  
 10 Inventores, por lo tanto, emprendieron la purificación y la producción de enzimas capaces de modificar y corregir las estructuras de los carragenanos. Las modificaciones deseadas consisten en la desulfatación de los carragenanos por unas enzimas denominadas sulfatasas que conducen a la conversión de iota- en kappa- o alfa-carragenano, o a estructuras híbridas del tipo kappa/iota- o iota/alfa-carragenano (figura 3). Por lo tanto, demostraron la existencia de carragenano-sulfatasas que pueden actuar directamente sobre el polímero sin una acción preliminar de las  
 15 carragenasas. Consiguieron purificar, a partir de una población bacteriana *Pseudoalteromonas carrageenovora*, una primera 4S-iota-carragenano sulfatasa perteneciente a la familia de las amidohidrolasas, y que convierte iota- en alfa-carragenano por desulfatación específica (eliminación de un grupo SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) en la posición 4 del iota-carragenano (Solicitud de Patente Francesa FR 09/52642 publicada con el número FR 2944804) [3]. Usando la misma estrategia que para la primera 4S-iota-carragenano sulfatasa, los Inventores consiguieron purificar, a partir de  
 20 *Pseudoalteromonas atlantica*, una segunda 4S-iota-carragenano sulfatasa perteneciente a la familia de las sulfatasas formilglina-dependientes. En primer lugar, consiguieron determinar tres péptidos de dicha proteína: NGQFDNTVIVFTSDNGGK (SEQ ID NO 1), FDQTFQVDNTR (SEQ ID NO 2), y ETEYITDGLSR (SEQ ID NO 3), que una vez comparados con la biblioteca TrEMBL, demostraron una correspondencia con la proteína Q15XH3 de *P. atlantica* T6c, cuyo gen (Patl\_0889) se marcó como una sulfatasa (Protein\_ID ABG39415.1; Copeland y col.,  
 25 2006) [4].

Por lo tanto, las 4S-iota-carragenano sulfatasas pueden permitir calibrar la "hibridez" de los carragenanos. Así, cualquier sulfatasa que actúe sobre el iota-carragenano puede representar una mayor innovación puesto que  
 30 permitirá fabricar alfa- e iota/alfa-carragenanos que son muy escasos en la naturaleza, y que son diferentes en cuanto a secuencia peptídica pero también en cuanto a propiedades bioquímicas. Sin embargo, se desprende que las sulfatasas que actúan sobre los carragenanos pueden no presentar homología con las demás sulfatasas conocidas - siendo las sulfatasas más estudiadas las enzimas que actúan sobre la heparina, un polisacárido de origen animal.

35 Por lo tanto, existe la necesidad real de purificar enzimas para la modificación de los motivos de sulfatación de los carragenanos con el fin de superar las deficiencias, inconvenientes y obstáculos de la técnica anterior, en particular para un procedimiento que permite controlar la "hibridez" de los carragenanos usando dichas enzimas, reducir los costes y controlar el suministro y las propiedades funcionales de los carragenanos obtenidos de este modo.

#### 40 Descripción de la invención

Los Inventores han demostrado, de manera bastante inesperada, que la segunda 4S-iota-carragenano sulfatasa identificada (Q15XH3) es capaz de convertir el motivo iota-carrabiosa en el motivo alfa-carrabiosa. El motivo iota-carrabiosa puede estar presente en un oligosacárido o un polisacárido que puede estar compuesto también por otros  
 45 motivos carrabiosa.

Por lo tanto, la presente invención tiene por objeto un procedimiento de transformación de iota-carragenano en alfa-carragenano que comprende la catálisis enzimática de la conversión del motivo iota-carrabiosa en el motivo alfa-carrabiosa por una enzima que tiene una actividad sulfatasa y cuya secuencia peptídica comprende los péptidos de  
 50 las siguientes secuencias:

NGQFDNTVIVFTSDNGGK (SEQ ID NO 1),  
 FDQTFQVDNTR (SEQ ID NO 2), y  
 ETEYITDGLSR (SEQ ID NO 3).

55 Se entiende por "iota- y alfa-carragenano", para los fines de la presente invención, iota- y alfa-carragenanos y/o iota- y alfa-carragenanos híbridos, por ejemplo, contenidos en una solución, una solución parcialmente gelificada o un gel. Por lo tanto, el iota-carragenano puro gelifica en sus propias cargas, mientras que los carragenanos híbridos, tales como iota-nu-carragenano y los oligo-iota-carragenanos son poco gelificantes.

De acuerdo con una realización particular del procedimiento de la invención, dicha enzima tiene la siguiente secuencia peptídica:

MTFNKKVSTLLWGTLIAISVGNASAADAGQSKADESNEKPNILFVLADDL  
 GYNDVGFNGSTDIKTPNLDGLAKNGMTFDAAYVAHPFCGPSRAAIMTGR  
 YPHKIGAQFNLPEDNSNVGVSADLFIAQTMKSAGYFTGAMGKWHLGEA  
 5 SEYHPNKHGFDEFYGFLLGGGHNYFPEQFEAAYNKRVAQGMTNINMYLT  
 PLEHNGKEVRETEYITDGLSREAVNFVDKAAAKKKPFFLYLAYNAPHVPL  
 QAKEEDMAMFSQIKDKKRRTYAGMVYAVDRGVGRIVEQLKKNQFDNT  
 VIVFTSDNGGKLGQGANNYPLKEGKGSVQEGGFRTPLVHWPKHKMAG  
 SRFSHPLALDLYPTFAGLGGAVLPEDKKLDGKDIWADIQANTAPHKDEFI  
 YVLRHRNGYSDAARRNQFKAVKNHNDWKLNYIAQDISDNDISAQHP  
 DILRDMVSSMESWSWNNQQPKWFHQSAEGAQWRLKAMPRFDQTFQV  
 GDNTRSNSKKGH (SEQ ID NO 4)

De acuerdo con una realización particular del procedimiento de la invención, dicha enzima es una 4S-iota-carragenano sulfatasa. Por ejemplo, puede tratarse de una 4S-iota-carragenano sulfatasa que tiene una secuencia  
 10 que presenta al menos el 30 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4, preferiblemente al menos el 50 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4, mucho más preferiblemente al menos el 80 % con la SEQ ID NO: 4.

De acuerdo con una realización particular del procedimiento de la invención, la enzima se produce por una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica dicha enzima y/o un vector que comprende una secuencia  
 15 de ácido nucleico que codifica dicha enzima.

Se entiende por "célula huésped", para los fines de la presente invención, una célula procariota o eucariota. Las células huésped usadas comúnmente para la expresión de células recombinantes incluyen en particular células de bacterias, tales como *Escherichia coli* o *Bacillus*, células de levaduras, tal como *Saccharomyces cerevisiae*, células  
 20 de hongos, tal como *Aspergillus niger*, células de insectos, y células de mamíferos (en particular seres humanos) tales como las líneas celulares CHO, HEK 293, PER-C6, etc. La transformación de las células procariotas y eucariotas es una técnica bien conocida por el experto en la técnica, por ejemplo, lipofección, electroporación, choque térmico o métodos químicos. En función de la célula que se va a transformar, el experto en la técnica puede determinar fácilmente los medios necesarios para la introducción y la expresión del ácido nucleico en la célula  
 25 huésped seleccionada. Por lo tanto, el vector de expresión y el método de introducción del vector de expresión en la célula huésped se seleccionarán en función de la célula huésped escogida. La célula huésped transformada con un vector de expresión o un ácido nucleico expresará el polipéptido correspondiente de manera estable. El experto en la técnica puede verificar fácilmente que la célula huésped expresa el polipéptido de manera estable, por ejemplo, usando la técnica de transferencia de Western.

30 Se entiende por "vector", para los fines de la presente invención, vectores para la expresión y/o secreción de secuencias de ácido nucleico en una célula huésped determinada. Pueden ser, por ejemplo, vectores de origen plasmídico o vírico que contienen, además de la secuencia de ácido nucleico, los medios necesarios para su expresión. Estos medios pueden incluir, por ejemplo, un promotor, señales de inicio y terminación de la traducción,  
 35 así como regiones apropiadas para la regulación de la transcripción. El vector de expresión también puede comprender otros elementos, tales como un origen de replicación, un sitio de clonación múltiple, un potenciador, un péptido señal que puede fusionarse en fase con el polipéptido producido durante la clonación, y uno o más marcadores de selección.

40 Se entiende por "ácido nucleico", para los fines de la presente invención, tanto moléculas de ADN como moléculas de ARN, que incluye en particular moléculas de ADNc y moléculas de ARNm. El ácido nucleico puede estar en forma bicatenaria (por ejemplo, en el caso de un ácido nucleico contenido en un vector de expresión) o en forma monocatenaria (por ejemplo, en el caso de sondas o cebadores).

De acuerdo con una realización particular del procedimiento de la invención, los carragenanos obtenidos tienen motivos alfa-carrabiosas siempre que el carragenano de partida tenga en su estructura motivos iota-carrabiosas. Por ejemplo, los motivos iota-carrabiosas del carragenano extraído de *E. denticulatum* (85 % de iota-carrabiosa y 15 % de kappa-carrabiosa) pueden convertirse en un carragenano que tiene un 85 % de alfa-carrabiosa y un 15 % de kappa-carrabiosa. La reacción enzimática puede controlarse, y la tasa de conversión de iota-carrabiosa en alfa-carrabiosa puede variar del 0 al 100 %. Las propiedades reológicas de los carragenanos obtenidos variarán en función de la tasa de conversión.

10 Otras ventajas también pueden ser evidentes para un experto en la técnica en la lectura de los ejemplos a continuación, ilustrados por las figuras adjuntas, dadas a título ilustrativo.

#### Breve descripción de las figuras

- 15 - La figura 1 representa la estructura química de los motivos de repetición de los tres carragenanos principales (kappa  $\kappa$ , iota  $\iota$  y lambda  $\lambda$ ) explotados industrialmente.  
 - La figura 2 representa las composiciones híbridas de kappa/iota-carragenanos en función de la fuente de algas rojas (Bixler y col., 2001, citado anteriormente) [1].  
 - La figura 3 representa el esquema de las reacciones enzimáticas catalizadas por 4S- y 2S-iota-carragenano sulfatasas.  
 20 - La figura 4 representa el gel de electroforesis teñido de azul de Coomassie coloidal (SDS-PAGE) de varias fracciones recogidas después de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico (Q Sepharose Fast Flow). La proteína de 55 kDa se indica por medio de una flecha.  
 - La figura 5 representa la secuencia aminoacídica de la proteína de *Pseudoalteromonas atlantica* T6c (Q15XH3). En negrita, las tres secuencias peptídicas determinadas por espectrometría de masa. En cursiva y subrayada, la identificación de la modificación post-traducciona de la cisteína. En un cuadro, los aminoácidos del sitio catalítico, cuya lisina (K) e histidina (H) son los aminoácidos catalíticos.  
 25 - La figura 6 representa el entorno genómico del gen de la 4S-iota-carragenano sulfatasa novedosa (Q15XH3) en *P. atlantica*.  
 - La figura 7 representa el espectro  $^1\text{H}$  RMN de iota-carragenano (B) incubado con la proteína purificada de *Pseudoalteromonas atlantica* (Q15XH3) (A)  
 30

#### Ejemplos

35 **Ejemplo 1: Identificación de una 4S-iota-carragenano sulfatasa novedosa obtenida de *Pseudoalteromonas atlantica***

##### Cribado de las actividades carragenano-sulfatasas de *Pseudoalteromonas atlantica*

40 El cribado se realizó usando la bacteria marina *Pseudoalteromonas atlantica* T6c (cepa ATCC T6c/BAA-1087) cuyo genoma se ha secuenciado completamente (<http://genome.igi-psf.org/finished/microbes/pseat/pseat.home.html>).

##### *Cultivos bacterianos*

45 La producción de extractos bacterianos se realizó a partir de la bacteria marina *Pseudoalteromonas atlantica* cultivada en medio Zobell [Bacto peptone (*Amresco*) 5 g/l, extractos de levadura (BD, extracto de células de levadura autolisadas (*Extract of Autolysed Yeast cells*)) 1 g/l, agua de mar filtrada 800 ml ajustada a 1 l con agua desmineralizada] en presencia de kappa- (*Kappaphycus alvarezii*, CP Kelco X6913, a 1 g/l), de iota- (*Eucheuma denticulatum*, H030058-534, a 1 g/l) o de lambda-carragenano (esporofito de *Gigartina skottsbergii*, CP Kelco, 50 X7055).

El primer precultivo consistió en sembrar 10 ml de medio Zobell a partir de un glicerol de *P. atlantica* almacenado a -80 °C. La incubación se realizó en un agitador de tipo New Brunswick durante 36 h, a 18 °C y 180 rpm. Para el segundo precultivo, se sembraron 50 ml de medio Zobell que contenía 50 mg de uno de los carragenanos (kappa-, 55 iota- o lambda-) con aproximadamente 1 ml del primer precultivo, para tener una absorbancia de 0,1, a 660 nm. Este segundo precultivo se incubó a 18 °C hasta que la densidad óptica alcanzó un valor de 1 a 1,2, a 660 nm, que es aproximadamente 8 h. Para el cultivo final, se sembraron 950 ml de medio Zobell que contenía el mismo carragenano que anteriormente, con los 50 ml del segundo precultivo, y se incubó a 18 °C durante 36 h.

A fin de separar el gránulo bacteriano del sobrenadante de cultivo, los cultivos bacterianos se centrifugaron a 6200 g durante 20 minutos, a 4 °C.

#### Preparación de extractos bacterianos

5

El sobrenadante de cultivo se concentra por precipitación al 90 % de saturación en sulfato de amonio (61,5 g de sulfato de amonio para 100 ml de muestra). El gránulo obtenido después de la centrifugación (25 min, 10000 rpm) se pone de nuevo en solución en tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,3. Después, se dializa en membranas (Spectra/por, MWCO 3500 Da) frente a tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,3.

10

El gránulo bacteriano se suspendió de nuevo en tampón Tris-HCl (Sigma) 50 mM a pH 8,3. Después, las células se lisaron en una prensa francesa, y el lisado obtenido se sometió a ultracentrifugación a 27000 g, durante 2 h 45 minutos. Al sobrenadante obtenido se le añadió la mitad de un comprimido de anti-proteasa (Complete, sin EDTA, Roche).

15

Después, el extracto se dializó (Spectra/Por, MWCO 3500 Da) contra un tampón Tris-HCl 50 mM a pH 8,5, durante una noche, con agitación a 4 °C.

#### Dosificación del sulfato liberado

20

La producción de las actividades sulfatasas se evaluó por medio de la cantidad de sulfato liberado después de la incubación de diversos carragenanos en presencia de extractos bacterianos. Los ensayos se realizaron con los sobrenadantes de cultivo concentrados y los gránulos bacterianos. Para cada muestra analizada, se prepara un blanco de manera similar después de haber inactivado previamente el extracto enzimático durante quince minutos a 25 100 °C.

Los medios de reacción se diluyeron 2 veces con agua milliQ (Millipore) y después se centrifugaron en microcons (Amicon) con un umbral de corte de 10 kDa. Esta centrifugación se realizó a 3300 g durante 90 min a temperatura ambiente. Después, el filtrado obtenido se dosificó por cromatografía de intercambio aniónico (HPAEC: cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento (*High Performance Anion Exchange Chromatography*)) en un sistema Dionex. Se inyectaron 20 µl de muestra mediante un inyector automático (AS3000, Thermo). La separación de aniones presentes en las muestras se realizó mediante una columna Ion-Pac AS11 (4 x 200 mm, Dionex) dotada de una pre-columna AG-11 (4 x 50 mm, Dionex). El sistema se equilibró en NaOH 12 mM. La elución se realizó usando un gradiente isocrático en NaOH a un caudal de 1 ml/min (bomba GP40, Dionex). La detección de los aniones se realizó por conductimetría con un detector ED40 (Dionex) dotado de un supresor ASRS ultra-II-4 mm (Dionex) que funcionaba a una corriente de 198 mA. El software usado para la adquisición y el tratamiento de los datos fue el software Chroméléon 6.8. Usando una curva de calibración, el área de los picos de sulfato se convirtió en partes por millón (ppm). La diferencia entre el valor de la muestra y el del blanco dio la cantidad de sulfato liberado en ppm durante la reacción enzimática de desulfatación. Los resultados se muestran en la tabla 1 a 40 continuación.

Tabla 1

Extracto bacteriano	Inducción	Sustrato				
		kappa	iota	lambda	kappa/mu	iota/nu
Sobrenadante	kappa	0,22	0	0,04	0,08	0,28
	iota	1,36	<b>39,36</b>	1,26	<b>21,96</b>	<b>18,96</b>
	lambda	0,26	3,24	0,74	0,1	5,76
Gránulo	kappa	0,04	3,4	0,08	0,4	4,28
	iota	4,5	<b>80,82</b>	3,64	8,94	<b>63,58</b>
	lambda	0,36	12,9	0,04	1,08	17,3

Los resultados en negrita corresponden a las condiciones para las que se observaron las actividades sulfatasas más 45 fuertes.

#### Purificación y secuencia proteica de una 4S-iota-carragenano sulfatasa novedosa

##### Preparación del extracto bacteriano

50

El gránulo bacteriano obtenido del cultivo inducido con iota-carragenano y obtenido como se ha descrito

previamente, que contenía la actividad sulfatasa, se suspendió de nuevo en tampón Tris-HCl (Sigma) 50 mM a pH 7,5. Después, las células se lisaron usando una prensa francesa, y el lisado obtenido se sometió a ultracentrifugación a 27200 g durante 2 h 45 minutos. Al sobrenadante obtenido se le añadió la mitad de un comprimido de anti-proteasa (Complete, sin EDTA, Roche) con el fin de limitar la degradación de las proteínas.

5

Para eliminar las moléculas de pequeño tamaño (y particularmente el sulfato libre) del extracto, el último se dializó (Spectra/Por, MWCO 3500 Da) contra un tampón Tris-HCl 50 mM a pH 7,5 durante una noche, con agitación a 4 °C.

#### Purificación

10

Los experimentos de purificación se realizaron sobre las sulfatasas que actúan sobre iota-carragenano. Las etapas de purificación se realizaron por medio de un sistema Akta Purifier.

El lisado se depositó en una columna de cromatografía de intercambio aniónico débil DEAE Sepharose Fast Flow (GE Healthcare - 45 x 1 cm) equilibrada previamente en tampón tris-HCl 50 mM a pH 7,5. La muestra (aproximadamente 35 ml) se cargó por medio de un superloop (o bucle de inyección) a un caudal de 2 ml/min. Después, la resina se lavó con este mismo tampón hasta que se obtuvo una absorbancia insignificante a 280 nm. La elución de las proteínas se realizó a un caudal de 2 ml/min con un gradiente segmentado creciente en NaCl de 0 a 1 M: 10 volúmenes de columna de 0 a 500 mM de NaCl y 2 volúmenes de columna de 500 mM en NaCl 1 M. Las fracciones recogidas con un volumen de 5,5 ml se ensayaron para comprobar su capacidad de desulfatación del iota-carragenano.

Después, una fracción que contenía una actividad sulfatasa máxima se dializó (membrana Spectra/Por, MWCO 3500 Da) durante 48 h contra tampón Tris-HCl 50 mM a pH 7,5, con agitación a 4 °C. Se depositó 1 ml de esta fracción en una resina de intercambio aniónico fuerte Q Fast Flow (GE Healthcare - Hitrap 1 ml) equilibrada previamente en tampón Tris-HCl 50 mM a pH 7,5. La resina se lavó con este mismo tampón y las proteínas se eluyeron con un gradiente creciente de NaCl de 0 a 1 M realizado de la siguiente manera: 15 volúmenes de columna de NaCl de 0 a 500 mM y 5 volúmenes de columna de NaCl de 500 mM a 1 M, a un caudal de 1 ml/min. Las fracciones recogidas, de 1 ml, se incubaron en presencia de iota-carragenano para medir la actividad sulfatasa. El grado de pureza de las fracciones se visualizó por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

La pureza de las fracciones activas se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Biorad, Criterion XT 12% Bis-Tris). A 15 µl de muestra se le añadieron 5 µl de tampón de carga que contenía SDS al 2 % (Amresco), β-mercaptoetanol al 5 % (98 % Sigma), glicerol al 20 % (CarloErba), Tris-HCl 62,5 mM a pH 6,8 y el 0,5 % de azul de Bromofenol (Sigma). Después, las muestras se calentaron a temperatura de ebullición durante 3 min para desnaturalizar las proteínas. Después, los 20 µl de mezcla se depositaron sobre el gel. Los depósitos de 5 µl de marcadores de tamaño (Biorad, *Precision Plus Protein*) permitieron evaluar el peso molecular de las proteínas entre 10 y 250 kDa. La migración se realizó a temperatura ambiente, a 110 voltios (para 1 gel) durante 2 h, en un tampón de migración compuesto por MOPS (Sigma) 200 mM, Tris 250 mM pH 8,1 y SDS 5 g/l. La revelación del gel se realizó por medio de una tinción en azul de Coomassie coloidal (Candiano y col., *Electrophoresis*, 25(9): 1327-1333, 2004) [5]. El peso molecular de la proteína purificada se calculó a aproximadamente 55 kDa (figura 4).

#### Secuencia proteica y nucleica

La banda de la proteína se cortó del gel, se digirió con tripsina y los péptidos obtenidos se secuenciaron por espectrometría de masa sobre la plataforma RIO "Biopolímeros" situada en INRA, Nantes. Las tres secuencias determinadas [NGQFDNTVIVFTSDNGGK (SEQ ID NO: 1), FDQTFQVGDNTR (SEQ ID NO: 2), y ETEYITDGLSR (SEQ ID NO: 3)] se compararon con la biblioteca TrEMBL. Los tres péptidos corresponden al 100 % a la proteína Q15XH3 (figura 5, SEQ ID NO: 4) de *Pseudoalteromonas atlantica* T6c cuyo gen (Patl\_0889) se marcó como una sulfatasa (Copeland y col., 2006, citado anteriormente) [4]. La proteína tiene la secuencia consenso de 12 aminoácidos (C/S-X-P-S/X-R-XXX-L/X-G/X-R/X, SEQ ID NO: 5) requerida para la conversión de la cisteína en formilglicina (FGly) y los aminoácidos presentes en la secuencia conservada (G-Y/V-X-S/T-XXX-G-K-X-X-H, SEQ ID NO: 6). El entorno genómico del gen de la sulfatasa novedosa converge hacia una implicación de esta proteína en la degradación de iota-carragenano (figura 6). De hecho, el gen de Q15XH3 se localiza en un clúster de genes que contiene otras sulfatasas (incluyendo Q15XG7 que tiene un 41 % de identidad con Q15XH3), dos proteínas desconocidas, pero especialmente, se identifican claramente varios genes del ciclo cítrico (oxidación de azúcares) y del metabolismo de D-galactosa. Las funciones de las sulfatasas presentes en este clúster están vinculadas probablemente a la desulfatación de iota- y/o alfa-carragenano.

*Actividad sulfatasa*

Con el fin medir la actividad sulfatasa, 100 µl de muestra a dosificar se pusieron en contacto con 100 µl de una solución de iota-carragenano (CP-Kelco N° 1256) al 1 % en tampón Tris-HCl 50 mM a pH 7,5. Las reacciones 5 enzimáticas se realizaron a 34 °C al baño maría durante 48 h. Para cada muestra, se preparó un blanco en condiciones similares habiendo inactivado previamente el extracto enzimático durante 15 min, a 100 °C.

La posición del grupo sulfatado escindió y, por lo tanto, la identificación del producto formado durante la hidrólisis 10 enzimática se realizó por RMN. Para este análisis, las reacciones de desulfatación se realizaron incubando 700 µl de iota-carragenano al 1 % (CP-Kelco N° 1256) en presencia de 300 µl de extracto bacteriano. Las mezclas de reacción se incubaron a 34 °C al baño maría durante 72 h y después se liofilizaron. Después, las muestras se intercambiaron dos veces en D<sub>2</sub>O y después se disolvieron de nuevo en 700 µl de D<sub>2</sub>O al 99,97 % para conseguir una concentración aproximada de 10 mg/ml. Los espectros <sup>1</sup>H-RMN se registraron a 70 °C en un espectrofotómetro BRUKER Avance 15 DRX 500 por el departamento de RMN (Université de Bretagne Occidentale, Brest). Los protones anoméricos de los carragenanos muestran desplazamientos químicos característicos (δ) entre aproximadamente 5 y 5,6 ppm. Los resultados muestran que la desulfatación de iota-carragenano por la proteína pura condujo a la producción de alfa-carragenano (figura 7A), como en el caso de la primera 4S-iota-carragenano sulfatasa purificada pero cuyo peso molecular fue de 115 kDa (Solicitud de Patente Francesa FR 09/52642, citada anteriormente) [3].

20 Por lo tanto, se ha identificado una sulfatasa novedosa capaz de convertir iota- en alfa-carragenano. Se distingue de la única 4S-iota-carragenano sulfatasa conocida hasta la fecha, que pertenece a la familia de las amidohidrolasas.

La secuencia de la carragenano sulfatase novedosa (Q15XH3) muestra que pertenece a la familia de las FGly-sulfatasas. Esta FGly-sulfatasa es la primera carragenano sulfatasa de esta familia que contiene otras enzimas que 25 actúan sobre los carbohidratos. Se han descrito estas sulfatasas que actúan sobre los glicosaminoglicanos (es decir, heparina) y cerebrósidos.

**Lista de referencias**

- 30 1. Bixler y col., Food Hydrocolloids, 15: 619-630, 2001  
 2. Bixler y Porse, J. Appl. Phycol., 2010, en línea  
 3. Solicitud de Patente Francesa FR 09/52642, publicada con el número FR 2944804  
 4. Copeland y col., "Complete sequence of *Pseudoalteromonas atlantica* T6c", EMBL ACCESO N° CP000388, PROTEIN\_ID ABG39415.1, 2006  
 35 5. Candiano y col., Electrophoresis, 25(9): 1327-1333, 2004

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- 40 <110> Centre National de la Recherche Scientifique - CNRS PRECHOUX, Aurélie GENICOT-JONCOUR, Sabine HELBERT, WILLIAM
- <120> Procedimiento de transformación de iota-carragenano en alfa-carragenano por medio de una clase novedosa de 4S-iota-carragenano sulfatasa
- 45 <130> BIP207246PC00
- <150> FR1058420  
 <151> 15-10-2010.
- 50 <160> 6
- <170> PatentIn versión 3.5
- 55 <210> 1  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Pseudoalteromonas atlantica
- <400> 1

ES 2 560 329 T3

Asn Gly Gln Phe Asp Asn Thr Val Ile Val Phe Thr Ser Asp Asn Gly  
1 5 10 15

Gly Lys

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Pseudoalteromonas atlantica

<400> 2

Phe Asp Gln Thr Phe Gln Val Gly Asp Asn Thr Arg  
1 5 10

<210> 3

10 <211> 11

<212> PRT

<213> Pseudoalteromonas atlantica

<400> 3

Glu Thr Glu Tyr Ile Thr Asp Gly Leu Ser Arg  
1 5 10

15

<210> 4

<211> 500

<212> PRT

<213> Pseudoalteromonas atlantica

20

<400> 4

Met Thr Phe Asn Lys Lys Val Ser Thr Leu Leu Trp Gly Thr Leu Ile



ES 2 560 329 T3

Ala Val Asp Arg Gly Val Gly Arg Ile Val Glu Gln Leu Lys Lys Asn  
 275 280 285

Gly Gln Phe Asp Asn Thr Val Ile Val Phe Thr Ser Asp Asn Gly Gly  
 290 295 300

Lys Leu Gly Gln Gly Ala Asn Asn Tyr Pro Leu Lys Glu Gly Lys Gly  
 305 310 315 320

Ser Val Gln Glu Gly Gly Phe Arg Thr Pro Met Leu Val His Trp Pro  
 325 330 335

Lys His Met Lys Ala Gly Ser Arg Phe Ser His Pro Val Leu Ala Leu  
 340 345 350

Asp Leu Tyr Pro Thr Phe Ala Gly Leu Gly Gly Ala Val Leu Pro Glu  
 355 360 365

Asp Lys Lys Leu Asp Gly Lys Asp Ile Trp Ala Asp Ile Gln Ala Asn  
 370 375 380

Thr Ala Pro His Lys Asp Glu Phe Ile Tyr Val Leu Arg His Arg Asn  
 385 390 395 400

Gly Tyr Ser Asp Ala Ala Ala Arg Arg Asn Gln Phe Lys Ala Val Lys  
 405 410 415

Asn His Asn Asp Asp Trp Lys Leu Tyr Asn Ile Ala Gln Asp Ile Ser  
 420 425 430

Glu Asp Asn Asp Ile Ser Ala Gln His Pro Asp Ile Leu Arg Asp Met  
 435 440 445

Val Ser Ser Met Glu Ser Trp Ser Trp Asn Asn Gln Gln Pro Lys Trp  
 450 455 460

Phe His Gln Ser Ala Glu Gly Ala Gln Trp Arg Leu Lys Ala Met Pro  
 465 470 475 480

Arg Phe Asp Gln Thr Phe Gln Val Gly Asp Asn Thr Arg Ser Asn Ser  
 485 490 495

Lys Lys Gly His  
 500

<210> 5  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Pseudoalteromonas atlantica

5

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)

<223> Xaa representa C o S

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 5 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa representa cualquier aminoácido

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 10 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa representa cualquier aminoácido, preferiblemente S

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 15 <222> (6)..(8)  
 <223> Xaa representa cualquier aminoácido

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 20 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa representa cualquier aminoácido, preferiblemente L

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 25 <222> (10)..(10)  
 <223> Xaa representa cualquier aminoácido, preferiblemente G

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 30 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa representa cualquier aminoácido, preferiblemente R

<400> 5

	<b>Xaa</b>	<b>Xaa</b>	<b>Pro</b>	<b>Xaa</b>	<b>Arg</b>	<b>Xaa</b>	<b>Xaa</b>	<b>Xaa</b>	<b>Xaa</b>	<b>Xaa</b>	<b>Xaa</b>
	1				5					10	

35 <210> 6  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Pseudoalteromonas atlantica

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa representa Y o V

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa representa cualquier aminoácido

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> Xaa representa S o T

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(7)  
 <223> Xaa representa cualquier aminoácido

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (10)..(11)  
5 <223> Xaa representa cualquier aminoácido  
  
<400> 6  
Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Lys Xaa Xaa His  
1 5 10

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de transformación de iota-carragenano en alfa-carragenano que comprende la catálisis enzimática de la conversión del motivo iota-carrabiosa en el motivo alfa-carrabiosa por una enzima que tiene una actividad sulfatasa y cuya secuencia peptídica comprende los péptidos de las siguientes secuencias: SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia peptídica de la enzima es la secuencia SEQ ID NO 4.
3. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicha enzima es una 4S-iota-carragenano sulfatasa.
4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la enzima se produce por una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica dicha enzima y/o un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha enzima.

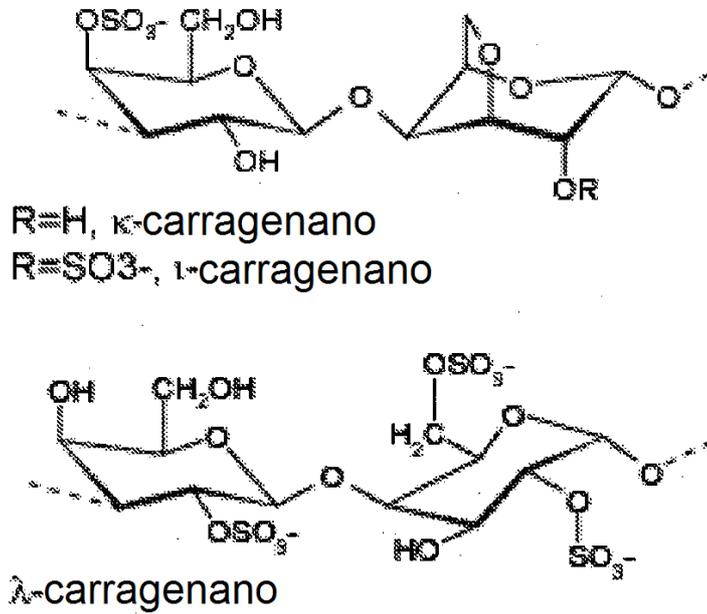


Figura 1

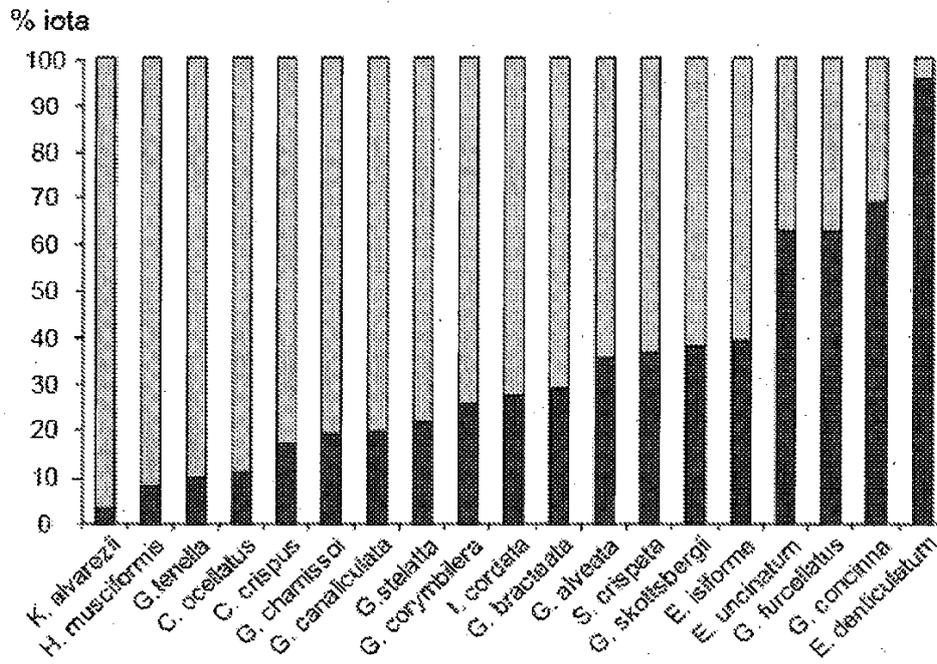


Figura 2

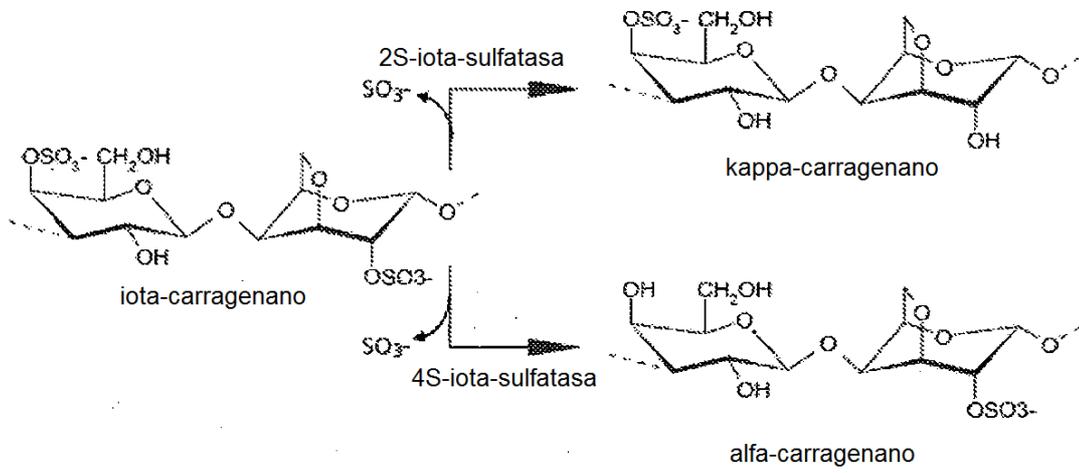


Figura 3

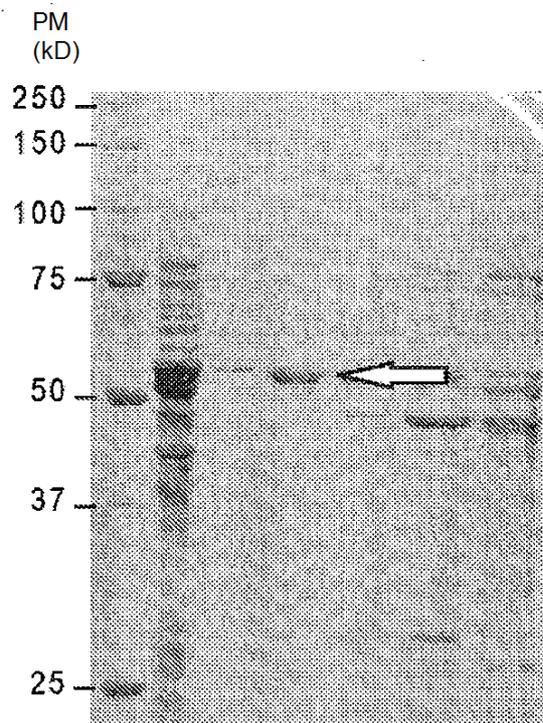


Figura 4

>Q15XH3

MTFNKKVSTLLWGTLIAISVGNASAADAGQSKADESNEKPNILFVLADDLGYNDVGF  
 NGSTDIKTPNLDGLAKNGMTFDAAYVAHPFCGPSRAAIMTGRYPHKIGAQFNLPED  
 NSNVGVSADELFIAQTMKSA[G<sup>Y</sup>F][T]GAM[G<sup>K</sup>W][H]LGEASEYHPNKHGFD<sup>Y</sup>GFLLGG  
 GHNYFPEQFEAAYNKRVAQGMTNINMYLTPLEHNGKEVRETEYITDGLSREAVNFV  
 DKA<sup>A</sup>AKKKPFFLYLAYNAPHVPLQAKEEDMAMFSQIKDKKRRTYAGMVYAVDRGV  
 GRIVEQLKKNGQFDNTVIVFTSDNGGKLGQGANNYPLKEGKGSVQEGGFRTPLV  
 HWPKHMKAGSRF<sup>S</sup>HPVLALDLYPTFAGLGGAVLPEDKKLDGKDIWADIQANTAPHK  
 DEFYVLRHRNGYSDAAARRNQFKAVKNHND<sup>D</sup>WKLYNIAQDIS<sup>E</sup>DN<sup>I</sup>SAQHPDILR  
 DMVSSMESWSWNNQPKWFHQSAEQAQWRLKAMP<sup>R</sup>FDQTFQVGDN<sup>T</sup>RSNSKK  
 GH

Figura 5

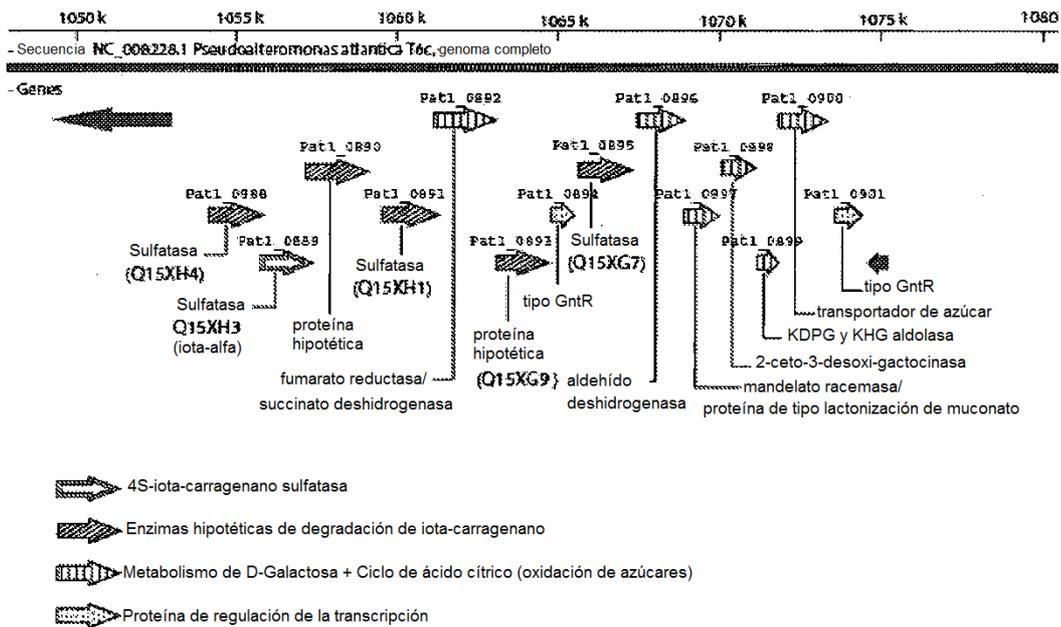


Figura 6

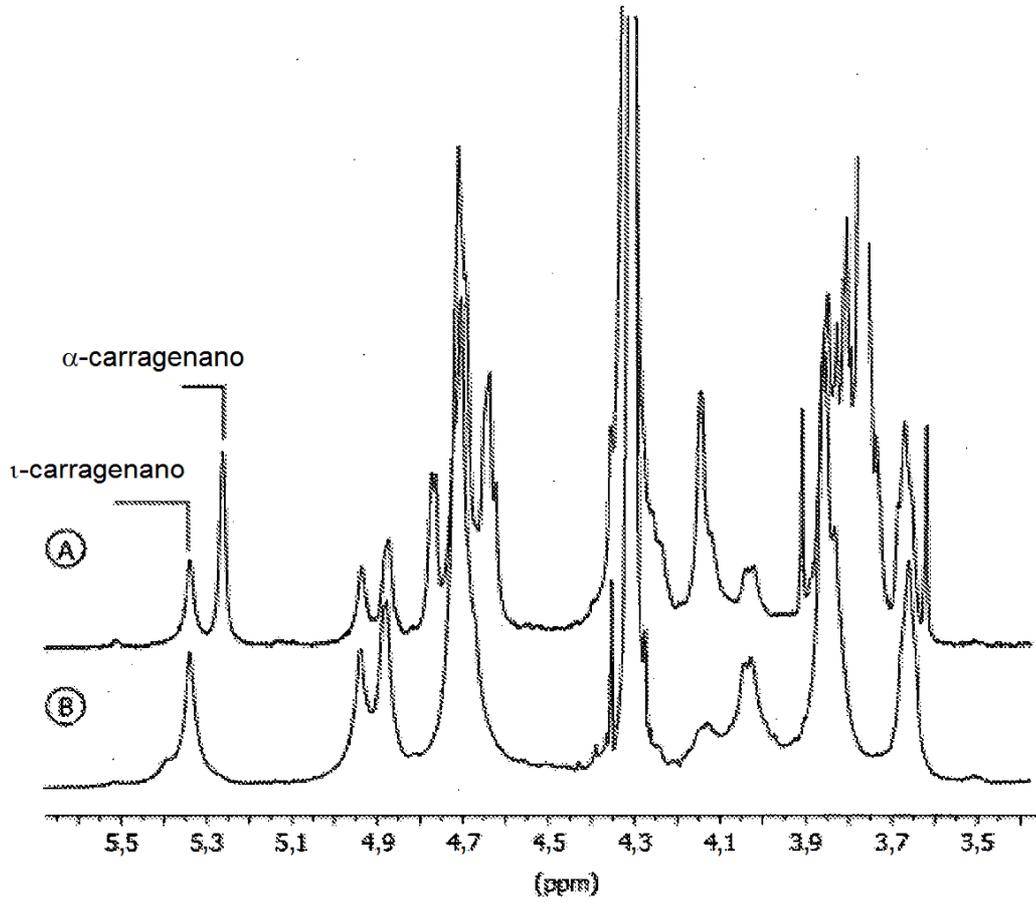


Figura 7