

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 398**

21 Número de solicitud: 201690034

51 Int. Cl.:

**C12N 1/20** (2006.01)  
**A61K 8/73** (2006.01)  
**A61Q 19/08** (2006.01)  
**A23L 29/269** (2006.01)  
**C12P 19/04** (2006.01)  
**C12R 1/38** (2006.01)

12

## PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**04.02.2015**

30 Prioridad:

**10.02.2014 ES P201430172**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**05.10.2016**

88 Fecha de publicación diferida del informe sobre el  
estado de la técnica:

**05.01.2017**

Fecha de concesión:

**20.10.2017**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**27.10.2017**

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT DE BARCELONA (100.0%)  
Centre de Patents de la UB - Baldiri Reixac 4 -  
Torre D  
08028 Barcelona (Barcelona) ES**

72 Inventor/es:

**MERCADÉ GIL, M<sup>a</sup> Elena;  
CARRIÓN FONSECA, Ornella y  
MONTES LÓPEZ, M<sup>a</sup> Jesús**

74 Agente/Representante:

**SEGURA CAMARA, Pascual**

54 Título: **Exopolisacárido bacteriano**

ES 2 585 398 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 398**

21 Número de solicitud: 201690034

57 Resumen:

Exopolisacárido bacteriano.

*Pseudomonas* sp. CECT8437 es una bacteria adaptada al frío aislada de una muestra de sedimento marino recogida de la Isla Decepción (Islas South Shetland, Antártida) que destaca por la apariencia altamente mucosa de sus colonias. Un exopolisacárido (EPS) se produce por esta cepa, que comprende glucosa, galactosa, fucosa y ácido urónico en una relación molar de 2:1:1:0,3 aproximadamente. El EPS muestra los siguientes porcentajes en peso, aproximadamente: 37,29% C, 6,17% H, 2,25% N y 0,41% S. Su peso molecular es mayor de  $2 \times 10^6$  Da. El EPS es útil para los siguientes propósitos: (i) agente crioprotector; (ii) agente emulsionante; (iii) agente espesante, estabilizante o texturizante; (iv) agente dermoprotector; y (v) agente para aumentar la elasticidad de la piel. El EPS puede usarse en composiciones cosméticas.

ES 2 585 398 B1

## DESCRIPCIÓN

### Exopolisacárido bacteriano

- 5 La presente invención se relaciona con el campo de los exopolímeros bacterianos, particularmente de los exopolisacáridos (EPSs), que pueden ser utilizados como fuente de oligosacáridos y monómeros de azúcares.

### ESTADO DE LA TÉCNICA

10

En la naturaleza, los exopolímeros bacterianos tienen varias funciones biológicas, por ejemplo, como material de reserva de compuestos biodegradables y nutrientes traza metálicos, o como parte de una estructura protectora contra depredadores, desecación, salinidad, compuestos citotóxicos y altas o bajas temperaturas.

15

Los exopolímeros bacterianos son polímeros de alto peso molecular (*molecular weight*, MW) que constituyen hasta el 40-95% del material extracelular (ME) que envuelve a la mayoría de células microbianas en ambientes marinos, entendiendo por ME todos los componentes que las bacterias secretan al ambiente extracelular. La mayoría de exopolímeros producidos por bacterias marinas son EPSs, concretamente heteropolisacáridos que contienen tres o cuatro monosacáridos diferentes que pueden ser pentosas, hexosas, amino azúcares o ácidos urónicos, ordenados en grupos de diez o menos para formar unidades repetitivas. Pueden estar también presentes sustituyentes orgánicos o inorgánicos, concretamente sulfato, fosfato, ácido acético, ácido succínico y ácido pirúvico.

25

La presencia de residuos de glucosa, galactosa y fucosa en los polisacáridos microbianos es bastante común, aunque sus cantidades varían. Los EPSs que contienen fucosa son contemplados como productos interesantes para la industria farmacéutica y cosmética. Las propiedades biológicas de este azúcar raro potencia su uso en fármacos, p.ej. como agente anticarcinogénico o antiinflamatorio, y en productos cosméticos como agente antienvjecimiento.

30

Uno de los primeros EPS descritos con los azúcares mencionados fue el ácido colánico. El ácido colánico es producido en pequeñas cantidades por muchas bacterias patógenas de la familia *Enterobacteriaceae*, p.ej. *Escherichia coli*,

35

*Salmonella typhimurium* y *Enterobacter* sp. o *Serratia* sp. El análisis del EPS que producen muestra una composición de glucosa, galactosa, fucosa y ácido glucurónico con una relación molar constante de 1:2:2:1.

- 5 En los últimos años, el análisis de EPSs bacterianos de ambientes polares se ha convertido en un campo de investigación activo, pero se han estudiado pocos de bacterias polares marinas psicrófilas o psicrotolerantes. Se han encontrado EPSs en bacterias marinas antárticas y del hielo ártico invernal, que modifican el ambiente físico-químico de las células bacterianas, participan en la adhesión celular a  
10 superficies y favorecen la retención de agua, la concentración de nutrientes, retienen y protegen los enzimas extracelulares contra la desnaturalización fría y actúan como crioprotectores.

- 15 *Pseudoalteromonas* sp. SM20310, aislada del hielo ártico invernal, secreta un EPS compuesto principalmente por manosa, y trazas de glucosa, galactosa, ramnosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y xilosa (Sheng-Bo et al., "Structure and ecological roles of a novel exopolysaccharide from the Arctic sea ice bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM20310", 2012, Applied and Environmental Microbiology doi:10.1128/AEM.01801-12). Otras bacterias adaptadas al frío aisladas de la Antártida  
20 son *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125, la cual sintetiza un EPS consistente en manosa y trazas de glucosa (Corsaro et al., "Influence of growth temperature on lipid and phosphate contents of surface polysaccharides from the Antarctic bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC 125", Journal of Bacteriology, 2004, vol. 186. pp. 29-34), y *Pseudoalteromonas arctica* KOPRI 21653, con un EPS compuesto de  
25 galactosa y glucosa (Sung, J. K. et al., "Cryoprotective properties of exopolysaccharide (P-21653) produced by the Antarctic bacterium, *Pseudoalteromonas arctica* KOPRI 21653", Journal of Microbiology, 2007, vol. 45, pp. 510-514).

- También se han descrito EPSs más complejos de ambientes antárticos, incluyendo  
30 *Pseudoalteromonas* sp. CAM025, *Pseudoalteromonas* sp. CAM036, y otras cepas del mismo género. El EPS producido por *Pseudoalteromonas* sp. CAM025 es un heteropolisacárido sulfatado con elevados niveles de ácidos urónicos con grupos acetilo, y su composición monosacáridica se estima que es glucosa, galactosa, ramnosa y ácido galacturónico. La cepa *Pseudoalteromonas* sp. CAM036 también  
35 sintetiza un heteropolisacárido sulfatado con elevados niveles de ácidos urónicos con grupos acetilo, compuesto principalmente por glucosa, manosa, arabinosa, ácido

- galacturónico y N-acetilgalactosamina (Mancuso et al. "Production of exopolysaccharides by Antarctic marine bacterial isolates", *Journal of Applied Microbiology*, 2004, vol. 96, pp. 1057-1066). Otros estudios han confirmado que los datos de composición química y peso molecular pueden ser muy diversos entre los
- 5 EPSs producidos por aislamientos antárticos (Mancuso Nichols et al. "Chemical characterization of exopolysaccharides from Antarctic marine bacteria", *Microbial Ecology*, 2005, vol. 49, 578-589), y es destacable que muchos de ellos presenten un alto contenido proteico.
- 10 Un hecho común al analizar muchos ME secretados por bacterias adaptadas al frío, es su complejidad. Aunque los estudios de caracterización de ME bacterianos demuestran claramente que los EPSs son el mayor constituyente químico, ahora está claro que otras moléculas, concretamente proteínas, lípidos, y ácidos nucleicos
- 15 estructuras particuladas llamadas Vesículas de Membrana Externa (VMEs) en el ME que aumentan el contenido proteico de los EPSs. Las VMEs se producen durante el transcurso del metabolismo y crecimiento celular normal de la mayoría de bacterias Gram-negativas. Éstas son vesículas esféricas de bicapa lipídica extruidas de regiones de la membrana externa bacteriana y contienen lipopolisacárido, proteínas
- 20 periplásmicas, proteínas de membrana externa y fosfolípidos (Kulp A. et al., "Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles", *Annual Review of Microbiology*, 2010, vol. 64, pp. 163-184).
- La complejidad del ME está claramente demostrada en bacterias antárticas de
- 25 diferentes géneros, p.ej. *Pseudoalteromonas*, *Shewanella*, *Psychrobacter*, *Marinobacter* y otros. La mayoría del ME analizado estaba compuesto por heteropolisacáridos capsulares y grandes cantidades de VMEs (Frias, A. et al. "Membrane vesicles: a common feature in the extracellular matter of cold-adapted Antarctic bacteria", *Microbial Ecology*, 2010, vol. 59, pp. 476-486 (errata en *Microbial*
- 30 *Ecology*, 2010, vol. 60, p. 476). Muchas bacterias del género *Pseudomonas* y otras bacterias patógenas producen grandes cantidades de VMEs implicadas en la liberación de toxinas frente a células eucariotas (Tashiro Y. et al, "Multifunctional membrane vesicles in *Pseudomonas aeruginosa*", *Environmental Microbiology*, 2011, doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02632x). La presencia de VMEs secretadas por
- 35 bacterias, como sucede en la mayoría de *Pseudoalteromonas* y otras cepas Gram-negativas, es un inconveniente ya que pueden dificultar la extracción y purificación de

- los EPSs y al mismo tiempo aumentar su toxicidad y/o antigenicidad. El análisis de los componentes de las VMEs ha demostrado que las vesículas contienen una amplia variedad de factores de virulencia. Estos factores de virulencia incluyen proteínas, concretamente adhesinas, toxinas, y enzimas así como antígenos no proteicos como lipopolisacáridos (Ellis T.N. et al., “Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2010, vol. 74, pp. 81-94). Además, el pequeño tamaño de las VMEs, entre 20-200 nm, complica su separación de los EPSs que son secretados simultáneamente por las bacterias.
- El género *Pseudomonas* es una de las fuentes de EPSs más estudiadas. Varias especies del género *Pseudomonas* son capaces de sintetizar una amplia variedad de exopolisacáridos. Muchos de ellos son polímeros de tipo alginatos, siendo los componentes principales el ácido manurónico y el ácido glucurónico. También el exopolisacárido gelan, compuesto principalmente por glucosa, ramnosa y glucuronato está sintetizado por especies del género *Pseudomonas*. Cuando se utiliza la glucosa como fuente de carbono, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens* sintetizan un EPS compuesto por glucosa, galactosa y piruvato. Se ha descrito que el EPS producido por *P. fluorescens* Biovar II está compuesto por galactosa, manosa, ramnosa, glucosa, fucosa, ribosa, arabinosa y xilosa. El EPS purificado de *P. putida* G7 contiene los monosacáridos glucosa, ramnosa, ribosa, N-acetilgalactosamina y ácido glucurónico. Similarmente, algunos investigadores han demostrado que el EPS aislado de *Pseudomonas caryophylli* CFR 1705 cultivada en un medio con lactosa está compuesto por ramnosa, manosa y glucosa. Más recientemente, un heteropolisacárido, compuesto por los azúcares neutros galactosa, glucosa, manosa y ramnosa y que contiene grupos acetilo ha sido identificado en una cepa de *Pseudomonas oleovorans* crecida en glicerol puro o productos ricos en glicerol.

Aunque estudios moleculares han demostrado que la presencia de bacterias del género *Pseudomonas* es bastante común en ambientes marinos polares, hasta el conocimiento de los inventores, pocas de ellas procedentes de regiones polares han sido clasificadas a nivel de especie y no se han analizado los EPSs de estas cepas (Reddy et al. “Psychrophilic pseudomonads from Antarctica: *Pseudomonas antarctica* sp. nov., *Pseudomonas meridiana* sp. nov. and *Pseudomonas proteolytica* sp.”, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2004, vol. 54, pp. 713-719).

35

Así pues es interesante encontrar alternativas a los EPSs bacterianos, que estén libres de proteínas, para un uso adecuado y eficiente en la industria.

## EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

5

Un aspecto de la presente invención se relaciona con una cepa de *Pseudomonas* sp. depositada el 1.10.2013 con el número CECT8437 en la "Colección Española de Cultivos Tipo", con dirección en: "Edificio 2 CUE. Parc Científic. Universitat de Valencia. Calle Catedrático Agustín Escardino, 9. 46980 Paterna (Valencia), España". La materia extracelular de esta cepa está prácticamente libre de VME en comparación con otras bacterias de la Antártida.

10

Otro aspecto de la invención se relaciona con un EPS bacteriano aislado de un cultivo de *Pseudomonas* sp. CECT8437. En una realización particular, el EPS comprende glucosa, galactosa, fucosa y ácido urónico en una relación molar de 2:1:1:0,3 aproximadamente. En otra realización particular, el EPS tiene una composición elemental, en porcentajes en peso, de 37,29% C, 6,17% H, 2,25% N y 0,41% S. aproximadamente. En otra realización particular, el EPS tiene un espectro de infrarrojo transformado de Fourier con (en  $\text{cm}^{-1}$ ): una banda a 3400, un pico a 2930, un pico a 2985, una banda entre 1200 y 900, una banda a 1720, un pico a 1640 y un pico a 1540. También son partes de la presente invención las composiciones cosméticas que comprenden cantidades efectivas del EPS e ingredientes o portadores cosméticamente aceptables.

15

20

Otro aspecto de la presente invención se relaciona con el uso de los EPSs antes mencionados para los siguientes propósitos: (i) agente crioprotector; (ii) agente emulsionante; (iii) agente espesante, estabilizante o texturizante; (iv) agente dermoprotector; y (v) agente para aumentar la elasticidad de la piel.

25

Los EPSs de la presente invención pueden ser hidrolizados, parcial o completamente, químicamente, mecánicamente (p.ej. por sonicación) o enzimáticamente, en condiciones análogas a las conocidas en la técnica, para producir oligosacáridos de distintas longitudes, con características diferentes de las de los nativos. Los respectivos productos hidrolizados obtenidos también son parte de la presente invención; ellos pueden usarse como fuente de oligosacáridos y de monómeros de azúcar como la L-fucosa, útiles en productos cosméticos, productos farmacéuticos y

30

35

suplementos alimenticios. En una realización particular la hidrolización es química; preferiblemente por tratamiento con un ácido; y más preferiblemente por tratamiento con ácido sulfúrico, ácido clorhídrico o ácido trifluoroacético. Por ejemplo, la hidrolización con ácido sulfúrico puede hacerse por tratamiento a 100-120 °C durante 0,5 hasta 8 horas, preferiblemente a 100-120°C durante 0,5 hasta 2 horas. Estos tratamientos de hidrolización producen mono- y/o oligosacáridos que frecuentemente son derivatizados en acetatos de alditol, metil glucósidos trimetil sililados, y glucósidos (-2)-butil trimetil sililados.

- 10 El EPS de la invención es nuevo respecto a otros EPSs producidos por otras bacterias adaptadas al frío, *Pseudomonas* sp. u otras bacterias reportadas hasta la fecha.

El EPS de la invención tiene una actividad emulsionante frente diferentes aceites alimentarios y cosméticos que es muy superior a la de emulsionantes comerciales, concretamente goma xantana, goma arábica o Span 20. Forma emulsiones altamente estables frente al aceite cosmético cetiol V, exhibiendo un comportamiento de flujo pseudoplástico, baja tixotropía y punto de fluidez, y confiere una crioprotección significativa para la propia cepa así como para otras bacterias, incluyendo *E. coli*, indicando un papel crioprotector universal. La actividad crioprotectora del EPS mostró una clara relación dosis-respuesta a -20 °C y -80 °C, a diferencia de lo que se observó cuando el estabilizante de membrana Suero Bovino Fetal (SBF) fue añadido a las células.

Debido a la amplia diversidad de composición y diferentes propiedades físico-químicas, los EPSs han emergido como nuevos materiales poliméricos industrialmente importantes, los cuales se están convirtiendo gradualmente en económicamente competitivos con las gomas naturales producidas por algas marinas y plantas. Además, los EPSs derivados de recursos naturales tienen una ventaja competitiva, debido a su biodegradabilidad y a menudo biocompatibilidad.

30

El EPS de la invención no contiene cantidades detectables de VMEs, excluyendo por tanto proteínas potencialmente tóxicas o compuestos antigénicos, concretamente lipopolisacáridos. Además, la ausencia de VMEs favorece sus procesos de obtención y purificación, todo lo cual lo hace deseable para usos particulares. Así pues el EPS CECT8437 es un material atractivo para aplicaciones médicas tales como agente espesante, estabilizante, de unión o texturizante.

35

El EPS de *Pseudomonas* sp. CECT8437 es un polisacárido de tipo limo que está unido débilmente a la superficie celular y, a diferencia de los polisacáridos capsulares, es principalmente excretado al medio extracelular. Cabe destacar que el ME de esta cepa  
5 no contiene cantidades significativas de VMEs, contrariamente a lo que se observa en el material extracelular de varias bacterias antárticas adaptadas al frío. La presencia de proteínas y otros compuestos derivados principalmente de VMEs en los EPSs puede ser antigénica o tóxica. El hecho de que la cepa de la invención esté libre de VMEs significa una ventaja tecnológica evidente sobre otros EPSs extraídos de  
10 *Pseudomonas* u otras bacterias Gram-negativas. El valor comercial del EPS de la invención se basa principalmente en esta propiedad.

Se ha encontrado que el EPS de la presente invención es un emulsionante más eficiente frente a varios aceites alimentarios y el hidrocarburo n-hexadecano que otros  
15 EPSs bacterianos o gomas de plantas descritos en el estado de la técnica, principalmente goma xantana y goma arábica. Similarmente, el EPS demuestra una actividad emulsionante frente al aceite cosmético cetiol V superior al emulsionante comercial utilizado como control positivo, Span 20. Además, se observó que el EPS de *Pseudomonas* sp. CECT8437 forma emulsiones estables a largo plazo con  
20 comportamiento pseudoplástico. Estos resultados, junto con su estabilidad, resaltan las potenciales aplicaciones del EPS de *Pseudomonas* sp. CECT8437 como agente emulsificante, con las atracciones adicionales de una producción sostenible, no toxicidad y biodegradabilidad.

25 Las principales propiedades del EPS, concretamente su capacidad para formar emulsiones estables a largo plazo frente a diferentes aceites alimentarios y cosméticos y su actividad crioprotectora universal, lo hacen una alternativa prometedora a los polisacáridos comerciales descritos en el estado de la técnica.

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

todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas aquí indicadas.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5

FIG 1: Espectro de Infrarrojo del EPS producido por *Pseudomonas* sp. CECT8437 (cf. Ejemplo 6).

10

FIG 2: Espectro <sup>1</sup>H-RMN del EPS producido por *Pseudomonas* sp. CECT8437 (cf. Ejemplo 6).

15

FIG 3: Actividades emulsionantes ( $A_{540}$ ) del EPS, goma xantana y goma arábica frente a los aceites de oliva, girasol y maíz, y n-hexadecano tras 24h a temperatura ambiente. A: Aceite de oliva. B: Aceite de girasol. C: Aceite de maíz. D: n-Hexadecano. Punteado: EPS. Diagonal: Goma xantana. Líneas planas: Goma arábica. (cf. Ejemplo 7).

20

FIG 4: Reograma de las emulsiones con un 2% de EPS de *Pseudomonas* sp. CECT8437 y una mezcla de agua y cetiol V (1:2; v/v). El esfuerzo de cizalla (SS, *shear stress*) se representa por una línea negra. La viscosidad (V) se representa por una línea gris. SR = índice de cizalla (*shear rate*) (cf. Ejemplo 9).

25

FIG 5: Perfiles de *backscattering* (BS) de la emulsión con un 2% de EPS y una mezcla de agua y cetiol V (1:2; v/v) en función de la altura de la muestra (SH, *sample height*), analizados a días 0 y 30 de almacenamiento a temperatura ambiente. Línea gruesa: día 0. Línea gris: día 30 (cf. Ejemplo 11).

30

FIG 6: Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de células salvajes (*wild-type*) de *Pseudomonas* sp. CECT8437 (A), y células mutantes no productoras de EPS (B) (cf. Ejemplo 12).

35

FIG 7: Tasas de supervivencia (SUR, *survival rates*) de cultivos de *E.coli* ATCC 10536 congelados a -20 °C con EPS o SBF. Las tasas de supervivencia están expresadas como porcentaje de células viables con respecto a las células no congeladas (n = 3). Marca en línea basal: SBF. Entramado en diagonal: EPS (cf. Ejemplo 12).

FIG 8: Tasas de supervivencia (SUR, *survival rates*) de cultivos de *E.coli* ATCC 10536 congelados a -80 °C con EPS o SBF. Las tasas de supervivencia están expresadas como porcentaje de células viables respecto a las células no congeladas (n = 3). Marca en línea basal: SBF. Entramado en cuadros: EPS (cf. Ejemplo 12).

5

FIG 9: Micrografías de microscopía electrónica de transmisión de secciones ultrafinas de bacterias antárticas adaptadas al frío tras fijación por alta presión y criosustitución (*High pressure-freezing and freeze-substitution*, HPF-FS). Las barras son 200 nm. A: *Pseudomonas* sp. CECT8437. B: *Pseudoalteromonas* sp. C: *Shewanella* sp. NF22. D: *Marinobacter* sp. E: *Psychrobacter* sp. NF23. F: *Shewanella* sp. M7 (cf. Ejemplo 13).

10

FIG 10: Elasticidad (EL) de la piel tratada con placebo o con 0,2% de EPS. La elasticidad de la piel se expresa como el % de la elasticidad-neta en el día 9 respecto al día 0 y el control. Columna blanca: placebo. Columna negra: 0,2% de EPS.

15

FIG 11: Pérdida de agua transepidérmica (TEWL, *transepidermal water loss*) de la piel tratada con placebo o con 1% de EPS después de la exposición a SLS. TEWL se expresa como porcentaje de TWEL tras el tratamiento won SLS con respecto al TEWL inicial. Columna blanca: placebo. Columna negra: 1% de EPS.

20

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES PARTICULARES

*Pseudomonas* sp. CECT8437 es una bacteria adaptada al frío que se aisló de una muestra de sedimento marino recogida en la Deception Island (South Shetland Islands, Antártida); es remarcable la apariencia altamente mucosa de sus colonias. El peso molecular del EPS de la invención se evaluó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (*size exclusion chromatography*, SEC) usando estándares convencionales de dextrano de peso molecular entre  $8.8 \times 10^3$  a  $2 \times 10^6$ , siendo el peso molecular de la EPS de la invention mayor de  $2 \times 10^6$  Da (cf. Ejemplo 5). El análisis de monosacáridos y ácido urónico del EPS de la invención revela que comprende glucosa, galactosa, fucosa y ácido urónico en una relación molar de 2:1:1:0.3 (cf. Ejemplos 2, 3).

25

30

La capacidad emulsionante del EPS de *Pseudomonas* sp. CECT8437 se ensayó frente a varios compuestos hidrofóbicos, concretamente aceites alimentarios, cosméticos e hidrocarburos. La FIG 3 muestra las actividades emulsionantes del EPS bajo

35

- condiciones neutras frente a tres aceites alimentarios diferentes y el n-hexadecano. El EPS exhibe una elevada capacidad emulsionante para los aceites de oliva, girasol y maíz, con una absorbancia a una longitud de onda de 540 nm ( $A_{540}$ ) de 1,28, 1,15 y 0,66, respectivamente. En todos los casos, el EPS mostró una mayor capacidad emulsionante que los emulsionantes comerciales goma xantana y goma arábica, con la excepción del aceite de girasol, con el cual el EPS mostró la misma actividad emulsionante que la goma xantana. El EPS también demostró una capacidad emulsionante superior frente al n-hexadecano a los controles positivos. La actividad emulsionante del EPS también fue ensayada frente al aceite cosmético cetiol V utilizando otro protocolo de emulsificación, y se comparó con el emulsionante cosmético comercial Span 20. Se formaron emulsiones estables con una consistencia cremosa con un 2% de EPS, mientras que se necesitó un 6% de Span 20 para conseguir el mismo grado de emulsificación (cf. Ejemplo 7).
- El comportamiento pseudoplástico del EPS de *Pseudomonas* sp. CECT8437 (cf. Ejemplo 9) lo convierte en un material atractivo para aplicaciones industriales y médicas como agente espesante, estabilizante, de unión o texturizante, similar a otros EPSs bacterianos comercializados actualmente.
- El potencial zeta (PZ) representa la carga eléctrica de la superficie de la partícula de la emulsión, representando un parámetro importante que permite la predicción de la estabilidad física de la emulsión. Si el valor del PZ es  $>|25|$ , las suspensiones de partículas tenderán a estabilizarse ya que las fuerzas de repulsión excederán a las de atracción. Por otra parte, si el PZ es  $<|25|$ , las partículas se unirán hasta la floculación ya que las fuerzas de atracción serán más fuertes. El valor PZ de las emulsiones con un 2% de EPS y una mezcla de agua y cetiol V (1:2; v/v) fue  $0,1 \pm 0,4$  mV, lo que indicó que las partículas de la emulsión tenían una carga superficial débil (cf. Ejemplo 10).
- Los resultados del Turbiscan demuestran que la emulsión del EPS de la invención con cetiol V fue altamente estable, y no se detectó variación del backscattering que indicara fenómenos de desestabilización como sedimentación, cremado, floculación o coalescencia (cf. Ejemplo 11). Esta estabilidad no es debida a la carga electrostática de las partículas, representada por el bajo valor PZ mostrado por el EPS. Es probable que la estabilidad de las emulsiones del EPS de *Pseudomonas* sp. CECT8437 sea debida a la estabilización estérica, un proceso común entre los exopolisacáridos de

elevado peso molecular, los cuales estabilizan las emulsiones formando una extensa red en la fase continua. El EPS consecuentemente se convierte en altamente viscoso, de manera que los movimientos de las gotas y encuentros se reducen.

- 5 Varios estudios han demostrado que la producción de EPS en bacterias a bajas temperaturas es un mecanismo de adaptación a temperaturas frías. Se ha descrito que *Pseudoalteromonas* sp. CAM025 produjo 30 veces más EPS a -2 °C y 10 °C comparado con 20 °C (cf. C.A. Mancuso Nichols et al., "Production of exopolysaccharides by Antarctic marine bacterial isolates", Journal of Applied Microbiology, 2004, vol. 96, pp. 1057-1066). La producción de EPS por la bacteria marina psicrófila *Colwellia psychrerythraea* cepa 34H es alrededor de 10 veces más elevada a -8 °C que a -4 °C. El EPS de la invención aumenta las tasas de supervivencia a temperaturas de congelación de *Pseudomonas* sp. CECT8437 y células de otras especies (cf. Ejemplo 12). Esto indica los beneficios del EPS de la invención para su uso como crioprotector.

- A no ser que se especifique, los protocolos citados son accesibles en el libro de texto C. A. Reddy et al. (eds.), "Methods for General and Molecular Microbiology", 3rd Edition, ASM Press, Washington, USA (de aquí en adelante, el "libro de texto"), y factibles para la persona con conocimientos medios de la técnica. En general, se realizaron tres medidas, y la estimación del error es el error estándar de la media.

#### Ejemplo 1: Producción del EPS

- 25 *Pseudomonas* sp. CECT8437 fue cultivada en el medio mínimo MM1: 20 g/l glucosa; 0,5 g/l bacto-peptona; 0,1 g/l extracto de levadura; 0,4 g/l citrato; 7 g/l NaNO<sub>3</sub>; 2 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,7 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O; 0,1 g/l MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 0,018 g/l FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O; 1 ml elementos traza. El cultivo fue incubado a 11 °C en un agitador orbital a 150 rpm durante 120 h. Para la obtención del EPS, las células fueron retiradas del cultivo por centrifugación (6000 rpm, 25 min, 4 °C). El sobrenadante libre de células fue reservado y los sedimentos fueron lavados tres veces con una solución Ringer (Scharlau) y centrifugados (40000xg, 20 min, 4 °C) para retirar el EPS adherido a la superficie celular. Los sobrenadantes de los lavados se juntaron con el primer sobrenadante del cultivo y fueron sometidos a un proceso de filtración de flujo tangencial a través de membranas de 0,22 µm (Millipore). El filtrado fue sometido a un proceso de diálisis con agua destilada estéril 1:10 (v/v) a través de membranas de 10000 Da (Millipore) para

retirar sales, pigmentos y otros componentes del medio de cultivo y para obtener un EPS concentrado y purificado. El producto resultante fue liofilizado.

#### Ejemplo 2: Caracterización del contenido proteico y de ácidos urónicos.

5

El contenido total de ácidos urónicos del EPS fue  $2,40\% \pm 0,33\%$  del peso total del EPS determinado por el método metahidroxidifenil (N. Blumenkrantz et al., "New method for quantitative determination of uronic acids", Analytical Biochemistry, 1973, vol. 54, pp.484-489). No se detectaron ni ácido galacturónico ni ácido glucurónico por la técnica de HPLC. El contenido proteico del EPS determinado por el ensayo de Bradford (BioRad) fue menor del 2% del peso total del EPS obtenido.

10

#### Ejemplo 3: Preparación del producto hidrolizado y análisis de monosacáridos

15

Con el fin de analizar la composición de azúcares neutros, la muestra del EPS del Ejemplo 1 fue hidrolizada con 1%  $H_2SO_4$  a 111 °C durante 0,5 horas. El hidrolizado fue utilizado para identificar y cuantificar los monosacáridos constituyentes por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (*High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) utilizando las columnas Aminex HPLC para análisis de carbohidratos HPX-87P (300 x 7,8 mm) y HPX-87C (300 x 7,8 mm) (BioRad). Agua miliQ a 85 °C fue utilizada como eluyente, y la detección fue llevada a cabo con un detector de índice de refracción Waters 2414 (Waters). 15 azúcares y amino azúcares comerciales fueron utilizados como patrones para la identificación de monosacáridos. Los resultados mostraron la presencia de los siguientes azúcares neutros: glucosa en un  $17,04 \pm 0,32\%$ , galactosa en un  $8,57 \pm 1,15\%$ , y fucosa en un  $8,21 \pm 1,12\%$ , en relación al peso total del EPS obtenido. La relación molar de estos azúcares y del ácido urónico es 2:1:1:0,3 y permanece constante para el EPS.

20

25

#### Ejemplo 4: Análisis elemental

30

La composición elemental del EPS fue analizada utilizando un analizador elemental orgánico Thermo EA 1108 (Thermo Scientific), trabajando en las condiciones estándares recomendadas por el proveedor del instrumento (flujo de helio a 120 ml/min, horno de combustión a 1000 °C, horno de la columna cromatográfica a 60 °C, bucle de oxígeno 10 ml a 157 kPa). Los resultados mostraron un contenido de 37,29%

35

$\pm 1,07$  de Carbono;  $6,17\% \pm 0,10$  de Hidrógeno;  $2,25\% \pm 0,21$  de Nitrógeno; y  $0,41\% \pm 0,16$  de Azufre.

#### Ejemplo 5: Cromatografía de Exclusión por Tamaño

5

El peso molecular (PM) del EPS fue determinado por (*size-exclusion chromatography*, SEC) en un equipo de HPLC Waters 2695 equipado con una columna Ultrahydrogel 500 (7,8 x 300 mm; Waters) y un detector de índice de refracción diferencial (Waters 2414). 0,1 M NaNO<sub>3</sub> fue utilizado como eluyente a temperatura ambiente. Patrones de dextrano (Sigma-Aldrich) de PM de entre  $8,8 \times 10^3$  y  $2 \times 10^6$  Da fueron utilizados para calibrar la columna para la estimación del PM. Los resultados mostraron un peso molecular superior al patrón de dextrano de mayor peso molecular disponible  $2 \times 10^6$  Da según Sigma.

#### 15 Ejemplo 6: Espectroscopía FT-IR y RMN

Todos los espectros de FT-IR fueron obtenidos en el modo de transmisión, utilizando una célula de compresión de diamante Thermo (Thermo Scientific). Los espectros fueron obtenidos en un área de  $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ , con una resolución de  $4 \text{ cm}^{-1}$  y 64 escáneres.

Los espectros de infrarrojo del EPS fueron adquiridos con un microscopio FT-IR Thermo 173 IN10MX (Thermo Scientific), utilizando un detector MCT enfriado con nitrógeno líquido. En el espectro de Infrarrojo Transformado de Fourier (*Fourier Transform Infrared*, FT-IR), la ancha e intensa banda alrededor de  $3400 \text{ cm}^{-1}$  representa el enlace O-H de los hidroxilos y agua ligada; los picos de los enlaces CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub> aparecen a  $2930 \text{ cm}^{-1}$  y  $2985 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente; las señales bien definidas que se encuentran entre  $1200$  y  $900 \text{ cm}^{-1}$  representan el esqueleto C-O y las bandas de vibración de C-C de los carbohidratos; La banda a  $1720 \text{ cm}^{-1}$  puede atribuirse a los enlaces C=O de los carbonilos de los grupos acilo; El pico C=O de la amida 1 a  $1640 \text{ cm}^{-1}$  y el pico del enlace N-H de la amida 2 a  $1540 \text{ cm}^{-1}$  son típicos de proteínas (FIG 1). Esta detección de proteínas está en consonancia con el bajo contenido proteico detectado por el ensayo de Bradford y probablemente se debe a la lisis celular durante los procesos de obtención y purificación del EPS. En cualquier caso, el proceso de centrifugación a alta velocidad está validado como uno de los mejores métodos para

evitar la lisis celular en la obtención de EPSs de cultivos bacterianos (libro de texto página 366, capítulo 15.3.8).

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Protón ( $^1\text{H}$ -RMN) se obtuvieron en D<sub>2</sub>O 99.96% (Euriso-top) a 25 °C usando un espectrómetro Varian VNMR500 (500 MHz, Varian Ltd). Los resultados están en consonancia con la composición de carbohidratos del biopolímero, con picos marcados del componente glicano predominante (FIG 2). El análisis detallado del espectro del EPS no fue posible debido a la complejidad de la muestra, pero se puede observar la presencia de azúcares en la región de protones anoméricos (4,2-5,5 ppm) y en la región de protones de anillo (3,2-4 ppm). Las señales intensas a 1,2 ppm en el espectro del EPS podrían corresponder a los protones H6 metilo de la fucosa.

#### Ejemplo 7: Actividad emulsionante frente a aceites alimentarios, cosméticos y n-hexadecano

Para ensayar la actividad emulsionante del EPS, se llevó a cabo un protocolo descrito (cf. Gutiérrez et al., "Emulsifying and metal ion binding activity of a glycoprotein exopolymer produced by *Pseudoalteromonas* sp. strain TG12", *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, vol. 74, pp. 4867-4876). La goma xantana y la goma arábica (Sigma-Aldrich) se utilizaron como controles positivos. Las emulsiones se prepararon como se describe a continuación: se añadieron 20 mg del emulsionante analizado (EPS, goma xantana y goma arábica) a 5 ml de PBS 0,1 M (0,02% p/v), y luego se mezclaron con 0,8 ml de n-hexadecano (Sigma-Aldrich), aceite de oliva, aceite de girasol o aceite de maíz utilizando un homogeneizador Ultra-turrax T10 basic (IKA) a velocidad 5 durante 1 min. Las emulsiones se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 24 h. Tras este tiempo, se determinó la actividad emulsionante (A<sub>540</sub>) midiendo la turbidez de la capa acuosa inferior utilizando un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu) a 540 nm. Las actividades emulsionantes fueron comparadas bajo condiciones neutras (PBS 0,1 M, pH 7). Muestras de los aceites alimentarios correspondientes o el n-hexadecano y solución salina tamponada con fosfato (*phosphate-buffered saline solution*, PBS) sin el EPS fueron utilizadas como control, y los valores A<sub>550</sub> de estos controles se restaron a los del EPS, goma xantana y goma arábica para obtener sus actividades emulsionantes finales.

También se ensayó la actividad emulsionante del EPS frente al aceite cosmético cetiol V (Fagron), y se comparó con el emulsionante comercial Span 20 (Croda). Con este propósito, se preparó una mezcla de agua y el compuesto hidrofóbico cetiol V en la proporción 1:2 v/v respectivamente. Después, se añadió el EPS de la invención o Span 20 a diferentes muestras de la mezcla a una concentración de entre el 1% y el 12%, y las emulsiones se prepararon utilizando un homogeneizador Ultra-turrax T10 basic (IKA) a velocidad 5 durante 2 min. Emulsiones estables con una consistencia cremosa se formaron con un 2% de EPS, mientras que se necesitó un 6% de Span 20 para conseguir el mismo grado de emulsificación.

Se ensayó la estabilidad de la emulsión del EPS bajo varias condiciones de pH, temperatura y salinidad, resultando que las emulsiones se mantuvieron estables durante más de cuatro meses a pH de entre 5 y 8, temperaturas de 4 °C a 42 °C y concentraciones de NaCl hasta 1 M.

#### Ejemplo 8: Análisis de tamaño de las partículas

El análisis de tamaño de las partículas de las emulsiones con un 2% de EPS, y una mezcla de agua y cetiol V (1:2; v/v) se llevó a cabo por difracción láser (DL) utilizando un Mastersizer Hydro 2000MU (Malvern instruments) obteniendo el volumen de distribución de las partículas. Para el análisis DL se utilizaron los diámetros 10, 50 y 90%: por ejemplo, un valor de DL90% indica que el 90% (distribución de volumen) de las partículas medidas poseen un diámetro igual o inferior que el valor dado. Las emulsiones con un 2% de EPS y una mezcla de agua y cetiol V (1:2; v/v) revelaron valores  $LD10\% \leq 4,57 \mu\text{m} \pm 0,001$ ,  $LD50\% \leq 10,66 \mu\text{m} \pm 0,006$  y  $LD90\% \leq 20,36 \mu\text{m} \pm 0,03$ , respectivamente, indicando que las partículas de la emulsión estaban en el rango micrométrico, con el pico principal alrededor de 12  $\mu\text{m}$ .

#### Ejemplo 9: Medidas reológicas

Las medidas reológicas de las emulsiones con un 2% de EPS, y una mezcla de agua y cetiol V (1:2, v/v) se realizaron en un reómetro Haake RheoStress 1 (Thermo Scientific) equipado con geometría cono y placa (diámetro de placa 35 mm, ángulo de cono 2°). Todas las medidas se llevaron a cabo a 25 °C. Se realizaron estudios de cizalla continua para evaluar el esfuerzo de cizalla (Pa) en función de la velocidad de cizalla ( $\text{s}^{-1}$ ). Este estudio se llevó a cabo con una velocidad de cizalla de 0-100  $\text{s}^{-1}$ .

durante 3 min,  $100 \text{ s}^{-1}$  durante 1 min y vuelta a  $0 \text{ s}^{-1}$  durante 3 min. Se midieron el esfuerzo de cizalla y la viscosidad resultantes. En los estudios reológicos, la curva de flujo de la emulsión con un 2% de EPS exhibió un comportamiento de flujo pseudoplástico, y una baja tixotropía y punto de fluidez (FIG 4). Sin embargo, las curvas de flujo del agua y cetiol V sin el EPS mostraron un comportamiento Newtoniano (datos no mostrados), indicando que la pseudoplasticidad era debida a la presencia del EPS en la emulsión. Además, la viscosidad estimada de la emulsión fue de  $4,46 \pm 0.007 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ .

#### 10 Ejemplo 10: Medida del potencial zeta

El potencial zeta (PZ) de las emulsiones con un 2% de EPS y una mezcla de agua y cetiol (1:2; v/v) se determinó utilizando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) a  $25^\circ\text{C}$ . El PZ se calculó a partir de la movilidad electroforética utilizando la ecuación de Helmholtz- Smoluchowski (cf. S.R. Deshiikan et al. "Modified booth equation for the calculation of zeta potential", Colloid and Polymer Science, 1998, vol. 276, pp. 117-124). El procesamiento de los datos fue realizado con el software incluido en el sistema. El valor PZ de las emulsiones con un 2% de EPS y una mezcla de agua y cetiol V (1:2; v/v) fue  $0,11 \pm 0,4 \text{ mV}$ , el cual indicó que las partículas de la emulsión tenían una carga superficial débil.

#### Ejemplo 11: Estabilidad de la emulsión

La estabilidad de las emulsiones con un 2% de EPS y una mezcla de agua y cetiol V (1:2; v/v) se evaluó midiendo las variaciones en el backscattering utilizando un Turbiscan Lab Expert (Formulaction), basado en la dispersión multiángulo de luz láser. Debido a la opacidad de las muestras, sólo se utilizaron los perfiles de backscattering (BS) para evaluar la estabilidad físico-química de las emulsiones. Las medidas se llevaron a cabo a  $25^\circ\text{C}$  con la emulsión recién preparada (día 0) y un mes más tarde después de almacenarla a temperatura ambiente (día 30).

La estabilidad de la emulsión del EPS también fue estudiada bajo varias condiciones de temperatura, salinidad y pH. Para las pruebas de estabilidad de pH, se prepararon mezclas con un 2% de EPS, agua con un pH de entre 5 y 9 y cetiol V (1:2; v/v) y se almacenaron a temperatura ambiente. Para las pruebas de estabilidad de temperatura, se prepararon mezclas con un 2% de EPS, agua ajustada a pH 7 y cetiol V (1:2; v/v) y

se almacenaron a temperaturas de entre 4 °C y 42 °C. Finalmente, para los estudios de estabilidad de salinidad, se prepararon emulsiones con un 2% de EPS y mezclas de agua conteniendo hasta 1 M NaCl y cetiol V (1:2; v/v) y también se almacenaron a temperatura ambiente. La estabilidad de las emulsiones fue evaluada durante un período de 4 meses observando cambios en su apariencia macroscópica.

La estabilidad de la emulsión fue evaluada a partir del % BS a días 0 y 30 en muestras almacenadas a temperatura ambiente. Como se puede observar en la FIG 5, los perfiles de la emulsión a días 0 y 30 fueron extremadamente similares, y no se observaron fenómenos de coalescencia, floculación, cremado, o sedimentación, indicando una estabilidad a largo plazo de la emulsión del EPS. Además, las emulsiones permanecieron estables durante más de cuatro meses a pH de entre 5 y 8, temperaturas de 4 °C a 42 °C y concentraciones de NaCl de hasta 1 M.

#### 15 Ejemplo 12: Actividad crioprotectora

Obtención de una cepa mutante no productora de EPS: Se obtuvo una cepa mutante no productora de EPS mediante mutagénesis con luz ultravioleta para evaluar la influencia del EPS en la preservación de las células cuando son sometidas a varias temperaturas de congelación. Para confirmar que la cepa mutante no producía EPS se utilizó una tinción con tetraóxido de rutenio para revelar los polisacáridos alrededor de las células bacterianas. Con este propósito, las células fueron sometidas a fijación química con un 5% de glutaraldehído en tampón cacodilato 0,1 M a pH 7,3 y 4 °C durante un período de una noche. Después de ser lavadas durante 10 min con tampón cacodilato 0,1 M a pH 7,3 cinco veces, las muestras fueron incubadas dos veces con 0.25% de tetraóxido de rutenio y 0.25% de ferrocianida potásica en tampón cacodilato 0.1 M a pH 6.8 durante 1 h en oscuridad a 4 °C. Las muestras se lavaron cinco veces durante 15 min con agua miliQ a 4 °C y mantenidas en cacodilato 0,1 M a pH 6,8 y 4 °C hasta la criofijación por alta presión. Para la criosustitución, se utilizó una solución que contenía: 1% tetraóxido de osmio, 0,5% acetato de uranilo y 3% de glutaraldehído en metanol. La criosustitución empezó a 72h a -90 °C, seguida de un calentamiento hasta 4 °C con una rampa de 5 °C/h, punto en el cual la temperatura se mantuvo durante 4 h. Una vez finalizado el proceso, las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente y en oscuridad a 4 °C. Después fueron lavadas dos veces con metanol durante 2 h y lavadas tres veces con acetona durante 15 min. Finalmente, las muestras fueron infiltradas en Epon: metanol 1:3, 2:2 y 3:1 durante 3 h en cada paso y

embebidas en Epon. Se obtuvieron secciones ultrafinas utilizando el ultramicrotomo UCT (Leica Microsystems), y se tiñeron con un 2% de acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras fueron observadas con un microscopio electrónico de transmisión TEM Tecnai Spirit Twin (FEI) 120Kv. En las células salvajes (wt) de *Pseudomonas* sp. CECT8437, se observó claramente un material polimérico teñido alrededor de las células (FIG 6A), mientras que en las células mutantes no se observó esta capa en absoluto (FIG 6B) confirmando que la cepa mutante no era capaz de producir el EPS.

Ensayos de crioprotección con *Pseudomonas* sp. CECT8437: Se cultivaron las células salvajes (wt) y mutantes (mt) de *Pseudomonas* sp. CECT8437 en placas de Triptona Soja Agar (TSA; Oxoid) a 10 °C durante 5 días para alcanzar un crecimiento confluyente. Se prepararon suspensiones de células wt y mt en una solución Ringer y se ajustaron a una densidad óptica de 0,6 (540 nm). Se prepararon alícuotas de 1 ml y se centrifugaron a 12000 rpm durante 30 min. Los sobrenadantes se descartaron, y los sedimentos celulares se congelaron a -20 °C y -80 °C. Tras una semana, se descongelaron las muestras, y los sedimentos se resuspendieron en 1 ml de solución Ringer. La viabilidad celular se determinó por el método de diluciones seriadas, y la tasa de supervivencia se expresó como el porcentaje de células viables respecto a las células no congeladas (Tabla 1). Queda demostrado que la cepa wt exhibió tasas de supervivencia significativamente más elevadas que la cepa mt en todas las temperaturas ensayadas.

Tabla 1: Tasas de supervivencia de las cepas salvaje y mutante después de congelar las células a -20 °C y -80 °C, expresadas como el porcentaje de células viables respecto a las células no congeladas (n = 8)

|        | Cepa salvaje  | Cepa mutante |
|--------|---------------|--------------|
| -20 °C | 75,19 ± 8,06  | 40,27 ± 5,97 |
| -80°C  | 93,53 ± 12,18 | 49,94 ± 7,43 |

Ensayos de crioprotección con *E.coli*: *Escherichia coli* ATCC 10536 fue cultivada en Caldo de Triptona y Soja (TSB) hasta una densidad óptica de 0,6 (540 nm). Se mezclaron alícuotas de 0,1 ml con diferentes concentraciones del EPS de entre 0% y 10%, hasta un volumen final de 1 ml. Las muestras se congelaron a -20 °C y -80 °C

durante una semana, se descongelaron y se determinó el número de células viables mediante el método de diluciones seriadas. La tasa de supervivencia se expresó como el porcentaje de células viables respecto a las células no congeladas. El suero bovino fetal (SBF) se utilizó como control porque se utiliza como estabilizante de membranas en procedimientos de congelación. Como se muestra en FIG 7 y FIG 8, el EPS también confirió crioprotección a las células de *E.coli*, con una clara relación dosis-respuesta en todas las temperaturas ensayadas y una tasa de supervivencia máxima (35,68% a -20 °C y 64,13% a -80 °C) con una concentración de EPS del 10%, y sin la adición de ningún agente crioprotector que pudiera penetrar en las células, como el dimetilsulfóxido (DMSO) o el glicerol. Esta relación dosis-respuesta no se observó con el SBF, y las tasas de supervivencia obtenidas a cualquier concentración de SBF fueron inferiores al 0,4% y consideradas nulas en los gráficos.

Ejemplo 13. Ultraestructura del material extracelular y EPS de *Pseudomonas* sp. CECT8437 y otras bacterias antárticas adaptadas al frío.

Todas las cepas fueron cultivadas en *trypticase soy agar* (TSA, Oxoid) e incubadas durante 3 días a 15° C. Se seleccionaron colonias bacterianas al azar para el examen por microscopía electrónica de transmisión (MET) seguida de fijación por alta presión y criosustitución (*High-pressure freezing and freeze substitution*, HPF-FS) (libro de texto, páginas 66, 67, capítulo 4.2.4). Se cortaron secciones ultrafinas con un ultramicrotomo Leica UCT y se montaron en rejillas recubiertas de carbón Formvar. Las secciones fueron teñidas posteriormente con un 2% (p/v) de acetato de uranilo acuoso y citrato de plomo y examinadas en un microscopio electrónico Tecnai Spirit (FEI Company) a un voltaje de aceleración de 120 kV. Como se muestra en la FIG 9, todos los materiales extracelulares de bacterias antárticas adaptadas al frío que se analizaron, con excepción de *Pseudomonas* sp. CECT8437, aparecieron como una malla en forma de red compuesta de un polímero capsular alrededor de las células y grandes cantidades de vesículas de membrana externa (VMEs, ver flechas).

30

Ejemplo 14: Tests *in vivo* de elasticidad y propiedades dermoprotectoras en seres humanos

Se realizaron tests con eficacia de 0.2%, 1% y 5% de EPS sobre voluntarios humanos entre 24 y 64 años, durante 9 días.

35

A todos los voluntarios se les instruyó para evitar el uso de ningún producto tópico sobre el antebrazo derecho durante las 48 h previas al experimento. Para obtener medidas fiables, los voluntarios se aclimataron durante 15 min en una sala climatizada, 23 °C y 50% de humedad relativa, antes de realizar los ensayos.

5

Para estudiar el efecto del EPS sobre las propiedades de la piel, se delimitaron cinco áreas de 4 cm<sup>2</sup> en el antebrazo derecho de cada voluntario: cuatro áreas para aplicaciones tópicas de las formulaciones (tres concentraciones diferentes de EPS y del placebo) y un área no tratada como control. En el día 0, se midieron la elasticidad y la pérdida transepidérmica de agua (*transepidermal water loss*, TEWL) en cada área. Después, se aplicaron 20 µl de cada muestra diariamente durante 7 días. Se midió la TEWL por triplicado en los días 2, 4 y 9, midiendo la elasticidad por triplicado en los días 0 y 9.

10

15 La elasticidad de la piel se evaluó con un dispositivo Cutometer® SEM 575 (Courage & Khazaka). Los voluntarios tratados con 0,2% de EPS mostraron un incremento del 13.28% en elasticidad de la piel comparados con aquéllos tratados con el placebo (FIG 10).

20 El efecto dermoprotector del EPS también se evaluó. Para ello, tras acabar todas las medidas cutáneas, todas las áreas previamente tratadas se pusieron en contacto con un 2% del tensioactivo laurilsulfato sódico (LSS) durante 2 h, y se evaluó la TEWL 2h 30 min después de la exposición al LSS.

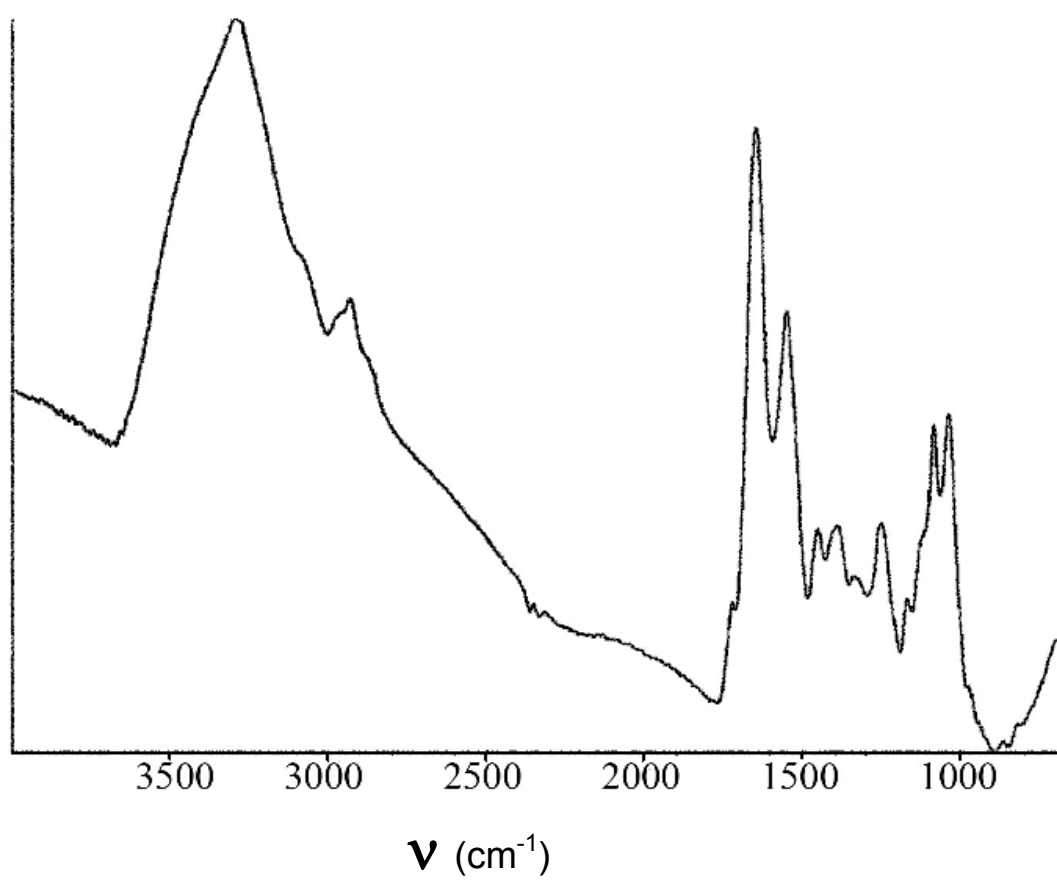
25 Con el fin de evaluar la función protectora de piel, se usó un dispositivo Tewameter® TM 300 (Courage & Khazaka) para medir la TEWL. Los voluntarios tratados con 1% de EPS mostraron un porcentaje más bajo de TEWL (154.28%) tras la aplicación del agente irritante LSS, en comparación con los tratados con el placebo (181.83%; FIG 11). Esto muestra que el EPS es un agente dermoprotector que fortalece la piel contra  
30 agresiones externas.

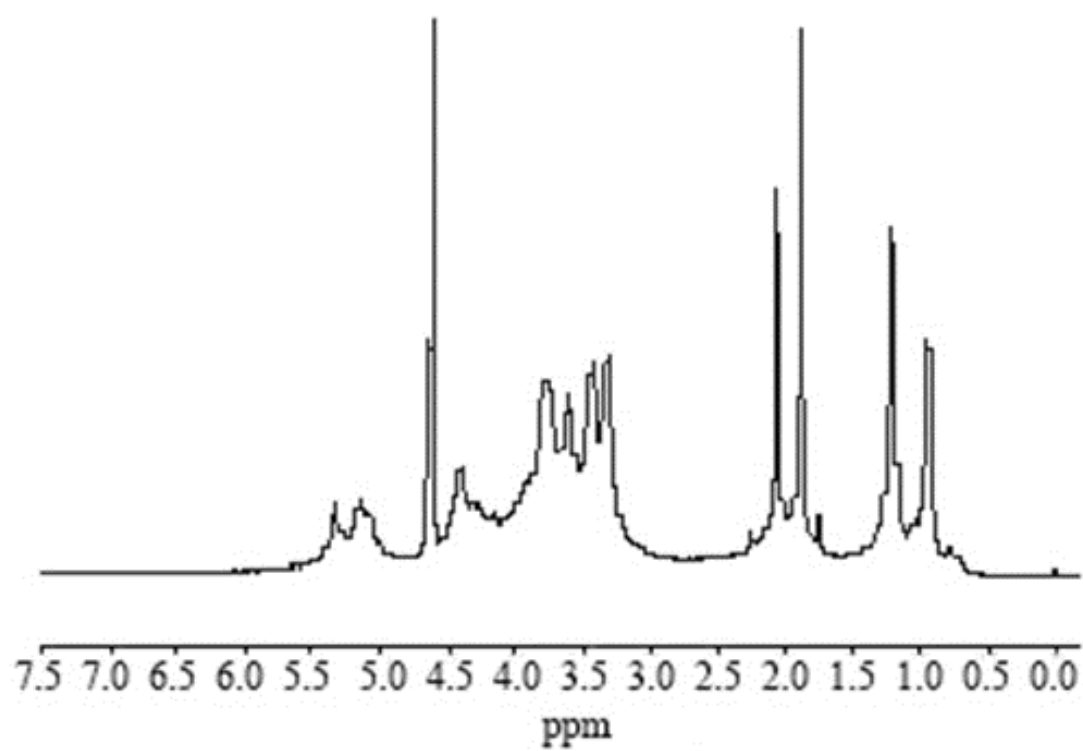
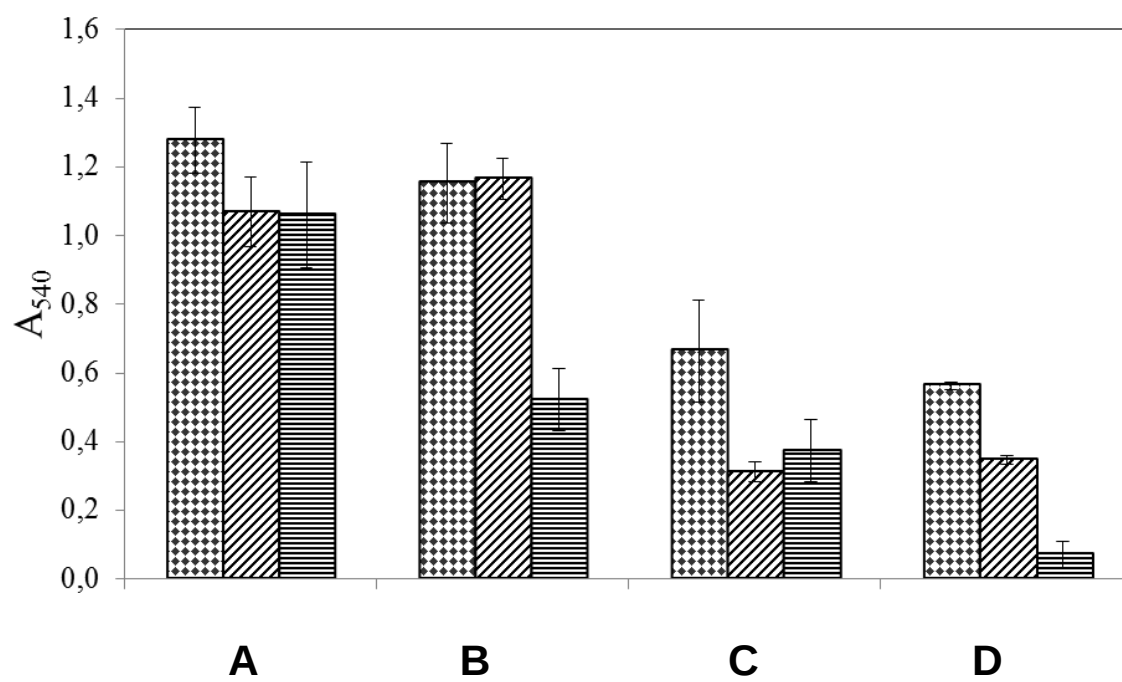
## REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Pseudomonas* sp. con número de depósito CECT 8437.
- 5 2. Un exopolisacárido aislado de un cultivo de *Pseudomonas* sp. con número de depósito CECT8437.
3. El exopolisacárido según la reivindicación 2, que comprende glucosa, galactosa, fucosa y ácido urónico en una relación molar de 2:1:1:0,3 aproximadamente.
- 10 4. El exopolisacárido según cualquiera de las reivindicaciones 2-3, que comprende los siguientes porcentajes en peso, aproximadamente: 37,29% C, 6,17% H, 2,25% N y 0,41% S.
- 15 5. El exopolisacárido según cualquiera de las reivindicaciones 2-4, con un espectro de infrarrojo transformado de Fourier que comprende, en  $\text{cm}^{-1}$ : una banda a 3400, un pico a 2930, un pico a 2985, una banda entre 1200 y 900, una banda a 1720, un pico a 1640 y un pico a 1540.
- 20 6. Uso del exopolisacárido definido en cualquiera de las reivindicaciones 2-5, como agente crioprotector.
7. Uso del exopolisacárido definido en cualquiera de las reivindicaciones 2-5, como agente emulsionante.
- 25 8. Uso del exopolisacárido definido en cualquiera de las reivindicaciones 2-5, como agente espesante, estabilizante o texturizante.
9. Uso del exopolisacárido definido en cualquiera de las reivindicaciones 2-5, como agente dermoprotector.
- 30 10. Uso del exopolisacárido definido en cualquiera de las reivindicaciones 2-5, para aumentar la elasticidad de la piel.

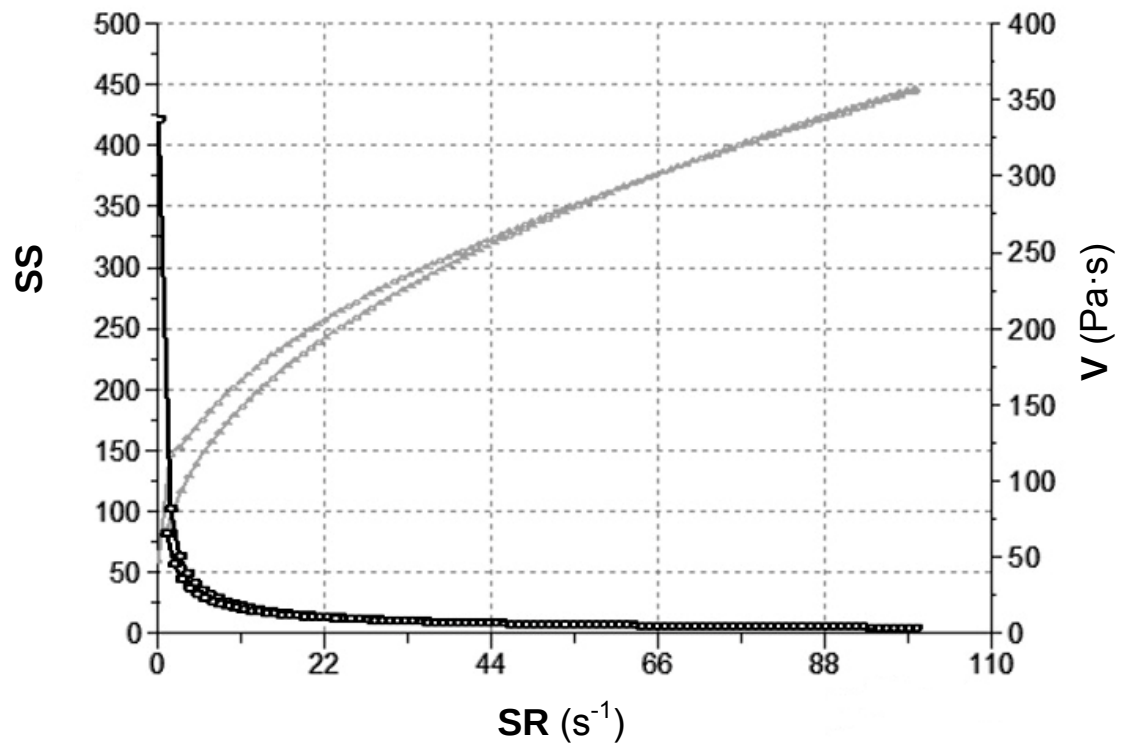
11. Una composición cosmética que comprende una cantidad cosméticamente efectiva del exopolisacárido definido en cualquiera de las reivindicaciones 2-5, e ingredientes o portadores cosméticamente aceptables.
- 5 12. Un producto hidrolizado obtenido por hidrolización del exopolisacárido definido en cualquiera de las reivindicaciones 2-5, siendo la hidrolización química y/o mecánica y/o enzimática.
- 10 13. El producto hidrolizado según la reivindicación 12, donde la hidrolización es química.
14. El producto hidrolizado según la reivindicación 13, donde la hidrolización química se lleva a cabo por tratamiento con un ácido.
- 15 15. El producto hidrolizado según la reivindicación 14, donde el ácido se selecciona del grupo que consiste en ácido sulfúrico, ácido clorhídrico y ácido trifluoroacético.

**FIG 1**

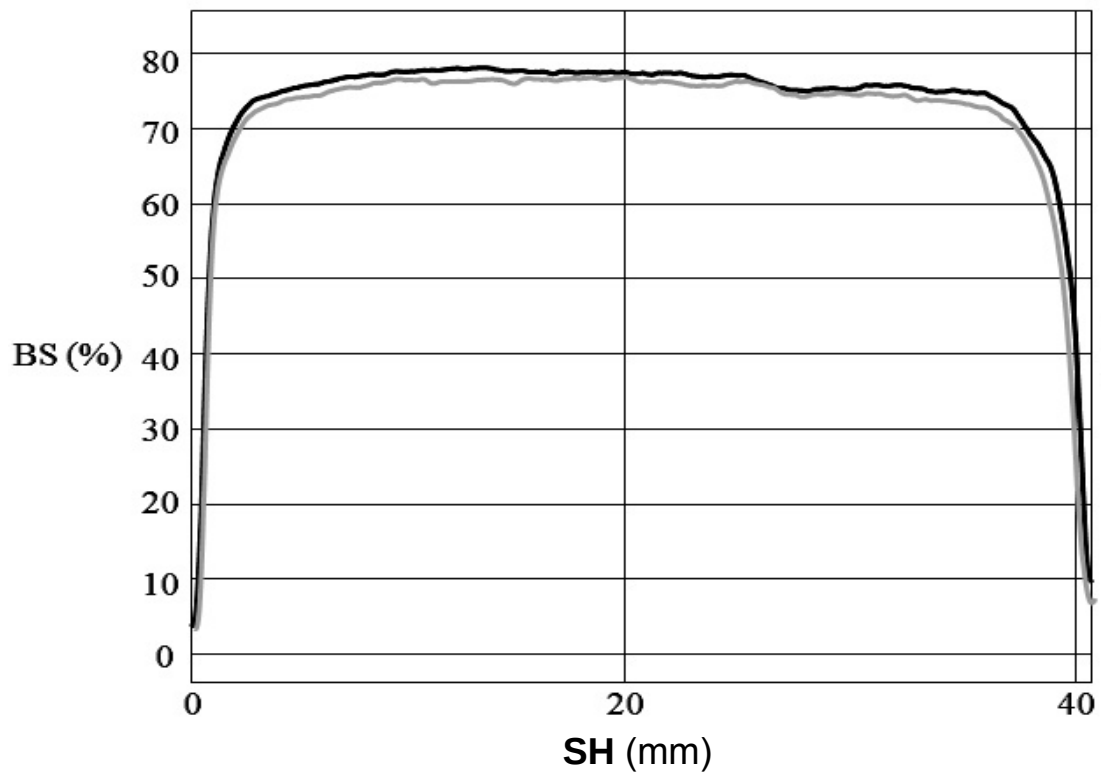


**FIG 2****FIG 3**

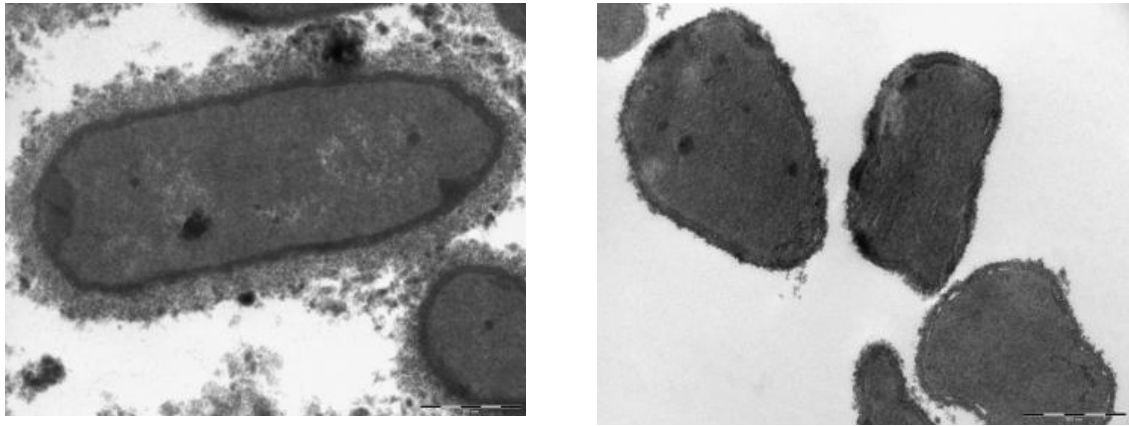
**FIG 4**



**FIG 5**



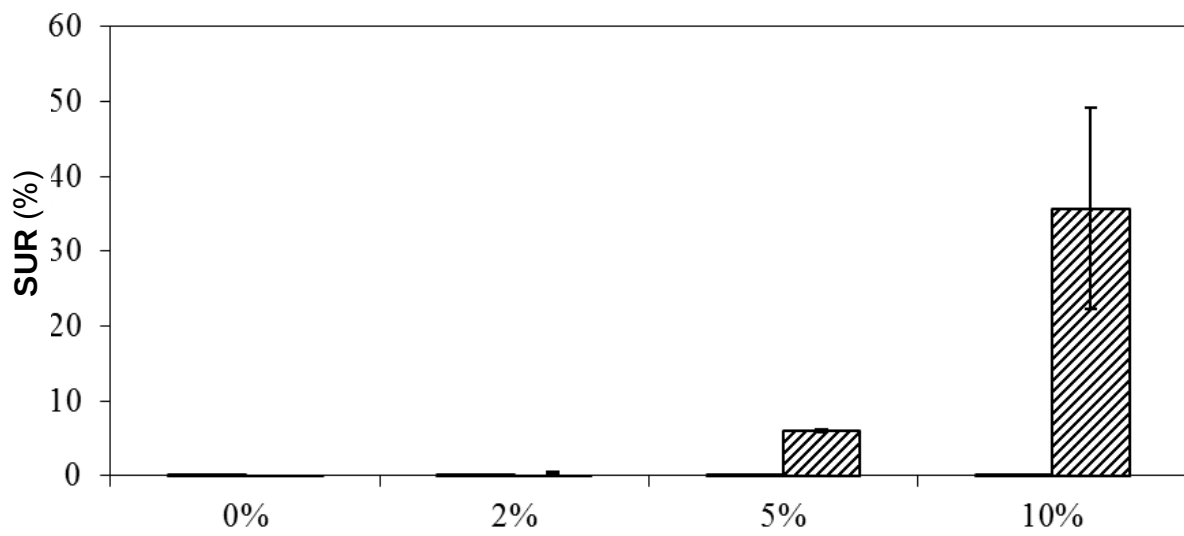
**FIG 6**

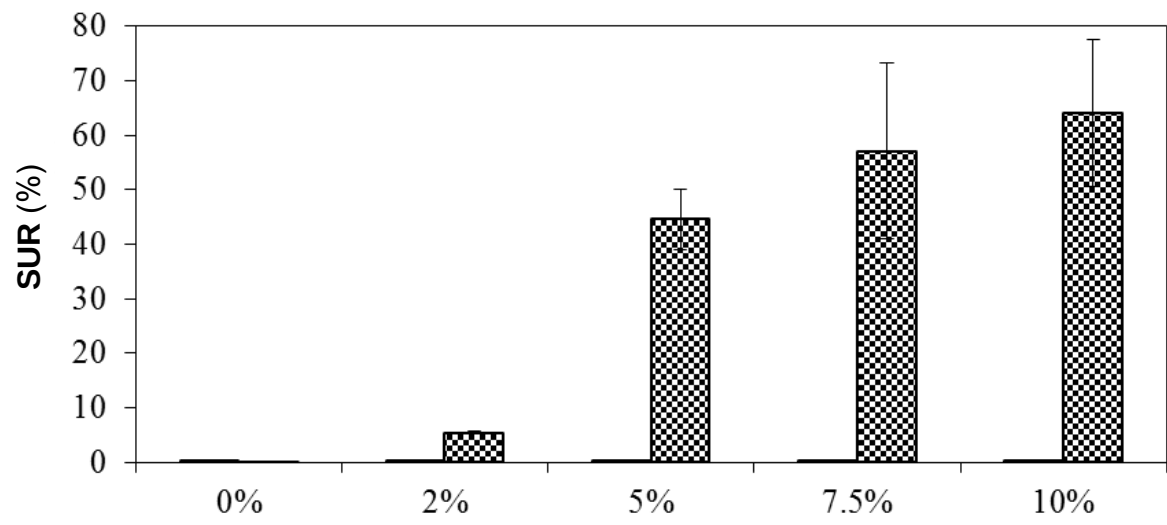


**A**

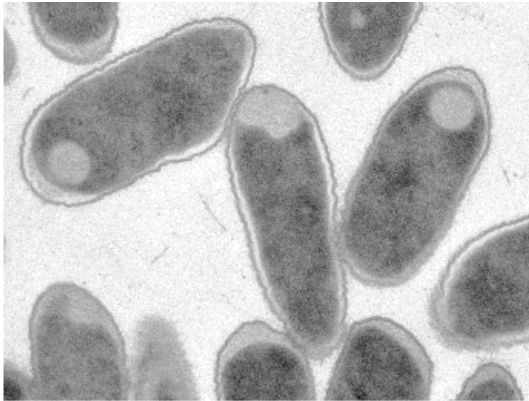
**B**

**FIG 7**

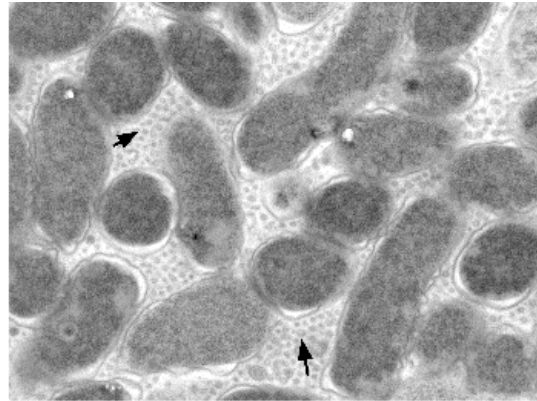


**FIG 8**

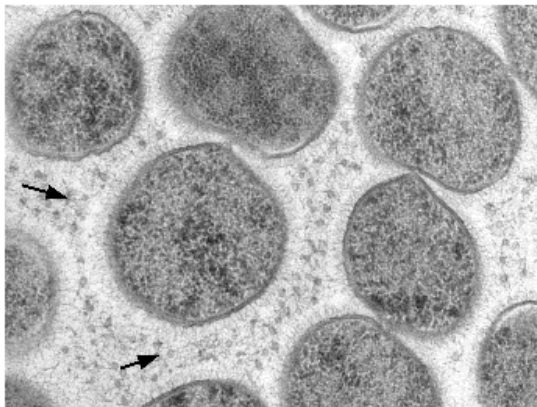
**FIG 9**



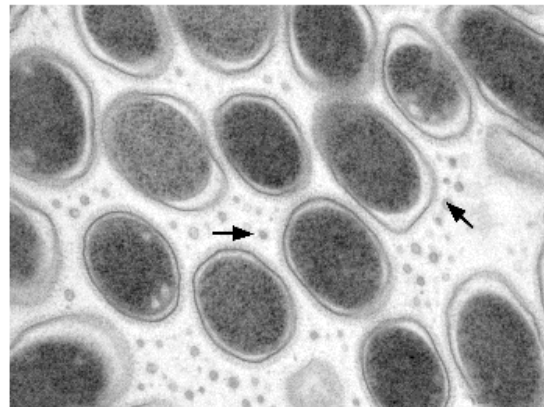
**A**



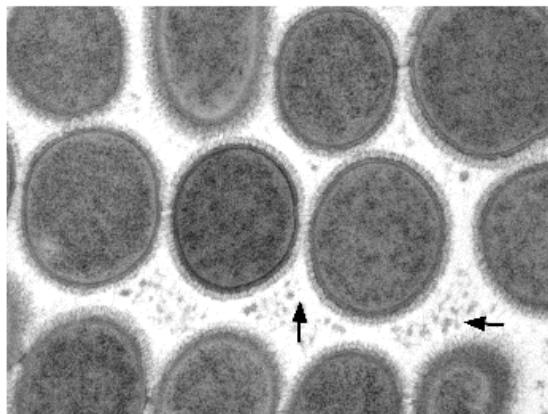
**B**



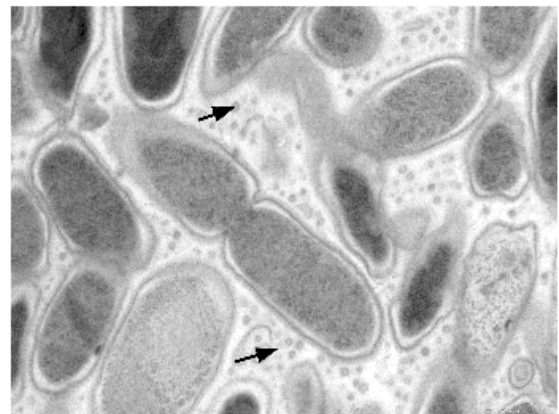
**C**



**D**

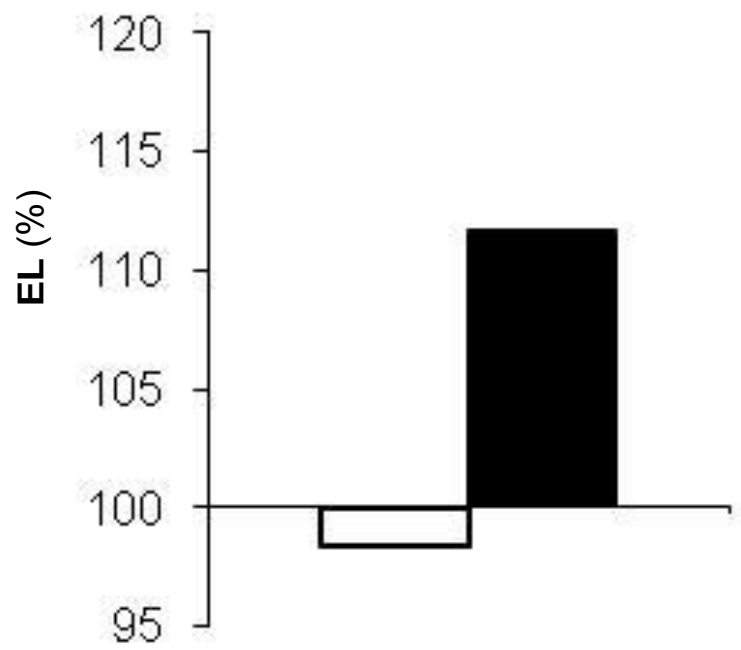


**E**

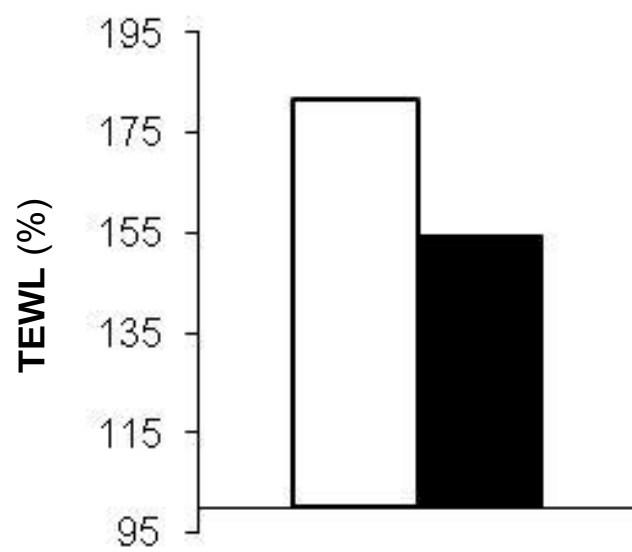


**F**

**FIG 10**



**FIG 11**





- ②① N.º solicitud: 201690034  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.02.2015  
③② Fecha de prioridad: **10-02-2014**

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| A         | US 5455343 A (FONTAINE, T. et al.) 03.10.1995, columna 1, líneas 19-26; columna 3, líneas 45-54; columna 4, líneas 30-37, 43-44.                                                                                                                                                                                                         | 1-15                       |
| A         | FREITAS, F. et al. "Emulsifying behaviour and rheological properties of the extracelular polysaccharide produced by Pseudomonas oleovorans grown on glicerol byproduct". CARBOHYDRATE POLYMERS. 15.10.2009. Vol. 78, N.º. 3, páginas 549 - 556; Páginas 552-554.                                                                         | 1-15                       |
| A         | BISHT, S.C. et al. "Cryotolerance strategies of pseudomonads isolated from the rhizosphere of Himalayan plants". SPRINGERPLUS. 12.12.2013. 2: 667, páginas 1-13. [on line]. Recuperado de internet, <a href="http://www.springerplus.com/content/2/1/667">URL:&lt;http://www.springerplus.com/content/2/1/667&gt;</a> , páginas 2-3 y 8. | 1-15                       |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
23.12.2016

Examinador  
M. Novoa Sanjurjo

Página  
1/4

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N1/20** (2006.01)  
**A61K8/73** (2006.01)  
**A61Q19/08** (2006.01)  
**A23L29/269** (2016.01)  
**C12P19/04** (2006.01)  
**C12R1/38** (2006.01)

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

C12N, A61K, A61Q, A23L, C12P, C12R

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

INVENES, EPODOC, BIOSIS, WPI, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.12.2016

#### Declaración

|                                                 |                       |           |
|-------------------------------------------------|-----------------------|-----------|
| <b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>            | Reivindicaciones 1-15 | <b>SI</b> |
|                                                 | Reivindicaciones      | <b>NO</b> |
| <b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b> | Reivindicaciones 1-15 | <b>SI</b> |
|                                                 | Reivindicaciones      | <b>NO</b> |

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

#### Base de la Opinión.-

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

#### Consideraciones:

La presente solicitud tiene por objeto una cepa de *Pseudomonas* CECT8437 productora de un exopolisacárido EPS, que presenta propiedades crioprotectoras, emulsionantes, espesantes, estabilizantes y texturizantes. El EPS, se utiliza en productos cosméticos.

**1. Documentos considerados.-**

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

| Documento | Número Publicación o Identificación                                                                                                                                                                                                                                                                            | Fecha Publicación |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| D01       | US 5455343 A (FONTAINE, T. et al.)                                                                                                                                                                                                                                                                             | 03.10.1995        |
| D02       | FREITAS, F. et al. "Emulsifying behaviour and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by <i>Pseudomonas oleovorans</i> grown on glicerol byproduct". CARBOHYDRATE POLYMERS. 15.10.2009. Vol. 78, N°. 3, páginas 549 - 556.                                                         | 15.10.2009        |
| D03       | BISHT, S.C. et al. "Cryotolerance strategies of pseudomonads isolated from the rhizosphere of Himalayan plants". SPRINGERPLUS. 12.12.2013. 2: 667, páginas 1-13. [on line]. Recuperado de internet, < <a href="http://www.springerplus.com/content/2/1/667">http://www.springerplus.com/content/2/1/667</a> >. | 12.12.2013        |

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

Ninguno de los documentos del estado de la técnica citados en el informe, anticipa la cepa de *Pseudomonas* de la invención ni el EPS producido por la misma. Se considera que las reivindicaciones 1-15, cumplen el requisito de novedad del Art. 6 de la Ley de Patentes 11/1986.

**ACTIVIDAD INVENTIVA**

La presenta solicitud, describe por primera vez un EPS obtenido a partir de la cepa de *Pseudomonas* CECT 8437, que además de tener propiedades crioprotectoras, emulsionantes, espesantes, estabilizantes y texturizantes, está libre de proteínas. El documento citado como D01, describe un EPS producido por una cepa de *Pseudomonas* sp. que comprende en su estructura glucosa, galactosa, fucosa y un ácido urónico en una relación molar 2:1:1:1 (columna 3, líneas 45-54) y se diferencia del EPS de la invención en que en éste, la relación es 2:1:1:0.3 y actúa también como espesante. El documento D02, hace referencia a un EPS producido por *P. oleovorans* que posee capacidad espesante y emulsionante aunque ésta, no es equiparable a la del EPS de la invención porque el EPS descrito en D02, solamente emulsiona de forma estable, algunos aceites vegetales como maíz o girasol. En el documento D03, se relaciona la producción de EPS en cepas de *Pseudomonas* con la capacidad de dichas cepas para sobrevivir a la congelación. En ninguno de los documentos citados, se menciona que el EPS pueda encontrarse libre de proteínas.

Se considera que el hallazgo de una cepa de *Pseudomonas* sp. que produce un EPS con las características del de la invención, supone un avance inventivo respecto a lo descrito previamente en el estado de la técnica. Las reivindicaciones 1-15, cumplen el requisito de actividad inventiva del Art. 8 de la Ley de Patentes 11/1986.