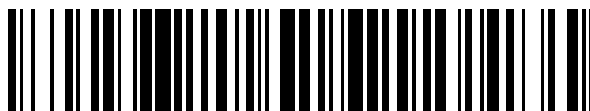


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 286**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

C07H 11/00 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

C12R 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2009 PCT/FR2009/052671**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.07.2010 WO10072977**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2009 E 09806101 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2376621**

54 Título: **Cepa bacteriana y mezcla bacteriana con actividad fucanólica**

30 Prioridad:

23.12.2008 FR 0859041

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.12.2018

73 Titular/es:

**CENTRE ETUDE VALORISATION ALGUES
(33.3%)**

**L'Armor, Lieu Dit Presqu'île de Pen-Lan
22610 Pleubian, FR;**

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%) y**

UNIVERSITE D'EVRY VAL D'ESSONNE (33.3%)

72 Inventor/es:

**DANIEL, RÉGIS;
GORNARD, SOPHIE;
HEMON, ERVEN;
LOGNONE, VINCENT y
MARFAING, HÉLÈNE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 693 286 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

Cepa bacteriana y mezcla bacteriana con actividad fucanolítica

La presente invención se refiere a una cepa bacteriana productora de enzimas con actividad fucanolítica, una mezcla bacteriana que comprende dicha cepa, la utilización de dicha cepa o de una mezcla bacteriana que la comprende para la producción de enzimas con actividad fucanolítica, las enzimas obtenidas por el cultivo de dicha cepa, un procedimiento de despolimerización del fucano empleando dicha cepa o una mezcla bacteriana que la comprende o las enzimas obtenidas y los fragmentos de fucano obtenidos mediante este procedimiento.

Descripción de la técnica anterior

El fucano es un polisacárido de alto peso molecular a base de L-fucosa constitutivo de la pared de las algas pardas. Los polisacáridos procedentes de las algas tienen numerosas aplicaciones, concretamente a modo de espesantes, gelificantes, estabilizantes, formadores de película, intercambiadores de iones o hidratantes. Se han estudiado diversas actividades biológicas del fucano y de sus fracciones de menor peso molecular. El fucano es conocido, de este modo, por sus actividades biológicas análogas a las de polisacáridos sulfatados de origen animal como heparina y sulfato de condroitina. Esta propiedad abre el camino a aplicaciones de alto valor añadido concretamente en el campo terapéutico (anticoagulante; antitrombótico; citostático; antiviral; bloqueo de las respuestas inmunitarias, enfermedad de Alzheimer). En Asia, cierto número de estudios ha mostrado el interés de integrarlos en el régimen alimentario.

Para beneficiarse de las propiedades intrínsecas del fucano de manera industrial, las investigaciones actuales se refieren a la producción de moléculas que derivan del fucano y que presentan características estructurales definidas y los más reproducibles posible. Estos estudios buscan también mantener, incluso aumentar, la eficacia del compuesto natural de partida. Además, el peso molecular elevado del fucano puede ser disuasorio para el desarrollo de un principio activo farmacéutico, concretamente a causa de una característica inmunógena potencial o de su difusión limitada. Este proceso necesita herramientas de despolimerización específicas y eficaces. La respuesta es aportada por enzimas que permitirán producir específicamente oligosacáridos del fucano u oligofucanos.

Se ha descrito, en la solicitud de patente WO 00/17215 de los laboratorios Goëmar, una cepa bacteriana llamada SW5 productora de endofucanasas, proviniendo dicha cepa de lodos industriales procedentes de efluentes ricos en fucano sulfatado producidos por una planta de extracción de alginatos. Dicha cepa pertenece a la familia Flavobacteriaceae y produce una actividad fucanolítica extracelular. La actividad endofucanasa permite hidrolizar aleatoriamente los enlaces glucosídicos del fucano de *Pelvetia canaliculata* y producir oligosacáridos. No se ha dado ninguna indicación precisa sobre la distribución en tamaño de los productos obtenidos, sin embargo los cromatogramas que se muestran indican una población de productos heterogéneos. En un artículo de los mismos autores (V. Descamps et al., «Isolation and culture of a marine bacterium degrading the sulfated from marine brown algae», Marine Biotechnology vol 8, págs. 27-39, 2006), una baja actividad fucanolítica viene dada por esta cepa. No es posible, según los autores, evaluar la producción de oligosacáridos mediante el ensayo de los azúcares reductores bien conocido por el experto en la técnica. En su lugar, se realiza un análisis por electroforesis en gel (C-PAGE), esto permite demostrar la aparición de oligosacáridos de manera cualitativa. Por último, en este estudio se ha tenido en cuenta un solo tipo de fucano, el extraído del alga *Pelvetia canaliculata* que pertenece a la familia de las fucales. Ahora bien, existen otras familias de algas pardas, concretamente la de las laminariales cuyos fucanos presentan características estructurales diferentes de las de los fucanos de fucales (Fucoïdanes - sulfated polysaccharides of brown algae 2009 Russ. Chem. Rev. 78 785-799). Una de las principales diferencias es la configuración de los enlaces osídicos que presentan una alternancia de enlaces $\alpha(1-3)$ y $\alpha(1-4)$ en los fucanos de fucales, y la repetición de un solo tipo de enlace osídico $\alpha(1-3)$ en los fucanos de laminarias. Esta diferencia es importante de tener en cuenta ya que estos enlaces osídicos son los sitios de acción de las actividades enzimáticas de despolimerización de tipo fucanolítica.

En este contexto, los inventores han podido demostrar la degradación del fucano que pertenece a las dos familias fucales y laminariales, y en particular el fucano de *Ascophyllum nodosum* y el fucano de *Laminaria digitata*, mediante una mezcla bacteriana procedente de la flora natural del alga parda *Ascophyllum nodosum*. Esta degradación del fucano se demostró durante el cultivo de esta mezcla bacteriana e indica un nivel de actividad fucanolítica muy elevado. En la presente invención, consumos cuantitativos (> 50 % en peso) de fucano presente a la concentración de 5 g/l se demuestran por HPLC y por la medida de los azúcares reductores. La mezcla bacteriana descrita posee, por lo tanto, una acción fucanolítica capaz de ejercerse sobre los diferentes tipos estructurales de fucanos.

Los inventores han podido aislar, de este modo, a partir de esta mezcla bacteriana, una cepa bacteriana cuya caracterización taxonómica indica que se trata de un nuevo miembro de la familia de las Flavobacteriaceae. Dicha cepa permite degradar también el fucano produciendo oligofucanos con un nivel de actividad elevado.

Compendio de la invención

La presente invención tiene, por lo tanto, por objeto proponer una nueva vía de despolimerización microbiológica del fucano utilizando una fuente enzimática renovable y utilizable en la industria.

Por tal motivo, la presente invención proporciona una nueva cepa bacteriana productora de enzimas con actividad fucanolítica de la familia de las Flavobacteriaceae.

5 La invención propone también una mezcla bacteriana que comprende dicha cepa, la utilización de dicha cepa o de una mezcla bacteriana que la comprenda para la producción de enzimas con actividad fucanolítica, el material enzimático obtenido por el cultivo de dicha cepa.

La invención también tiene por objeto un procedimiento de preparación de oligofucanos, que comprende la puesta en contacto del fucano con dicha cepa, una mezcla bacteriana que la comprende o el material enzimático obtenido por el cultivo de dicha cepa.

La invención describe los fragmentos del fucano (u oligofucanos) obtenidos mediante este procedimiento.

10 La presente invención divulga también como objeto un procedimiento de preparación de un material enzimático dotado de actividad fucanolítica extracelular por extracción del sobrenadante de cultivo de dicha cepa bacteriana. El material proteico obtenido de este modo puede emplearse para la producción *in vitro* de oligofucanos (sulfatados), independientemente de cualquier cultivo bacteriano.

Descripción de las figuras

15 Figura 1: crecimiento de la mezcla bacteriana cultivada en fermentador (DO 600 nm) y actividad fucanolítica medida por HPLC-ES durante el cultivo con fucano (A) de fucales (*Ascophyllum nodosum*) y (B) de laminariales (*Laminaria digitata*)

Figura 2: crecimiento de la cepa B1 cultivada en medio Zobell (DO 600 nm) y actividad fucanolítica medida por HPLC-ES (nRIU) durante el cultivo

20 Figura 3: seguimiento de la despolimerización del fucano *in vitro* catalizada por un extracto enzimático procedente del sobrenadante de cultivo de la mezcla bacteriana según la invención

Figura 4: producción de extremos reductores durante la despolimerización del fucano *in vitro* catalizada por un extracto enzimático procedente del sobrenadante de cultivo de la mezcla bacteriana según la invención

25 Figura 5: seguimiento por HPLC-ES de la despolimerización del fucano *in vitro* catalizada por un extracto enzimático procedente del sobrenadante de cultivo de la cepa B1 según la invención (control sin enzima, ensayo con enzima)

Figura 6: espectro de masa de la fracción oligosacáridica procedente del medio de cultivo de la mezcla bacteriana y purificada por ultrafiltración según la invención

Figura 7: posición fenética de la cepa B1

Descripción detallada de la invención

30 El objeto de la presente invención es tal como se define en las reivindicaciones 1 a 5.

La presente invención se refiere, por lo tanto, a una nueva cepa bacteriana productora de enzimas con actividad fucanolítica de la familia de las Flavobacteriaceae.

35 Esta cepa procede en particular de la flora natural del alga parda *Ascophyllum nodosum*. Se aísla más particularmente de una mezcla bacteriana recogida a partir de la flora natural del alga parda *Ascophyllum nodosum*. Más particularmente, para preparar una mezcla bacteriana que contiene dicha cepa bacteriana, se realiza un cultivo añadiendo trozos cortados (finamente) del alga parda *Ascophyllum nodosum* a un medio selectivo. El medio selectivo comprende más particularmente un extracto de cieno, sales minerales, preferiblemente NaCl (30 g/l), K₂HPO₄ (2 g/l), MgSO₄ 7H₂O (1 g/l), NaNO₃ (1 g/l), FeCl₂ (0,1 g/l), y fucano, este último siendo preferiblemente procedente de *Ascophyllum nodosum* o de *Laminaria digitata* (más específicamente a una concentración de 5 g/l).

40 Que este medio pobre comprenda fucano permite ejercer una presión de selección y seleccionar los microorganismos capaces de metabolizar el fucano.

45 El aislamiento de la cepa a partir de la mezcla bacteriana puede realizarse mediante diversos métodos. De este modo, es posible extender dicha mezcla sobre medio sólido según el método de las estrías. El medio selectivo sólido de la misma composición que el medio selectivo líquido contiene además un 3,6 % de Agar para permitir la gelificación. Se incuba la mezcla sembrada de este modo durante varios días, incluso varias semanas y, más específicamente, durante tres semanas, preferiblemente a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C). Las colonias que aparecen son muy numerosas y confluentes a partir de las estrías, y a continuación se distancian cada vez más entre sí a lo largo de la estría, para aparecer individualizadas en el extremo de la estría.

50 Las colonias bacterianas bien individualizadas se identifican y se distinguen según su aspecto morfológico. Cada una de ellas se trasplanta a continuación y se cultiva en medio selectivo líquido durante varios días, más generalmente durante una semana, preferiblemente a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C). Al finalizar

este cultivo, las cepas pueden trasplantarse de nuevo según el método de las estrías descrito anteriormente para verificar la presencia de un solo tipo de morfología. Llegado el caso, este procedimiento de aislamiento se repite a partir de estos medios sólidos. Las cepas aisladas fucanolíticas y, más particularmente, la cepa aislada B1 se seleccionan a continuación sobre la base de la medida de la actividad fucanolítica determinada por la medida por HPLC-ES de la desaparición del fucano presente en medio de cultivo.

Para obtener una biomasa importante, la cepa B1 aislada y seleccionada de este modo se cultiva en lo sucesivo ventajosamente en medio rico referenciado con el nombre de medio Zobell conocido por el experto en la técnica. El medio de tipo Zobell adicionado con fucano, preferiblemente procedente de *Ascophyllum nodosum* y/o de *Laminaria digitata* (a una concentración de 5 g/l), comprende ventajosamente agua de mar filtrada (filtro 0,22 µm, esterilización), un extracto de levadura, peptona péptica de carne y agua osmotizada. La composición del medio Zobell es, más específicamente, como sigue:

peptona péptica de carne 5,0 g
 Extracto de levadura 1,0 g
 Agua de mar filtrada 900 ml
 Agua osmotizada c.s.p. 11

La cepa bacteriana B1 seleccionada y aislada de este modo se depositó el 03/09/2008 con el número I-4070 en la colección del Instituto Pasteur cuya dirección es la siguiente: 25, rue du Docteur Roux, F-75724 París CEDEX 154

Las características de la bacteria obtenida de este modo son las siguientes: forma colonias redondas de color amarillo con contornos lisos. La bacteria según la invención es un bacilo de tipo Gram negativo cuyo tamaño está comprendido entre 1,0 y 1,4 µm. Otras características fisiológicas y biológicas de la cepa aislada se presentan en las tablas 1 y 2 a continuación.

Tabla 1

Características fisiológicas de la bacteria aislada

Caracteres positivos	Caracteres negativos
β glucosidasa	Reducción nitratos - nitritos
proteasa	Reducción nitratos-nitrógeno
citocromo oxidasa	Formación de indol
fosfatasa alcalina	arginina dihidrolasa
fosfatasa ácida	Ureasa
esterasa (C4)	β galactosidasa
esterasa lipasa (C8)	lipasa (C14)
leucina arilamidasa	Cistina arilamidasa
valina arilamidasa	α quimotripsina
tripsina	α galactosidasa
Naftol-AB-BI-fosfohidrolasa	β galactosidasa
α glucosidasa	β glucuronidasa
β glucosidasa	α manosidasa
N-acetil-β-glucosaminidasa	
α fucosidasa	

Tabla 2

Características biológicas de la cepa aislada		
Caracteres positivos	Caracteres negativos	Caracteres negativos
glicerol: asimilación del sustrato/oxidación	caprato	salicina
eritritol: fermentación	adipato	celobiosa
D-arabinosa: oxidación/fermentación	malato	lactosa
D-xilosa: asimilación del sustrato/oxidación/fermentación	citrato	melibiosa
D-glucosa: asimilación del sustrato/oxidación/fermentación	fenil-acetato	sacarosa
D-fructosa: asimilación del sustrato/oxidación/fermentación	L-arabinosa	trehalosa
D-manosa: asimilación del sustrato/oxidación/fermentación	ribosa	inulina
Manitol: asimilación del sustrato/oxidación/fermentación	L-xilosa	melezitosa
N-acetil glucosamina: oxidación/fermentación	adonitol	D-rafinosa
amigdalina: fermentación	β metil-xilósido	xilitol
esculina: oxidación/fermentación	galactosa	D turanosa
maltosa: asimilación del sustrato/oxidación/fermentación	L-sorbosa	D lixosa
almidón: asimilación del sustrato/fermentación	Ramnosa	D tagatosa
glucógeno: fermentación	Dulcitol	D-fucosa
β gentobiosa: fermentación	Inositol	D arabitol
L fucosa	sorbitol	L arabitol
	α metil-D-manósido	Gluconato
	α metil-D-glucósido	2 ceto-gluconato
	arbutina	5 cetogluconato

5 La secuenciación del ARN 16S define esta cepa como una nueva especie que pertenece al grupo Cytophaga-Flavobacterium (familia de las Flavobacteriaceae). Las secuencias de ADN SEQ ID N° 1 y/o SEQ ID N° 2 corresponden a copias de ADN características del ARN16s.

Como se ha especificado anteriormente, la cepa bacteriana según la invención procede de una mezcla bacteriana recogida a partir de la flora de los talos de *Ascophyllum nodosum*.

La presente invención también tiene por objeto la mezcla bacteriana que comprende la bacteria descrita anteriormente y procedente del alga parda *Ascophyllum nodosum*.

10 Más particularmente, para preparar dicha mezcla bacteriana, se realiza un cultivo añadiendo trozos cortados del alga parda *Ascophyllum nodosum* a un medio selectivo. El medio selectivo comprende, más particularmente, un extracto de cieno enriquecido en sales minerales, preferiblemente NaCl (30 g/l), K₂HPO₄ (2 g/l), MgSO₄ 7H₂O (1 g/l), NaNO₃ (1 g/l), FeCl₂ (0,1 g/l), y fucano, siendo este último preferiblemente procedente de *Ascophyllum nodosum* o de *Laminaria digitata* (más específicamente a una concentración de 5 g/l). Este medio pobre permite ejercer una
15 presión de selección y favorecer el desarrollo de los microorganismos capaces de metabolizar el fucano.

La presente invención también tiene por objeto el material enzimático obtenido a partir de la cepa bacteriana según la invención.

20 En particular, el material enzimático se obtiene a partir del sobrenadante de cultivo de dicha cepa. Más específicamente, el medio de cultivo, en particular el medio selectivo, se centrifuga, concretamente para retirar el material biológico de las bacterias (cepa bacteriana,...). El sobrenadante obtenido se satura, en particular por precipitación fraccionada, con ayuda de sulfato de amonio, en particular al 80 % de saturación. El sedimento proteico

se recupera entonces, preferiblemente por centrifugación, y a continuación se disuelve en un tampón (p. ej., tampón A Tris-HCl (50 mM), NaCl (50 mM) a pH 7,5), y se conserva a 4 °C.

5 La presente invención describe la utilización de dicha cepa o de dicha mezcla bacteriana para la producción de materiales enzimáticos con actividad fucanolítica. La invención divulga un método de preparación de material enzimático con actividad fucanolítica que comprende el cultivo de dicha cepa, la recuperación del sobrenadante de cultivo y la extracción de las proteínas contenidas en el sobrenadante.

10 La invención también tiene por objeto un procedimiento de preparación de oligofucanos, que comprende la puesta en contacto del fucano, siendo este último preferiblemente procedente de *Ascophyllum nodosum* y/o de *Laminaria digitata*, con la cepa, la mezcla bacteriana o el material enzimático, tal como se definen en la presente invención. En un modo particular, el procedimiento comprende el cultivo de dicha cepa o de dicha mezcla bacteriana, la preparación del material enzimático con actividad fucanolítica y la puesta en contacto del fucano con el material enzimático con actividad fucanolítica.

15 El sustrato, a saber el fucano, proviene de dos únicas fuentes conocidas hoy en día. El fucano es un polisacárido sulfatado que entra en la constitución de las paredes celulares de los talos de algas pardas (Feofíceas). También están presentes en ciertos animales marinos, como el erizo de mar y el pepino de mar.

El fucano, obtenido generalmente por extracción ácida a partir de las paredes celulares de los talos, está constituido por una población heterogénea de moléculas que comprende polímeros de fucosa sulfatados de masa molar media elevada (superior a aproximadamente 50.000 g/mol).

20 En el sentido de la presente invención, el término «fucano» abarca las preparaciones de fucano de peso molecular elevado, y el término «oligofucanos» abarca los fragmentos de fucano de peso molecular menor obtenidos a partir del fucano de peso molecular elevado.

25 Más particularmente, el polisacárido de tipo fucano se selecciona entre el fucano de alto peso molecular (es decir de peso superior a aproximadamente 50.000), y los oligofucanos son fucano de bajo peso molecular (es decir de peso inferior o igual a aproximadamente 50.000, preferiblemente inferior o igual a aproximadamente 10.000 g/mol, y de manera aún más preferida inferior o igual a aproximadamente 5.000 g/mol). En particular, los oligofucanos son fucanos de peso molecular comprendido entre aproximadamente 1.000 y 10.000 g/mol, y preferiblemente entre 1.000 y 5.000 g/mol.

30 La capacidad de la cepa, de la mezcla bacteriana o del material enzimático según la invención para producir oligofucanos se ha demostrado mediante el seguimiento de la despolimerización del fucano de *Ascophyllum nodosum* y/o de *Laminaria digitata* y mediante el aislamiento de oligofucanos analizados por espectrometría de masa.

En el caso de la cepa y de la mezcla bacteriana, esta demostración se ha realizado durante el cultivo en medio con adición de fucano. El análisis de la cantidad de fucano en el medio se ha realizado por cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión estérica (HPLC-ES) así como por dosificación de la cantidad de osas totales.

35 En el caso de la cepa bacteriana según la invención, el análisis HPLC-ES muestra una disminución del pico de fucano procedente de *Ascophyllum nodosum* del 70 % en peso en 25 horas de cultivo de dicha cepa y el 50 % de la cantidad de osas ha desaparecido después de 45 horas de cultivo.

40 La búsqueda de compuestos óxicos en el sobrenadante de cultivo permitió demostrar la presencia de oligosacáridos en el medio de cultivo después de 30 horas de incubación. El análisis por espectrometría de masa de estos oligosacáridos muestra que estos se componen de 1 a 4 fucosas (preferiblemente 1 a 3 sulfatos), con eventualmente la presencia de xilosa. Estos datos muestran que la bacteria aislada a partir del talo del alga *Ascophyllum nodosum* posee los sistemas enzimáticos capaces de degradar el fucano de *Ascophyllum nodosum* y metabolizarlo.

45 Los ensayos de degradación realizados en el fucano de *Ascophyllum nodosum* (peso molecular: 100.000 g/mol) utilizando el material proteico obtenido a partir de la cepa bacteriana muestran una desaparición del fucano de alto peso molecular de aproximadamente el 50 % en peso en 42 h de incubación (medido por HPLC-ES). Este consumo se correlaciona con la aparición de picos cromatográficos que corresponden a compuestos de bajo peso molecular (peso molecular \leq 5.000 Da) de naturaleza oligosacáridica. Se demuestra, de este modo, en el sobrenadante de cultivo la presencia de proteínas que ejercen una actividad fucanolítica, y producidas por la bacteria aislada según la invención.

50 Los ensayos de degradación realizados en el fucano de *Ascophyllum nodosum* y/o de *Laminaria digitata* (100.000 g/mol) utilizando el material proteico obtenido a partir de la mezcla bacteriana muestran una disminución de la señal del fucano de alto peso molecular de aproximadamente el 50 % en peso en 3 h de cultivo (medido por HPLC-ES). Este consumo se correlaciona con la aparición de nuevos picos cromatográficos que corresponden a compuestos de bajo peso molecular definidos como oligosacáridos. El análisis por espectrometría de masa por ionización por electropulverización (ionización negativa) de los oligosacáridos purificados indica la formación de una amplia gama

de oligofucanos de bajo peso molecular durante la reacción enzimática que varía del monosacárido sulfatado al trisacárido disulfatado.

La presente invención describe de este modo los fragmentos del fucano (u oligofucanos) obtenidos según el procedimiento descrito anteriormente.

- 5 Estos fragmentos presentan generalmente grados de polimerización de 1 a 10, preferiblemente de 1 a 5, más específicamente de 2 a 4, unidades de fucosa.

Estos oligofucanos, más particularmente, comprenden o consisten en una fracción de 1 a 10 kD, preferiblemente 1 a 5 kD.

- 10 Estos oligofucanos, más particularmente, comprenden o consisten en oligofucanos que tienen 1 a 4 fucosas y de 1 a 3 sulfatos con eventualmente la presencia de xilosa.

Los ejemplos a continuación se proporcionan para ilustrar la invención y no deben considerarse, en ningún caso, como un límite para el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: mezcla bacteriana y caracterizaciones

- 15 Preparación del medio selectivo

Se procedió a la extracción de 2 kg de cieno con 2 litros de agua destilada a 30 g/l de NaCl durante 1 hora a 40 °C en agitación. Después de la decantación, el sobrenadante (1,3 litros) se filtró sucesivamente en filtros de 50, 1 y 0,5 µm. Se llega a un volumen final de 1,25 litros. Este filtrado se completó con sales minerales, 2,5 g de K₂HPO₄, 1,25 g de NaNO₃, 1,25 g de MgSO₄ 7H₂O, 2,5 ml de una solución de cloruro de hierro II al 2 % y 6,25 g de fucano procedente de *Ascophyllum nodosum* y/o de *Laminaria digitata*. El pH de la solución se ajustó a 7,5 con aproximadamente 3 ml de NaOH 1 N antes de ser esterilizado en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Para obtener un medio sólido, se añadió agar agar al medio a una concentración de 18 g/l.

Preparación de la mezcla bacteriana

25 Algunas ramas de *Ascophyllum nodosum* recogidas de manera estéril en la zona intermareal cercana la Sillon de Talbert en Pleubian (Côtes d'Armor, Francia) se cortaron finamente en una campana de flujo, se colocaron en 100 ml de medio selectivo tal como se ha preparado anteriormente y se incubaron a 25 °C en agitación. Después de 7 días de incubación, 10 ml de la mezcla obtenida de este modo se introdujeron en 100 ml de medio selectivo. Después de 7 días de incubación de este cultivo llamado Exp1 b1, se realizó un ensayo con BSA (Bovine Serum Albumin); este mostró ser positivo (la solución permanece límpida) indicando una degradación del fucano. Se introdujeron 10 ml de Exp1 b1 en 100 ml de medio selectivo tal como se ha preparado anteriormente para dar el cultivo Exp1 b2 que se siguió por HPLC-ES cada 24 horas. El ensayo con BSA se volvió positivo después de 48 horas de incubación. Se conservaron muestras de Exp1 b2 en el congelador (a -80 °C), lo que forma la mezcla bacteriana.

Condiciones de cultivo y actividad

35 Se realizó un precultivo (10 ml) en medio selectivo a partir de una muestra de dicha mezcla bacteriana conservada a -80 °C. Este precultivo se utilizó como inóculo para un cultivo (100 ml) en medio selectivo (que contiene fucano procedente de *Ascophyllum nodosum*) realizado en agitación orbital a 25 °C durante 20 horas. Este cultivo sirvió entonces para sembrar un Erlenmeyer que contenía 1,1 litro de medio selectivo agitado en un agitador orbital (80-100 rpm) a 25 °C durante 30 horas.

40 El crecimiento bacteriano se midió mediante la densidad óptica (DO) del medio a 600 nm. Se observa, de este modo, que la DO del medio pasa de 1,1 a t=0 a aproximadamente 2,3 a t=30 horas (figura 1A).

La actividad fucanolítica (indicada como AI fucano y expresada en nRIU) medida por HPLC-ES muestra una desaparición del pico de fucano procedente de *Ascophyllum nodosum* después de 24 horas de incubación con dicha mezcla bacteriana (figura 1A).

45 Se realizó el mismo experimento en las mismas condiciones con un medio selectivo que contenía fucano procedente de *Laminaria digitata*.

El crecimiento bacteriano se midió mediante la densidad óptica (DO) del medio a 600 nm. Se observa, de este modo, que la DO del medio pasa de 0 a t=0 a aproximadamente 0,7 a t=27 horas (figura 1B).

50 La actividad fucanolítica (indicada como AI fucano y expresada en % de degradación) medida por HPLC-ES muestra una disminución del 46 % del pico de fucano procedente de *Laminaria digitata* después de 24 horas de incubación con dicha mezcla bacteriana (figura 1B).

Ejemplo 2: cepa bacteriana aislada B1 y caracterizaciónAislamiento de la cepa bacteriana B1

5 La mezcla bacteriana obtenida anteriormente se extendió sobre medio sólido en placa de Petri según el método de las estrías. El medio selectivo sólido de igual composición que el medio selectivo líquido contiene además el 3,6 % de Agar. Las placas de Petri sembradas se incubaron durante tres semanas a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C).

10 Las colonias bacterianas bien individualizadas se identificaron y se distinguieron según su aspecto morfológico. Cada una de ellas se trasplantó a continuación y se cultivó en medio selectivo líquido durante una semana, a temperatura ambiente (aproximadamente 22 °C). Al finalizar este cultivo, las cepas se trasplantaron de nuevo según el método de las estrías descrito anteriormente para verificar la presencia de un solo tipo morfológico. Llegado el caso, este procedimiento de aislamiento se repitió a partir de estas placas de Petri. Las bacterias aisladas seleccionadas fueron las que demostraron una actividad fucanólítica determinada por la medida por HPLC-ES de la desaparición del fucano presente en medio de cultivo, y más particularmente la cepa B1.

Cultivo de la cepa B1 en medio Zobell

15 El cultivo de la cepa B1 se realizó en 100 ml de medio Zobell fucano (indicado como ZF) que contenía 5 g/l de fucano de *Ascophyllum nodosum*, 5 g/l de peptona pépsica y 1 g/l de extracto de levadura disuelto en una mezcla de agua de mar filtrada y de agua osmotizada (en una relación volúmica de aproximadamente 9/1) a una temperatura de 24 °C.

20 Para sembrar este cultivo, se empleó un precultivo en 20 ml de medio ZF a partir de una colonia tomada de una placa de Petri. Después de 24 h de incubación, el precultivo de B1 tiene un crecimiento normal y presenta una densidad óptica (DO) cercana a 4. El precultivo se extendió sobre una placa de Petri y no presenta ninguna contaminación.

25 Se utilizaron 10 ml de precultivo para sembrar 100 ml de medio de cultivo ZF. Las primeras tomas se efectuaron después de 9 horas de incubación para evitar la fase de latencia. Para cada cultivo, la DO a 600 nm y la altura del pico de fucano (indicada como Al fucano y expresada en nRIU) por HPLC-ES se midieron y se compararon con las de un cultivo de control sin inóculo. Los resultados se dan en la figura 2.

El crecimiento bacteriano de la cepa B1 alcanza un valor máximo de DO (600 nm) igual a 3,4. El pico de fucano observa una disminución del 65 % en 20 horas de cultivo (figura 2).

Ejemplo 3: material enzimático procedente del medio de cultivo de la mezcla bacteriana y propiedades30 Precipitación de las proteínas del sobrenadante de cultivo

El cultivo de la mezcla bacteriana en medio selectivo se centrifugó a 15.000 g durante 15 minutos a 4 °C para retirar el sedimento bacteriano. El sobrenadante se centrifugó una segunda vez en las mismas condiciones para retirar cualquier rastro de residuos sólidos.

35 Los 960 ml de sobrenadante se saturaron al 80 % con sulfato de amonio, el conjunto se agitó suavemente una noche a 4 °C. La solución saturada se centrifugó a 15.000 g durante 10 minutos a 4 °C para recuperar un sedimento proteico. Este se disolvió en 10 ml de tampón A (Tris HCl 50 mM, NaCl 50 mM pH 7,5) para constituir la solución enzimática que se conservó a 4 °C.

Ensayo enzimático

40 120 mg de fucano de *Ascophyllum nodosum* se disolvieron en 27 ml de tampón A. A la solución polisacáridica se le añadieron 3 ml de solución enzimática. El medio de reacción se agitó en un baño maría a 30 °C. El análisis de la reacción se realizó por HPLC-ES y una medida de las osas reductoras se realizó según el método de Kidby & Davidson (Kidby D. K. and Davidson D.J., 1973, A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range. Anal. Biochem., 55, 321-325).

45 El análisis por HPLC-ES (figura 3) muestra una disminución muy rápida de la altura del pico de fucano en las primeras horas de reacción, que indica una degradación importante del polisacárido. La altura mínima se alcanza después de 24 horas de reacción. Se observa de este modo una desaparición del pico de fucano del 85 %. En paralelo, se destaca el aumento de una señal correspondiente a los productos de reacción procedentes de la degradación del polisacárido cuyas masas moleculares se sitúan entre 3.000 y 5.000 Da (en equivalente de estándares no cargados pululanos). La altura de esta señal se multiplica por 5 después de 24 horas de reacción.

50 El análisis de las osas reductoras muestra un aumento de la cantidad de los extremos reductores en el medio de reacción en función del tiempo (figura 4). Esta observación muestra la presencia de actividad de tipo glucosidasa capaz de escindir el polisacárido y de producir de nuevos extremos reductores.

Ejemplo 4: material enzimático procedente del medio de cultivo de la cepa B1 y propiedadesPrecipitación de las proteínas del sobrenadante de cultivo

5 El cultivo de la cepa B1 en medio selectivo (V=120 ml) se centrifugó durante 15 minutos a 18.335 g y a 4 °C para retirar el sedimento bacteriano. El sobrenadante (120 ml) se filtró a 1,2 µm para retirar cualquier rastro de residuos sólidos. Se saturó al 80 % con sulfato de amonio y el conjunto se agitó suavemente a 4 °C durante una noche. La solución saturada se centrifugó a 12.000 revoluciones por minuto durante 15 minutos a 4 °C para recuperar un precipitado proteico. Este se disolvió en 3 ml de tampón A (Tris HCl 50 mM, NaCl 50 mM, pH 7,5) para constituir la solución enzimática que se conservó a 4 °C.

Ensayo enzimático

10 36 mg de fucano procedente de *Ascophyllum nodosum* se disolvieron en 9 ml de tampón A. A la solución polisacáridica se le añadieron 1,5 ml de solución enzimática. La mezcla se agitó en un baño maría a 27 °C y se analizó regularmente por HPLC-ES. Los resultados se comparan con un control en el que las enzimas se desnaturalizaron previamente con calor (100 °C; 15 minutos). Los resultados se presentan en la figura 5.

15 En el control, se observa una pequeña disminución del pico de fucano de aproximadamente el 15 % durante las 20 primeras horas de reacción. Esto se estabiliza a continuación alrededor de una intensidad de 14.500 nRIU.

En el ensayo, la altura del pico de fucano cae rápidamente en el transcurso de las cuatro primeras horas de incubación y a continuación vira hasta alcanzar el 51 % en 30 horas de reacción.

Las enzimas del sobrenadante de cultivo de B1 en medio Morinaga contienen una actividad fucanolítica que permite degradar el 50 % del fucano en 30 horas de incubación.

20 Ejemplo 5: análisis de los oligosacáridosPurificación de los oligosacáridos

25 Los oligofucanos pueden aislarse a partir de los sobrenadantes de cultivo de dicha mezcla o de cultivo de la cepa aislada B1 o de los medios de reacción enzimáticos. Para ello, se filtraron, y a continuación se fraccionaron por ultrafiltración: en una membrana de umbral de corte 10.000 (o 10 kDa) para retirar todos los compuestos de alta masa (> 15 kDa), a continuación en una membrana de 1 kDa para retirar todos los pequeños compuestos (sal). La fracción indicada como 1-10 kDa restante que contiene los oligosacáridos se purifica por cromatografía de exclusión estérica en columna superdex peptide (GE-Healthcare®) con un eluyente NH₄HCO₃ (0,1M, pH 8) a un caudal de 0,5 ml/minuto. Los compuestos de interés eluidos (oligosacáridos sulfatados) se detectan por refractometría y por conductimetría. Los compuestos aislados se liofilizan y se analizan por espectrometría de masa.

30 Análisis por espectrometría de masa de los oligosacáridos

Los oligosacáridos purificados se caracterizan por espectrometría de masa en tándem por ionización por electropulverización en modo negativo.

35 El análisis de la fracción 1-10 kDa por espectrometría de masa por electropulverización muestra la presencia de oligosacáridos procedentes del fucano que puede constar de 2 a 5 fucosas, de 1 a 3 sulfatos y la presencia minoritaria de osas neutras (figura 6).

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> Centre Etude Valorisation Algues - CNRS - Université d'Evry	
	<120> Cepa bacteriana y mezcla bacteriana con actividad fucanolítica	
	<130> B817PC00	
	<160> 2	
10	<170> PatentIn versió3.3	
	<210> 1	
	<211> 382	
15	<212> DNA	
	<213> Flavobacterium sp.	
	<400> 1	
	tgggaacagc gttatccgga tcttggggtt aagggtccgt aggtggatga ttaagtcaga	60
	gggtgaaatct tgcagctcaa ctgtaaaatt gcctttgata ctggttatct tgagttatta	120
	tgaagtagtt agaatatgta gtgtagcggg gaaatgcata gatattacat agaataccaa	180
	ttgcgaaggc agattactaa taatcaactg aactgatgg acgaaagcgt ggtagcgaa	240
	caggattaga taccctggta gtccacgcgg taaacgatgg ttactagctg ttcggacttc	300
	gggtctgagt gctaagcgaa agtgataagt aaccacctg gggagtacgt tcgcaagaat	360
20	gaaactcaaa ggaattgacg ga	382
	<210> 2	
	<211> 227	
	<212> DNA	
	<213> Flavobacterium sp.	
25	<400> 2	
	gtcgtctcta cttttcggga tagcccagag aatttgatt aatgcctcat agtatataga	60
	aatggcatca tttttatatt aaagatttat cggtaaaaga tgagcatgcg ttctattagt	120
	tagttggtaa ggtaacggct taccaagacc gcgatagata ggggtcctga gagggagatc	180
	ccccacactg gtactgagac acggaccaga ctctacggg aggcaga	227
30		

REIVINDICACIONES

1. Cepa bacteriana depositada el 3 de septiembre de 2008 con el número I-4070 en la colección CNCM.
2. Mezcla bacteriana que comprende la cepa bacteriana según la reivindicación 1 y procedente de la flora natural del alga parda *Ascophyllum nodosum*.
- 5 3. Material enzimático con actividad fucanolítica, obtenido a partir de la cepa bacteriana según la reivindicación 1, por extracción de un sobrenadante de cultivo de la cepa bacteriana según la reivindicación 1.
4. Material enzimático según la reivindicación 3, caracterizado por que se obtiene por la extracción que comprende una etapa de centrifugación y una etapa de saturación del sobrenadante obtenido de este modo.
- 10 5. Procedimiento de preparación de oligofucanos, que comprende la puesta en contacto del fucano, procedente preferiblemente de Fucales (*Ascophyllum nodosum*) y/o de Laminariales (*Laminaria digitata*), con la cepa bacteriana según la reivindicación 1, la mezcla bacteriana según la reivindicación 2 o el material enzimático según una de las reivindicaciones 3 y 4.

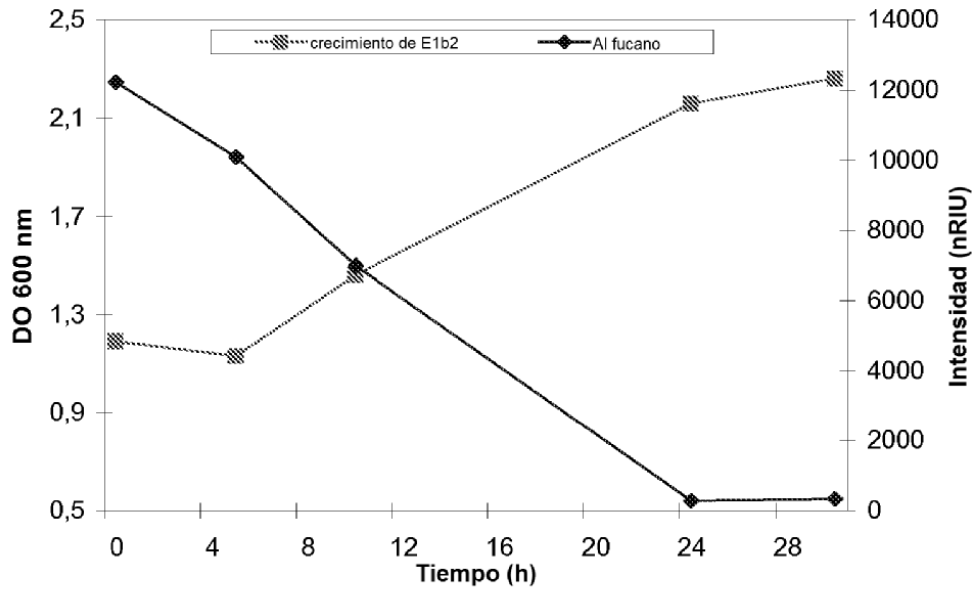


FIGURA 1A

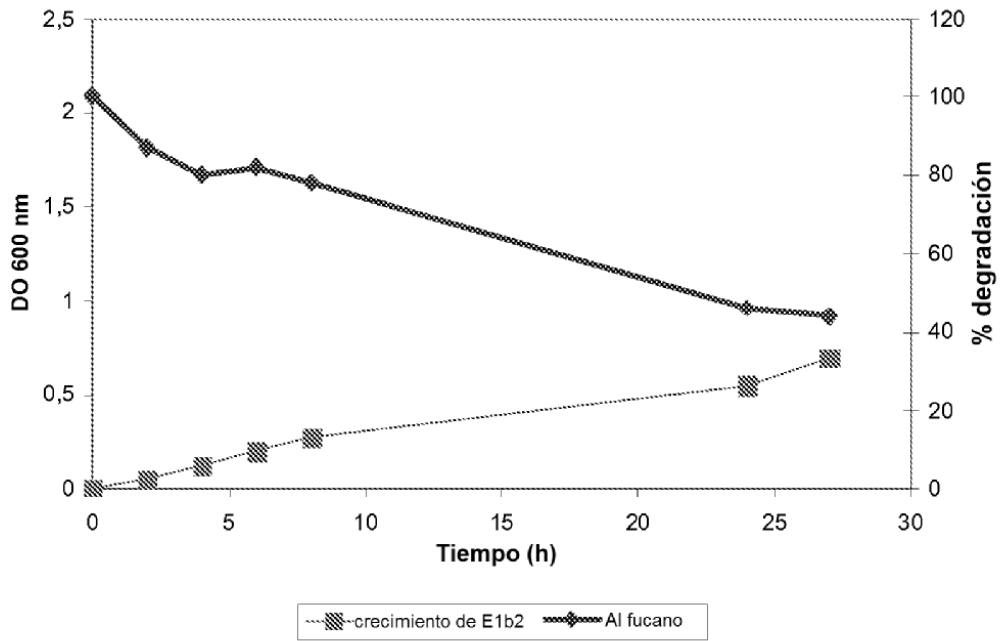


FIGURA 1B

Figura 1

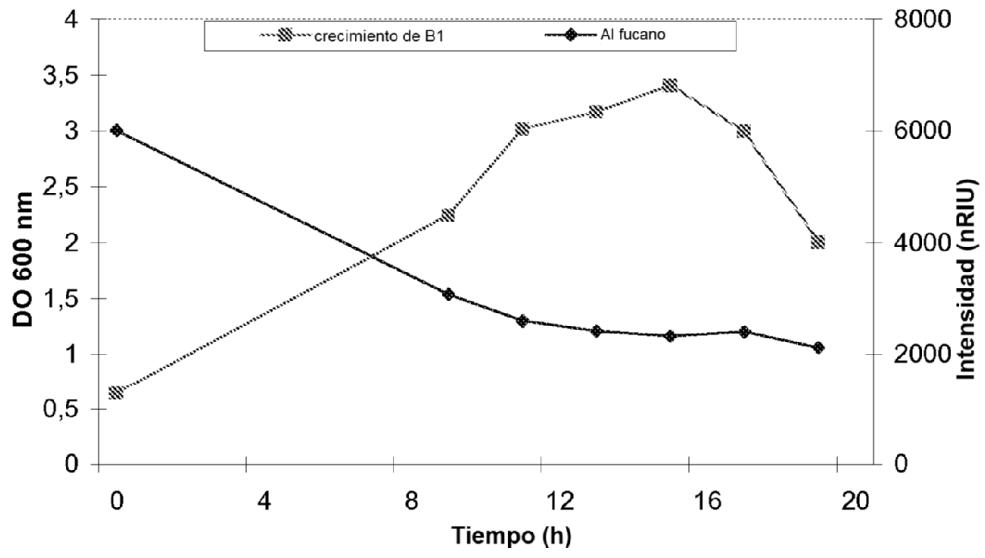


Figura 2

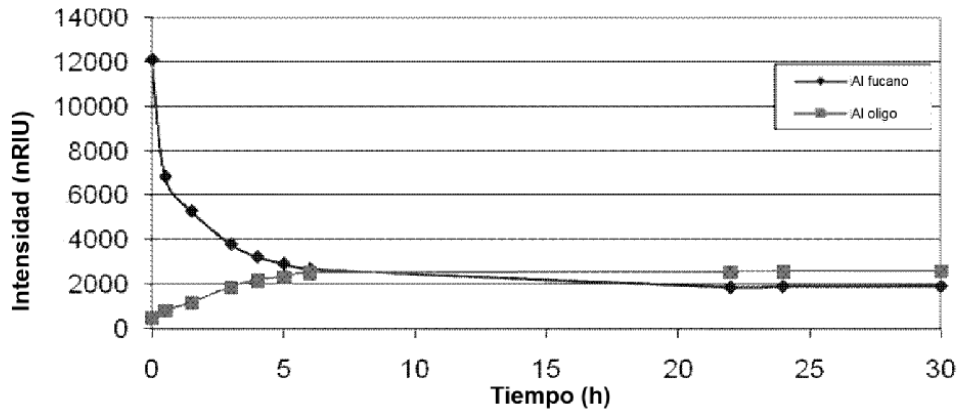


Figura 3

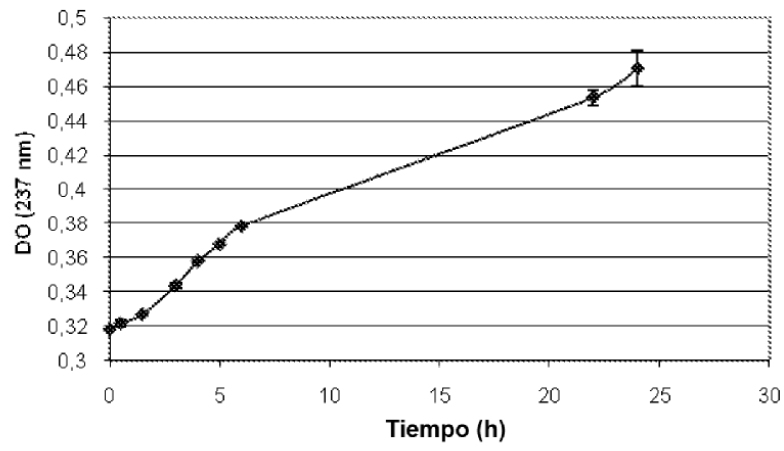


Figura 4

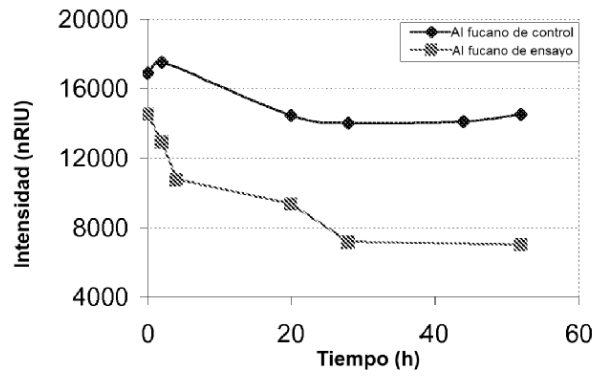


Figura 5

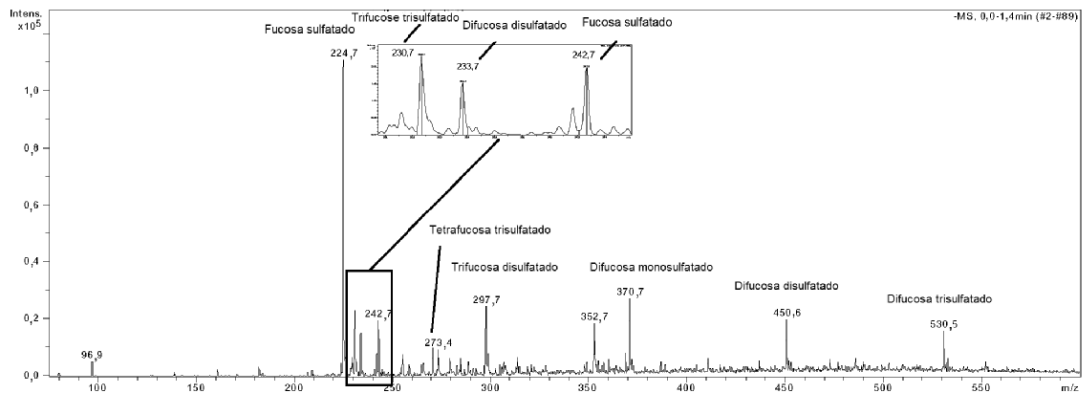


Figura 6

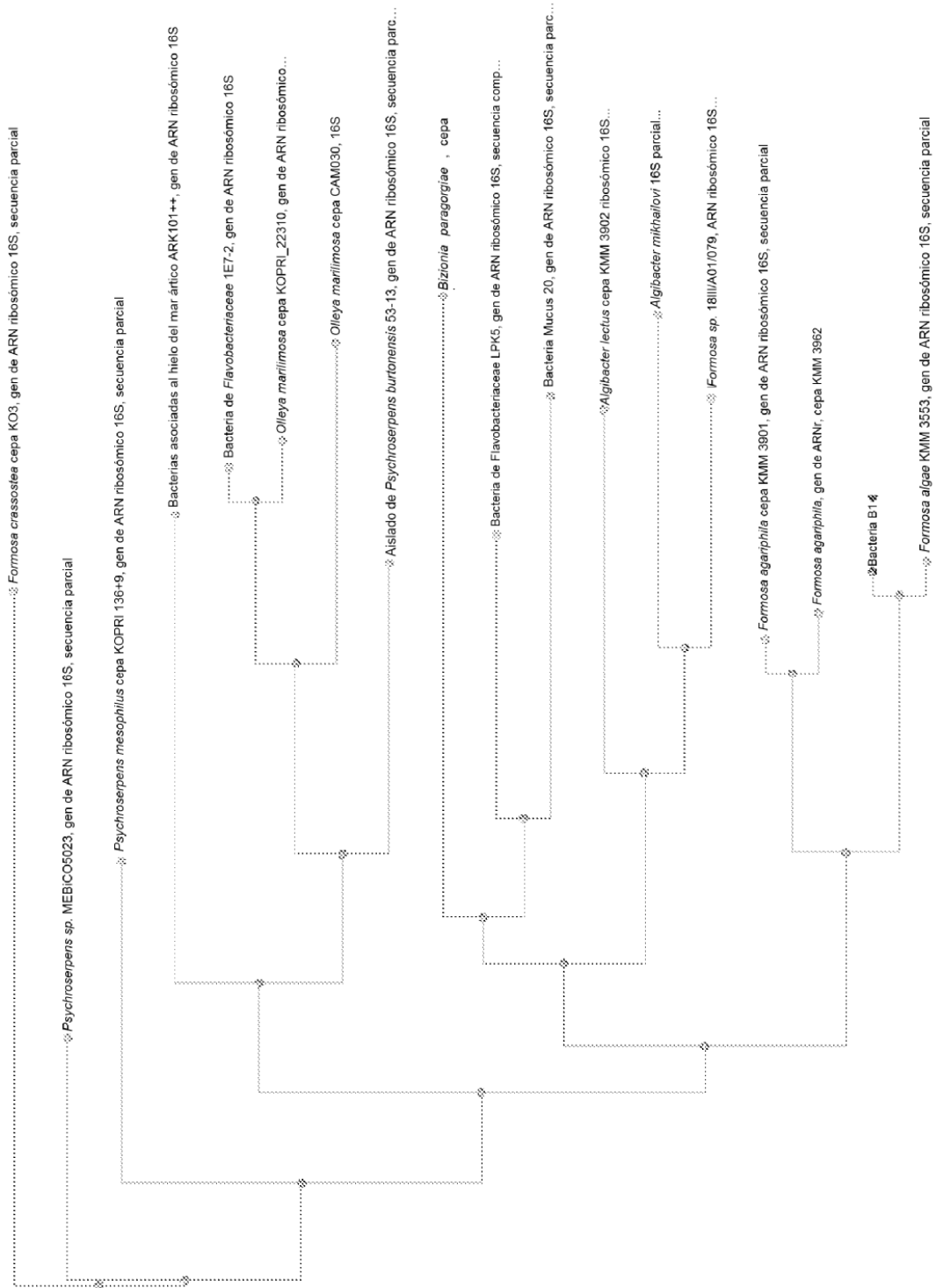


Figura 7