

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 933**

51 Int. Cl.:

C12P 19/04 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.12.2010 PCT/IB2010/055746**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2011 WO11073874**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2010 E 10809242 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020 EP 2513325**

54 Título: **Biopolímero bacteriano que contiene fucosa**

30 Prioridad:

15.12.2009 PT 09104888

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

19.02.2021

73 Titular/es:

**73100 - SETENTA E TRÊS MIL E CEM, LDA
(100.0%)**

**Praça Diogo Cão, n.º2
5000-599 Vila Real, PT**

72 Inventor/es:

**CARVALHO FERNANDES DE MIRANDA REIS,
MARIA D'ASCENSÃO;
FREITAS OLIVEIRA, RUI MANUEL;
ANDRADE DE FREITAS, MARIA FILOMENA y
DELGADO ALVES, VÍTOR MANUEL**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 806 933 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

Biopolímero bacteriano que contiene fucosa

Campo de la invención

5 Esta invención se relaciona con un biopolímero microbiano que contiene fucosa en su composición. Además, la presente invención se refiere al proceso para la producción del biopolímero que contiene fucosa por la bacteria *Enterobacter A47* (DSM 23139). Por lo tanto, esta invención es aplicable en varias industrias (por ejemplo, industria farmacéutica, cosmética y agroalimentaria) y en el tratamiento de residuos industriales (por ejemplo, recuperación de petróleo y metales).

Antecedentes de la invención

10 Los polisacáridos son biomateriales poliméricos de alto peso molecular (10^4 - 10^7), formados a través de la polimerización de unidades de monosacáridos que se repiten. Poseen una gran diversidad estructural como un resultado de la diversidad de las unidades que se repiten, el tipo de uniones glucosídicas involucradas y el grado de ramificación. Muchos polisacáridos poseen componentes que no son azúcares, como grupos acilo orgánicos (por ejemplo, acetato, succinato, piruvato) y grupos inorgánicos (por ejemplo, fosfato, sulfato) (Sutherland, 2001).

15 Por otro lado, los polisacáridos a menudo forman estructuras terciarias a través de uniones no covalentes intra o intermoleculares, que confieren una mayor rigidez a la macromolécula y juegan un papel importante en la determinación de las propiedades del polímero tanto en el estado sólido como en solución (Kumar et al, 2007)

20 Debido a sus propiedades físicas y químicas, específicamente, su capacidad de retención de agua, reología y/o capacidad de formación de película, los polisacáridos se usan en una amplia variedad de alimentos y aplicaciones industriales, incluidos textiles, pinturas, productos farmacéuticos y cosméticos, como agentes emulsionantes, estabilizantes o espesantes (Moreno et al, 1998). Al ser materiales obtenidos de organismos vivos, los polisacáridos generalmente no son tóxicos y son biodegradables, lo que los convierte en biomateriales adecuados para el desarrollo sostenible.

25 Las principales aplicaciones de polisacáridos comerciales, tanto naturales (por ejemplo, alginato, carragenano, goma guar, pectinas, xantano, gellan) como derivados semisintéticos (por ejemplo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilguar) se basan en su capacidad para modificar las propiedades físicas de sistemas acuosos (hidrocoloides: compuestos capaces de modificar las propiedades físicas de los sistemas acuosos), que se utilizan principalmente en la industria alimentaria, seguidos de las industrias de aceite y farmacéutica. Algunos de estos polisacáridos (por ejemplo, alginato, pectinas, pullullan, derivados de almidón, derivados de celulosa) poseen además la capacidad de formar películas biodegradables, que se utilizan en la fabricación de paquetes, recipientes y láminas, así como en varios productos agroalimentarios, farmacéuticos y aplicaciones industriales.

30 Actualmente, la mayoría de los polisacáridos utilizados en la industria se obtienen de plantas (por ejemplo, goma guar, goma arábica), algas (por ejemplo, alginato, carragenano) o crustáceos (por ejemplo, quitina), con polisacáridos microbianos (por ejemplo, xantano, gellan, alginato bacteriano) que representan solo una pequeña fracción del mercado de biopolímeros (Canilha et al, 2005). No obstante, en los últimos años, ha habido un creciente interés en identificar y aislar nuevos polisacáridos microbianos que pueden competir con los tradicionales, debido a sus propiedades físico-químicas potenciadas, específicamente, mayores actividades de emulsión y floculación, mayor resistencia a los disolventes orgánicos, actividad biológica (por ejemplo, efectos anticancerígenos o inmunoestimulantes) y mejores propiedades reológicas (por ejemplo, mayor viscosidad para concentraciones más bajas de polímeros, mayor estabilidad sobre pH más amplio, temperaturas e intervalos de concentración iónica) (Kumar et al, 2007; Sutherland, 2001).

35 La producción microbiana de polisacáridos tiene ventajas sobre su extracción de plantas, algas o animales, ya que los microorganismos generalmente exhiben tasas de crecimiento más altas y son más susceptibles a la manipulación de las condiciones de cultivo (Moreno et al, 1998). Las plantas, algas y animales tienen ciclos de vida de uno o más años, siendo el ciclo de producción generalmente estacional. Por otro lado, las tasas de crecimiento de los microorganismos son del orden de horas o unos pocos días, mientras que plantas, algas y animales tienen tasas de crecimiento del orden de meses o años.

40 El principal factor que limita la producción comercial de polisacáridos microbianos es el alto coste del sustrato, principalmente azúcares, especialmente glucosa, almidón y sacarosa. En esos bioprocesos, el coste del sustrato representa el 20-40 % de los costes totales de producción (Kumar and Mody, 2009).

45 Por lo tanto, la búsqueda de sustratos menos costosos con una productividad comparable es esencial para la reducción de los costes de producción. El glicerol, un subproducto de varios procesos industriales, principalmente la industria del biodiesel, es un buen candidato. Debido al enorme crecimiento de la industria del biodiesel en los últimos años, se está produciendo en cantidades mucho más allá de su consumo actual en las aplicaciones tradicionales de glicerol.

55 Para la industria del biodiesel o para cualquier otra industria que tenga glicerol como subproducto, representa una carga debido a su bajo valor comercial y al hecho de que su eliminación es un proceso asociado a los costes. Por lo

tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar una aplicación interesante para este subproducto industrial, haciendo uso del hecho de que el glicerol es un compuesto no tóxico y biodegradable (Çelik et al, 2008).

Además de su capacidad para modificar las propiedades físicas de los sistemas acuosos, los polisacáridos que contienen fucosa tienen un mayor potencial para aplicaciones industriales debido al hecho de que la fucosa es uno de los azúcares raros, difícil de obtener. Por otro lado, la presencia de fucosa reduce la posibilidad de reacciones alérgicas, lo que potencia el uso de estos biopolímeros en aplicaciones tales como, por ejemplo, productos farmacéuticos y cosméticos.

La fucosa se puede sintetizar a través de su conversión química de otros monosacáridos más comunes, como la galactosa o la glucosa. Sin embargo, la mayoría de los procesos químicos son complejos, involucran varios intermedios y tienen bajo rendimiento. Una alternativa a la síntesis química de fucosa es la hidrólisis química o enzimática de polisacáridos que contienen fucosa. Estos polímeros se pueden encontrar en plantas, algas y microorganismos.

En plantas, la fucosa (L-fucosa y fucosa metilada) se encuentra, por ejemplo, en las paredes celulares de patata y la fruta kiwi, en semillas de soja, en el mucílago de hojas jóvenes de *Plantago lanceolata*, en las raíces de *Lepidium sativum* y *Glycyrrhiza uralensis*, en los exudados de *Astragalus microcephalus*, *A. gummifer* y *A. kurdicus*, y en las hojas de *Lupinus albus* (Vanhooren e Vandamme, 1999).

En algas marinas, se encuentra fucosa en fucoidan que es un homopolisacárido compuesto de L-fucosa sulfatada. La fucosa se puede extraer de algas marinas como, por ejemplo, *Pelvetia canaliculata*, *Fucus vesiculosus* y *Ascophyllum nodosum*. En esas especies, el contenido de L-fucosa varía entre 9.0 y 11.2 %. El rendimiento de la extracción global de L-fucosa de las algas marinas es bastante bajo (alrededor del 7.6 %) (Vanhooren e Vandamme, 1999).

Varios microorganismos, específicamente, bacterias, hongos y microalgas, sintetizan polisacáridos extracelulares (EPS) que contienen L-fucosa. Estos polímeros incluyen tanto homo como heteropolisacáridos, siendo los últimos los más comunes, que contienen cantidades variables de fucosa, así como otros residuos de azúcar (por ejemplo, glucosa, galactosa, manosa, ramnosa y/o arabinosa). Los EPS que contienen L-fucosa son producidos por bacterias que pertenecen a varios géneros, incluidos *Aerobacter*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Clavibacter*, *Bacillus* y *Salmonella*, entre otros. En los hongos, la fucosa se puede encontrar en EPS producidos por especies pertenecientes a los géneros *Candida*, *Mucor*, *Polyporus*, *Rhodotorula* y *Sporobolomyces*, entre otros.

En las últimas décadas, se ha reportado la producción de polisacáridos que contienen L-fucosa para varios géneros bacterianos, principalmente de los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Clavibacter*.

Varias cepas de *Klebsiella pneumoniae* sintetizan diferentes EPS que contienen L-fucosa, D-galactosa y ácido galacturónico, que difieren entre ellos por el grado de acetilación de la cadena polimérica. El EPS producido por *K. pneumoniae* 1-1507 (US 5876982) ha encontrado aplicación en la industria cosmética debido a sus cualidades psicosensores, propiedades hidratantes y autoemulsionantes (Guetta et al, 2003a). Se han descrito otros EPS que poseen una composición muy similar, específicamente, el EPS producido por *Klebsiella* K-63 (Joseleau y Marais, 1979) y por *K. pneumoniae* ATCC 31646 (documento US 4298691). El polímero de esta invención difiere de aquellos EPS por el hecho de que, además de fucosa y galactosa, también contiene glucosa. Por otro lado, el polímero de esta invención tiene en su composición cantidades significativas de sustituyentes de grupos acilo (hasta aproximadamente 25 % del peso seco de EPS) que no se denominan componentes de *Klebsiella* EPS.

K. pneumoniae ATCC 12657 (anteriormente conocido como *Aerobacter aerogenes* cepa A3) produce un EPS compuesto de fucosa, glucosa, galactosa y ácido glucurónico, en cantidades aproximadamente equimolares (Vanhooren e Vandamme, 1999). La fucosa representa el 18.9 % del peso de EPS purificado (Guetta et al, 2003b). Este polisacárido difiere del polímero de esta invención por el alto contenido de ácido glucurónico y la presencia de grupos acilo que no se describen para *K. pneumoniae* ATCC 12657 EPS. Además, el proceso descrito en la presente invención no utiliza especies del género *Klebsiella* para el cultivo microbiano.

También se ha reportado que las cepas de *Enterobacter* producen EPS que contiene fucosa, galactosa, glucosa y ácido glucurónico. Los ejemplos incluyen: *Enterobacter* sp. CNCM 1-2744 que produce un EPS en el que los monómeros están presentes en una proporción de 2:2:1:1 (FR2840920); *Enterobacter* sp. SSSL (KCTC 0687BP) que produce un EPS con un peso molecular entre 10^5 y 10^6 , en el que la fucosa representa el 8-10 % del contenido de azúcar, siendo el ácido glucurónico el componente principal (40-70 %) (documento US2002115158); y *E. sakazakii*, cepas ATCC 53017, ATCC 29004 y ATCC 12868 que produce un EPS con un peso molecular de 2×10^6 , en el que la fucosa representa el 13-22 % y el contenido de manosa es de hasta el 8 %, respectivamente (documento US 4806636). Estos polisacáridos difieren del polímero de esta invención por el contenido diferente de sus monómeros de azúcar y grupos acilo. Además, el polímero de esta invención tiende a tener un peso molecular típicamente más alto del orden de 10^6 - 10^7 .

Se han descrito varias cepas de *Clavibacter michiganensis* que producen EPS que contiene L-fucosa. Esos EPS contienen otros azúcares neutros, como galactosa, glucosa y/o manosa, y sustituyentes de grupos acilo, como piruvato, succinato y/o acetato. *C. michiganensis* subsp *michiganensis* Cm 542 (NCPPB 1064) produce un EPS de alto peso molecular (10^6 - 10^7) compuesto por fucosa, galactosa y glucosa (2:1:1), y piruvato, succinato y acetato (1:0.5:1.5) (van den Bulk et al, 1991). El polímero de esta invención, aunque posee una composición similar, difiere de

EPS de *C. michiganensis* en la proporción relativa de los grupos acilo. El mayor contenido de succinato del polímero de esta invención le confiere un mayor carácter aniónico.

5 En el documento WO2008/127134 se describe un proceso para la producción de un polisacárido rico en galactosa por la bacteria *Pseudomonas oleovorans* usando sustratos ricos en glicerol. Sin embargo, el EPS obtenido en ese proceso contiene solo cantidades residuales de fucosa (0-4 %).

10 En vista de esto, la presente invención describe un biopolímero que contiene fucosa de alto peso molecular, con un carácter de polielectrolito, producido por cultivo microbiano, usando *Enterobacter A47* (DSM 23139) y un proceso de este. Dicho proceso permite obtener el polímero de la invención utilizando sustratos de bajo coste y de manera fácil. El polímero de la invención puede usarse en varias industrias, tales como la industria agroalimentaria, el tratamiento de aguas residuales y la industria farmacéutica debido a su reología, capacidad de formación de película, carácter de polielectrolito y capacidades de floculación emulsionante.

Descripción general de la invención

15 La presente invención proporciona un proceso para preparar un polímero que comprende un polisacárido que contiene fucosa mediante el cultivo de la bacteria *Enterobacter A47* (con número de acceso DSM 23139), el proceso comprende las siguientes etapas:

a) una fase por lotes que comprende cultivar dicho *Enterobacter A47* en un medio de cultivo en un biorreactor agitado y aireado, en donde el medio de cultivo comprende una fuente de carbono que comprende glicerol o mezclas que contienen glicerol, una fuente de nitrógeno y sales inorgánicas;

20 b) una fase alimentada por lotes que comprende cultivar la bacteria *Enterobacter A47* bajo condiciones de limitación de nitrógeno; y

en donde la temperatura durante la fase por lotes y la fase alimentada por lotes se controla entre 15 y 45 ° C y el pH se controla entre 5.0 y 9.0.

25 La presente invención se refiere a un polímero con un peso molecular promedio de 10^6 - 10^7 obtenible por el proceso descrito anteriormente que comprende fucosa en una cantidad de al menos 10 % del contenido total de carbohidratos, una cantidad de glucosa entre 20 % -70 % y una cantidad de galactosa entre 10-40 % del contenido total de carbohidratos, una cantidad de ácido glucurónico hasta el 15 % del contenido total de carbohidratos y los grupos acilo representan hasta el 25 % del peso seco del polímero.

1. Caracterización del cultivo microbiano

30 El polímero que contiene fucosa de la presente invención es producido por la bacteria *Enterobacter A47* depositada en DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), bajo el Tratado de Budapest, con número de acceso DSM 23139. Además, el microorganismo utilizado en la presente invención se caracteriza por otros aspectos, específicamente, el perfil bioquímico, la secuenciación genética y el dendrograma filogenético presentado en las Tablas 1 y 2 y en la Figura 1, respectivamente.

2. Caracterización del proceso para la producción del polímero

35 El polímero de la presente invención se produce en un biorreactor en un medio acuoso agitado y aireado. El medio de cultivo contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y sales inorgánicas. La fuente de carbono es glicerol o sustratos que contienen glicerol. Sin embargo, el proceso para la producción del polímero de la invención prevé el uso de otras fuentes de carbono, ya sea en mezcla con glicerol, como por ejemplo, azúcares, alcoholes, ácidos orgánicos o alcanos, así como desechos o subproductos alimenticios e industriales, como por ejemplo el subproducto de glicerol de la industria del biodiésel, la melaza de azúcar, los desechos de producción de suero de leche o aceite de oliva.

El proceso para la producción del polímero que contiene fucosa consiste en el cultivo del microorganismo en un medio acuoso aireado con nutrientes. La temperatura se controla entre 15 y 45 ° C, preferiblemente entre 26 y 37 ° C. El pH se controla entre 5.0 y 9.0, preferiblemente entre 6.5 y 7.0.

45 Al comienzo del cultivo, la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo se establece por encima del 70 %. Posteriormente, la concentración de oxígeno disuelto disminuye gradualmente, concomitante con el crecimiento celular, siendo controlada por debajo del 30 %, o preferiblemente por debajo del 20 %, o más preferiblemente por debajo del 10 % o incluso en condiciones anaeróbicas. El polímero que contiene fucosa se produce bajo condiciones de limitación de nitrógeno, como en una cantidad inferior a 0.3 g/L, o inferior a 0.2 g/L, o inferior a 0.1 g/L o incluso sin fuente de nitrógeno y disponibilidad de carbono, simultáneamente con baja concentración de oxígeno disuelto, como se describió anteriormente. La disponibilidad de carbono está garantizada al suministrar al cultivo un medio de cultivo que contiene una alta concentración de glicerol (> 100 g/L). La rata de flujo de la adición de dicho medio durante esta fase alimentada por lotes debe ajustarse para que coincida con el consumo de carbono del cultivo.

El caldo de cultivo obtenido al final del cultivo en el biorreactor puede usarse directamente, sin ningún tratamiento, o después de ser secado. Alternativamente, el polímero que contiene fucosa puede precipitarse del caldo mediante la adición de un agente precipitante (por ejemplo, etanol, acetona), produciendo un polímero nativo.

5 El proceso de extracción del polímero de la invención consiste en la eliminación de células (por ejemplo, por centrifugación del caldo), seguido de la precipitación del polímero mediante la adición de un agente precipitante. La purificación del polímero implica el uso de uno o varios procesos adicionales (por ejemplo, diálisis).

Dependiendo de las condiciones de cultivo en el biorreactor, el tiempo de cultivo y los procedimientos utilizados para extraer/purificar el polímero, el proceso produce 50 g/L de polímero nativo o 20 g/L de polímero purificado.

3. Caracterización del polímero

10 Típicamente, el polímero de la invención tiene un contenido de fucosa que representa al menos el 10 % de su composición de azúcar. El polímero que contiene fucosa tiene en su composición otros azúcares neutros, específicamente, glucosa y galactosa, y también puede contener en cantidades ínfimas (<5 %) otros azúcares, como por ejemplo manosa, ramnosa, arabinosa, fructosa, ácido glucurónico y/o glucosamina.

4. Aplicaciones del polímero.

15 El polímero de la invención presenta actividades de floculación y emulsión, forma soluciones acuosas altamente viscosas con comportamiento de fluido pseudoplástico y produce películas biodegradables cuando se mezcla con otros polímeros. Por lo tanto, puede reemplazar otros polisacáridos, como por ejemplo xantano, alginato, carragenano, goma guar y goma arábiga, en sus numerosas aplicaciones, específicamente, en la industria agroalimentaria, en productos farmacéuticos y cosméticos. Además, la presencia de fucosa en el polímero de la invención potencia aún más su uso en aplicaciones médicas y cosméticas. Además, la presencia de residuos de piruvato y succinato confiere un carácter aniónico al polímero. Como consecuencia, es capaz de inmovilizar metales tóxicos.

20

Descripción de los dibujos

Figura 1: representa el dendrograma filogenético de la bacteria *Enterobacter A47* (DSM 23139).

25 Figura 2: representa la viscosidad aparente de una solución acuosa (0.8 % p/v) del polímero que contiene fucosa (medido a temperatura ambiente).

Figura 3: representa el curso temporal del consumo de la fuente de carbono (glicerol) y la fuente de nitrógeno (amonio), la producción de biomasa y EPS que contiene fucosa, durante el proceso de cultivo para la producción del polímero de la invención.

Descripción detallada de la invención

30 1. Caracterización del microorganismo

El polímero que contiene fucosa se obtiene mediante el cultivo de la bacteria *Enterobacter A47* (DSM 23139). El microorganismo puede ser una cepa de tipo salvaje, una variante o un mutante, siempre que tenga la capacidad de sintetizar el polímero que contiene fucosa. Se puede usar un cultivo puro o, alternativamente, se puede usar un cultivo mixto en el que al menos un microorganismo sea capaz de producir el polímero de la invención.

35 El microorganismo preferido para obtener el polímero de la invención es la bacteria *Enterobacter A47* (DSM 23139) con las características que se describen a continuación. La caracterización bioquímica y genética del microorganismo fue realizada por DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH).

1.1. Caracterización morfológica de la bacteria *Enterobacter A47* (DSM 23139)

40 La bacteria *Enterobacter A47* (DSM 23139) es una varilla con las siguientes dimensiones: 0.7-0.8 µm x 1.2-2.5 µm. Es una bacteria móvil Gram negativa.

1.2. Perfil bioquímico de la bacteria *Enterobacter A47* (DSM 23139)

La bacteria *Enterobacter A47* (DSM 23139) tiene el siguiente perfil bioquímico, que es típico del género *Enterobacter* (Tabla 1):

45 Tabla 1: Perfil bioquímico de la bacteria *Enterobacter A47* (DSM 23139) ("+" y "-" representan una reacción positiva o negativa, respectivamente, a la prueba realizada).

Prueba	Resultado
Lisis por KOH al 3 %	+

ES 2 806 933 T3

Prueba	Resultado
Aminopeptidasa (Cerny)	+
Catalasa	+
Crecimiento anaerobio	+
Gas de glucosa	+
H ₂ S	-
Indol	-
Rojo de metilo	-
Degradación de:	
Gelatina	-
Tween 80	-
ADN	-
Urea	+
Citrat (Simmons)	+
Utilización de malonato	+
VP	+
ONPG	+
ADH	+
LDC	-
ODC	+
Ácido de (ASS):	
Glucosa	+
Fructosa	+
Manosa	+
Maltosa	+
D-xilosa	+
Sacarosa	+
Trehalosa	+
L-arabinosa	+
Ramnosa	+
Galactosa	+
Adonitol	+
Dulcitol	-
Eritritol	-
Inositol	-
Glicerol	+

1.3. Secuencia del gen 16S ADNr de la bacteria *Enterobacter A47* (DSM 23139)

La secuencia del gen 16S ARNr de la bacteria *Enterobacter A47* (DSM 23139) (Tabla 2) se determinó por secuenciación directa de ADNr 16S amplificado por PCR. La extracción de ADN genómico, amplificación mediada por PCR (reacción en cadena de polimerasa) del ADNr 16S y purificación del producto de PCR se llevaron a cabo como se describe por Rainey et al (1996). Los productos de PCR purificados se secuenciaron usando el CEQ™DTCS-Quick

ES 2 806 933 T3

Start Kit (Beckman Coulter) como se indica en el protocolo del fabricante. Las reacciones de secuencia se sometieron a electroforesis utilizando el sistema de análisis genético CEQ™ 8000. Los datos de secuencia resultantes se pusieron en el editor de alineación ae2 (Maidak et al, 1999), se alinearon manualmente y se compararon con las secuencias genéticas de ARNr 16S representativas de organismos que pertenecen a las Enterobacteriaceae (Maidak et al, 1999). Para comparación, se obtuvieron secuencias 16S de las bases de datos EMBL, RDP o DSMZ.

5

Tabla 2: secuencia del gen de ADNr 16S de la bacteria *Enterobacter A47* (DSM 23139) - SEQ ID NO 1

1	TGATCCTGGC GAACGGTAAC	TCAGATTGAA	CGCTGGCGGC	AGGCCTAACA	CATGCAAGTC
61	AGGAAGCAGC CTGGGAAACT	TTGCTGCTTC	GCTGACGAGT	GGCGGACGGG	TGAGTAATGT
121	GCCTGATGGA GTCGCAAGAC	GGGGGATAAC	TACTGGAAAC	GGTAGCTAAT	ACCGCATAAY
181	CAAAGAGGGG TTAGCTAGTA	GACCTTCGGG	CCTCTTGCCA	TCGGATGTGC	CCAGATGGGA
241	GGTGGGGTAA TGACCAGCCA	CGGCTCACCT	AGGCGACGAT	CCCTAGCTGG	TCTGAGAGGA
301	CACTGGAACT ATATTGCACA	GAGACACGGT	CCAGACTCCT	ACGGGAGGCA	GCAGTGGGGA
361	ATGGGCGCAA GTTTGTAAG	GCCTGATGCA	GCCATGCCGC	GTGTATGAAG	AAGGCCTTCG
421	TACTTTCAGC GTTACCCGCA	GGGGAGGAAG	GCGATAAGGT	TAATAACCTT	GTCGATTGAC
481	GAAGAAGCAC GCAAGCGTTA	CGGCTAACTC	CGTGCCAGCA	GCCGCGGTAA	TACGGAGGGT
541	ATCGGAATTA GTGAAATCCC	CTGGGCGTAA	AGCGCACGCA	GGCGGTCTGT	CAAGTCGGAT
601	CGGGCTCAAC GAGGGGGGTA	CTGGGAACTG	CATTCGAAAC	TGGCAGGCTA	GAGTCTTGTA
661	GAATTCCAGG GGCGAAGGCG	TGTAGCGGTG	AAATGCGTAG	AGATCTGGAG	GAATACCGGT
721	GCCCCCTGGA AGGATTAGAT	CAAAGACTGA	CGCTCAGGTG	CGAAAGCGTG	GGGAGCAAAC
781	ACCCTGGTAG GAGGCGTGCC	TCCACGCCGT	AAACGATGTC	GACTTGGAGG	TTGTGCCCTT
841	TTCCGGAGCT TTAAACTCA	AACGCGTTAA	GTCGACCGCC	TGGGGAGTAC	GGCCGCAAGG
901	AATGAATTGA ATGCAACGCG	CGGGGGCCCG	CACAAGCGGT	GGAGCATGTG	GTTTAATTCC

961	AAGAACCTTA GTGCCTTCGG	CCTACTCTTG	ACATCCAGAG	AACTTTCCAG	AGATGGATTG
1021	GAACTCTGAG GTTGGGTTAA	ACAGGTGCTG	CATGGCTGTC	GTCAGCTCGT	GTTGTGAAAT
1081	GTCCCGCAAC GAACTCAAAG	GAGCGCAACC	CTTATCCTTT	GTTGCCAGCG	GTYAGGCCGG
1141	GAGACTGCCA ATGGCCCTTA	GTGATAAACT	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCATC
1201	GAGACTGCCA ATGGCCCTTA	GTGATAAACT	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCATC
1261	AAGCGGACCT ACTCCATGAA	CATAAAGTGC	GTCGTAGTCC	GGATTGGAGT	CTGCAACTCG
1321	GTCGGAATCG CGGGCCTTGT	CTAGTAATCG	TGGATCAGAA	TGCCACGGTG	AATACGTTCC
1381	ACACACCGCC TTAACCTTCG	CGTCACACCA	TGGGAGTGGG	TTGCAAAAGA	AGTAGGTAGC
1441	GGAGGGCGCT GGTAACCGTA	TACCACTTTG	TGATTCATGA	CTGGGGTGAA	GTCGTAACAA
1501	GGGAACCTGC GGGCTGGATC ACC				

1.4. Dendrograma filogenético de la bacteria *Enterobacter* A47 (DSM 23139)

5 El dendrograma filogenético de la bacteria *Enterobacter* A47 (DSM 23139) se construyó utilizando el paquete ARB (Pruesse et al, 2007). Con base en los valores de distancia evolutiva, el árbol filogenético fue construido por el método de unión de vecinos (Jukes and Cantor, 1969), utilizando las correcciones de Saitou e Nei (1987). La raíz del árbol se determinó incluyendo la secuencia del gen 16S ARNr de *Klebsiella pneumoniae* en el análisis. La barra de escala debajo del dendrograma indica 1 sustitución de nucleótidos por 100 nucleótidos.

10 La secuencia del gen 16S ADNr de la bacteria *Enterobacter* A47 (DSM 23139) muestra la mayor similitud con la bacteria *Enterobacter pyrinus* (98.3 %), *Enterobacter hormaechei* (99.0 %) y *Enterobacter asburiae* (98.9 %). El criterio para identificar un microorganismo dado dentro de una especie conocida se define como que tiene una similitud de al menos >90 % o, idealmente, >99.5 %, con el tipo de cepa para esa especie (Janda and Abbott, 2007).

15 En vista de esto, en algunos aspectos, el cultivo microbiano que se usará en el proceso para la producción del polímero de la invención puede ser cualquier microorganismo que comparta una similitud de al menos 99.0 ± 0.5 % con la SEQ ID NO 1 de *Enterobacter* A47 (DSM 23139), de acuerdo con la Tabla 2, obtenida por manipulación, mutación, variación genética o directamente de la naturaleza.

2. Caracterización del proceso para la producción del polímero

20 El polímero de la presente invención se produce en un biorreactor aireado agitado, con control de pH y temperatura. El proceso para la producción del polímero se inicia mediante la inoculación del microorganismo en un medio acuoso nutriente que contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y sales inorgánicas. El proceso comprende una fase por lotes inicial, seguida de una fase alimentada por lotes, durante la cual el medio mineral se introduce en el biorreactor.

2.1. Medio de cultivo

El medio de cultivo para la producción del polímero que contiene fucosa consiste en un medio acuoso nutriente, que contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y sales inorgánicas.

2.1.1. Fuente de carbono

La fuente de carbono preferida es glicerol y mezclas que contienen glicerol. Alternativamente, la fuente de carbono puede ser un azúcar monomérico, dimérico u oligomérico, un alcohol, un ácido orgánico, un alcano o mezclas que contienen dos o más de los compuestos mencionados.

5 La fuente de carbono también puede ser un desecho o subproducto alimentario o industrial, que contiene uno o varios de los compuestos mencionados anteriormente, como por ejemplo, subproducto de glicerol de la industria del biodiesel, melaza de azúcar, suero de leche o desechos de aceite de oliva. El subproducto de glicerol de la industria del biodiesel está compuesto principalmente por glicerol impuro y contiene cantidades variables de metanol (5-50 %), además de varios otros contaminantes que recuerdan el proceso industrial (por ejemplo, NaOH, aceites grasos, algunos ésteres, azufre, proteínas y minerales). La melaza de azúcar es un subproducto de la refinera de azúcar rica en azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) (>50 %). El suero de leche es un subproducto de la industria del queso, compuesto principalmente por lactosa. La fracción orgánica de los desechos de aceite de oliva incluye azúcares, taninos, polifenoles, polialcoholes, pectinas y lípidos. Otros desechos alimenticios o industriales y subproductos que tienen en su composición compuestos como azúcares, alcoholes, ácidos orgánicos y/o lípidos pueden usarse como sustratos para el cultivo microbiano y producción del polímero que contiene fucosa.

En el proceso para la producción del polímero que contiene fucosa, de acuerdo con la invención, la fuente de carbono debe representar entre 2 y 10 % (p/v) del medio nutriente acuoso, durante la fase por lotes, para suministrar adecuadamente el crecimiento celular. Durante la siguiente fase alimentada por lotes, la fuente de carbono debe mantenerse por encima del 0.1 % (p/v), preferiblemente por encima de 0.5 (p/v), para garantizar la disponibilidad de carbono para la síntesis de polímeros.

2.1.2. Fuente de nitrógeno

La fuente de nitrógeno para el cultivo microbiano puede ser una sal inorgánica (por ejemplo, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4OH , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl) o un compuesto de nitrógeno orgánico (por ejemplo, urea, aminoácidos), mezclas de estos o un alimento o residuo industrial o subproducto que contiene compuestos de nitrógeno (por ejemplo, harina de soja, extracto de levadura, salvado de trigo).

En el proceso para la producción del polímero que contiene fucosa, la fuente de nitrógeno debe tener una concentración inicial entre 0.6 y 3.0 g/L, durante la fase por lotes, para asegurar el crecimiento celular. Durante la siguiente fase alimentada por lotes, la fuente de nitrógeno debe mantenerse por debajo de 0.3 g/L, preferiblemente por debajo de 0.1 g/L, creando así una limitación de nitrógeno. Por lo tanto, durante la alimentación por lotes, el crecimiento celular está limitado o restringido por la limitación de nitrógeno que, concomitantemente con la disponibilidad de carbono, induce la síntesis del polímero que contiene fucosa.

2.1.3. Sales inorgánicas

El medio de cultivo también incluye, en cantidades ínfimas, cationes metálicos, específicamente, sodio, potasio, magnesio, hierro, manganeso, cobalto, cobre y zinc. Cada uno de estos cationes debe estar presente en el medio de cultivo en concentraciones entre 0.001 y 100 mM, excepto el sodio que puede estar presente en cantidades más altas, especialmente para el control del pH.

2.2 Condiciones de cultivo

El cultivo del biorreactor se inicia mediante la inoculación del microorganismo en el medio nutriente acuoso descrito anteriormente, aireado con aire comprimido. El volumen de inóculo debe representar entre el 10 y el 30 % del medio de reacción total al comienzo del cultivo.

Durante todo el cultivo, la temperatura se controla entre 15 y 45 ° C, preferiblemente entre 26 y 37 ° C, y el pH se controla entre 5.0 y 9.0, preferiblemente entre 6.5 y 7.0.

La concentración de oxígeno disuelto es alta (> 70 %) al comienzo del cultivo, disminuyendo gradualmente durante la fase por lotes concomitante con el crecimiento celular. Durante la fase alimentada por lotes, la concentración de oxígeno disuelto se controla por debajo del 30 %, preferiblemente por debajo del 10 % o incluso bajo condiciones anaerobias. La tasa de flujo de aire puede mantenerse constante entre 0.1 y 2.0 vvm, siendo la concentración de oxígeno disuelto controlada por la variación automática de la velocidad de agitación entre 0 y 2000 rpm, preferiblemente entre 400 y 800 rpm. Alternativamente, la tasa de flujo de aire puede variar a lo largo del cultivo entre 0 y 2.0 vvm, mientras se mantiene una tasa de agitación constante. La concentración de oxígeno disuelto durante la fase alimentada por lotes también puede controlarse mediante la adición de sustrato. En este caso, tanto la velocidad de agitación como la tasa de flujo de aire pueden mantenerse constantes a un valor entre 0 y 2000 rpm, y entre 0 y 2.0 vvm, respectivamente.

La síntesis de polímeros se inicia durante la fase por lote, pero ocurre principalmente durante la fase alimentada por lotes, cuando el crecimiento celular se ralentiza o se detiene debido a la limitación de nitrógeno impuesta al biorreactor. Durante la fase alimentada por lotes, se introduce medio nutritivo en el biorreactor, lo que crea condiciones de

disponibilidad de carbono y limitación de nitrógeno. La concentración de nitrógeno en esta fase se mantiene por debajo de 0.3 g N/L, preferiblemente por debajo de 0.1 g N/L. Bajo estas condiciones, el crecimiento celular está restringido y el polímero se produce siempre que haya carbono disponible para igualar su consumo por el cultivo.

5 La síntesis de polímeros en el biorreactor se puede mantener durante 4-7 días o hasta el momento en que el caldo se vuelve demasiado viscoso que ya no es posible mantener una distribución homogénea de oxígeno, temperatura y nutrientes. Esta situación ocurre cuando la viscosidad aparente del caldo alcanza alrededor de 2.0 Pa.s (medida a 30 ° C, a una rata de cizallamiento de 5 s⁻¹).

10 Como alternativa, la producción del polímero de la invención puede mantenerse en un proceso continuo o en un proceso repetido alimentado por lotes. En el proceso continuo, el medio nutriente se introduce continuamente en el biorreactor, y el caldo que contiene el polímero también se elimina continuamente. En el proceso alimentado por lotes repetido, el modo de operación del biorreactor descrito anteriormente (una fase de lote inicial, seguida de una fase alimentada por lotes) se repite cíclicamente. Aproximadamente 10-30 % del volumen de caldo restante está en el biorreactor y sirve como inóculo para el siguiente ciclo. Estos dos modos de operación de biorreactor alternativos permiten una optimización del proceso, ya que se eliminan los períodos no productivos, específicamente, la preparación de nuevo inóculo y biorreactor.

15 2.2. Extracción y purificación de productos de cultivo

El caldo de cultivo obtenido al final del cultivo puede usarse directamente, sin ningún procesamiento. Alternativamente, el polímero crudo se puede obtener secando el caldo a una temperatura de hasta 80 ° C o liofilizando.

20 Alternativamente, se puede recuperar del caldo una forma nativa del polímero al final del cultivo, preferiblemente por precipitación, que se puede lograr mediante la adición de un disolvente miscible en agua en el que el polímero es insoluble, como por ejemplo un alcohol (por ejemplo, etanol, isopropanol) o una cetona (por ejemplo, acetona). El polímero que contiene fucosa se precipita mediante la adición de 1-3 volúmenes de agente precipitante por cada litro de caldo. El polímero se coprecipita con células, proteínas, sales y otros componentes del caldo que son insolubles en el agente precipitante. El polímero precipitado puede secarse a una temperatura de hasta 80 ° C o liofilizarse. Este polímero nativo, así como el caldo y el polímero crudo descritos anteriormente, pueden usarse en aplicaciones tales como, por ejemplo, tratamiento de aguas residuales o pienso animal.

25 En un procedimiento de extracción alternativo, el polímero de la invención puede purificarse parcialmente en un proceso que incluye la eliminación de células por centrifugación (10 000-20 000 rpm, 30-60 minutos), seguido de la adición de un agente precipitante (1-3 litros de agente precipitante por cada litro de caldo). El agente precipitante puede ser cualquiera de los disolventes mencionados anteriormente (por ejemplo, etanol, isopropanol, acetona).

30 El caldo de cultivo es altamente viscoso al final del cultivo, por lo que se facilita la separación celular diluyéndolo (adición de 1-4 litros de agua desionizada por cada litro de caldo) antes de la centrifugación. El polímero precipitado puede secarse a una temperatura de hasta 80 ° C o liofilizarse. Este polímero semipurificado se puede usar en varias aplicaciones como, por ejemplo, las industrias agroalimentaria, cosmética, papelera, de pinturas o de aceite, entre otras.

35 Se puede obtener un polímero puro utilizando adicionalmente uno o más de los siguientes métodos:

- 1) Reprecipitación del polímero a partir de soluciones acuosas de polímero semipurificadas diluidas (0.1-5.0 g/L), siendo el grado de pureza incrementado con el número de reprecipitaciones realizadas;
- 2) Precipitación secuencial con diferentes agentes precipitantes, específicamente, etanol, acetona y/o isopropanol, o mezclas de estos, promoviendo así la eliminación de diferentes contaminantes solubles en cada disolvente;
- 40 3) Lavar el polímero semipurificado con disolventes en los que el polímero es insoluble (por ejemplo, hexano) pero que solubiliza uno o más de los contaminantes;
- 4) Uso de enzimas proteolíticas (por ejemplo, tripsina), adición de agentes precipitantes de proteínas (por ejemplo, ácido tricloroacético) o desnaturalización de materiales proteicos por calentamiento a temperaturas entre 60 y 80 ° C;
- 45 5) Diálisis, ultrafiltración o diafiltración de soluciones poliméricas acuosas semipurificadas, con concentraciones reducidas (0.1-5.0 g/L), lo que resulta en un alto grado de pureza ya que el polímero de alto peso molecular se separa de todos los contaminantes de bajo peso molecular.

50 El polímero puro obtenido con cualquiera de estos procedimientos puede secarse a una temperatura de hasta 80 ° C o liofilizarse. El alto grado de pureza de este polímero permite su uso en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética, entre otras.

Se pueden usar varias combinaciones diferentes de los métodos mencionados para extraer/purificar el polímero que contiene fucosa, de acuerdo con el grado de pureza y la aplicación específica para la que está destinado.

3. Caracterización polimérica

3.1. Composición

El polímero de la presente invención está constituido principalmente por un polisacárido de alto peso molecular (10^6 - 10^7), con un contenido de fucosa de al menos 10 % del contenido total de azúcar. Ese polímero también está compuesto por glucosa y galactosa (20-70 % y 10-40 % del contenido total de azúcar, respectivamente). La composición relativa de los azúcares a los que se hace referencia en el polímero, fucosa, galactosa y glucosa, depende del tiempo de cultivo y de las condiciones de funcionamiento del biorreactor.

Además, el polímero de esta invención también puede poseer otros azúcares neutros en cantidades menores (<5 %), tales como manosa, ramnosa, xilosa, ribosa, arabinosa, ácido glucurónico y/o glucosamina.

El polímero al que se hace referencia posee también componentes no azucarados, específicamente, grupos acilo, que representan hasta el 25 % del peso seco del polímero. Los principales grupos acilo detectados fueron succinato, piruvato y acetato.

Típicamente, acetato y piruvato representan entre 0.5 y 5 % del peso seco del polímero, mientras que el succinato está presente en cantidades más altas, normalmente entre 1 y 20 %. La composición del polímero de la invención en términos de cada grupo acilo depende de las condiciones de operación del reactor y del tiempo de cultivo. La presencia de residuos de piruvato y succinato confiere un carácter aniónico al polímero. Como consecuencia, es capaz de inmovilizar metales tóxicos, haciendo posible su aplicación en la eliminación de metales tóxicos (metales pesados y radionucleótidos) de suelos y agua contaminados.

Dependiendo del método de extracción/purificación, el polímero obtenido puede contener, además del polímero que contiene fucosa, otros componentes presentes en el caldo de cultivo, específicamente, proteínas y compuestos inorgánicos. El contenido máximo de estos componentes se detectó en el polímero nativo (15-30 % de proteínas y 25-40 % de compuestos inorgánicos), mientras que la cantidad mínima (<1 %) se detectó en el polímero purificado obtenido por diálisis.

3.2. Peso molecular promedio del polímero

El peso molecular promedio del polímero purificado, determinado por cromatografía de permeación en gel, está en el intervalo de 10^6 - 10^7 . Normalmente, cuando la producción de polímero se inicia durante la fase de crecimiento microbiano, su peso molecular promedio es de alrededor de 10^5 , aumentando con el tiempo durante el cultivo ejecutado hasta un valor relativamente constante en el intervalo de 10^6 - 10^7 .

3.3. Propiedades del polímero

3.3.1 Solubilidad

El polímero de la invención no es soluble en una amplia gama de disolventes orgánicos a temperatura ambiente, incluyendo acetona, isopropanol, DMSO, hexano, éter dietílico, xileno y tetracloroetileno, entre otros. Esta característica del polímero abre la posibilidad de su aplicación en la preparación de membranas resistentes a disolventes para ser utilizadas en procesos de separación. Sin embargo, se observó que el polímero es soluble en algunos disolventes orgánicos, específicamente en tetracloroetano.

El polímero de la invención es estable en contacto con los disolventes orgánicos probados, manteniendo su composición en términos de constituyentes de azúcar y grupos acilo después de ser expuesto a esos disolventes. Además, el peso molecular promedio tampoco se vio afectado.

3.3.2. Viscosidad de soluciones acuosas poliméricas

Las soluciones acuosas preparadas con el polímero de la invención no son fluidos newtonianos, que presentan un comportamiento de fluido pseudoplástico (Figura 2). La viscosidad aparente de una solución polimérica de 0.8 % (p/v) es de 0.21 Pa.s medida a 25 ° C, para una tasa de cizallamiento de 5 s^{-1} , disminuyendo a 0.02 Pa.s para una tasa de cizallamiento de 500 s^{-1} . Como la viscosidad se recupera inmediatamente cuando disminuye la tasa de cizallamiento, no se observan fenómenos de histéresis. El comportamiento del fluido pseudoplástico de las soluciones poliméricas confiere a este material la capacidad de modificar las propiedades físicas de sistemas acuosos y el potencial para ser aplicado como espesante y potenciador de textura, principalmente en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética.

La viscosidad aparente de las soluciones acuosas de polímeros disminuye con el aumento de la temperatura, pero se mantiene el comportamiento de fluido pseudoplástico. La viscosidad aparente de una solución polimérica al 0.8 % (p/v), medida a una tasa de cizallamiento de 5 s^{-1} es de 0.32 Pa.s a 15 ° C, disminuyendo a 0.05 Pa.s a 65 ° C.

Se estudió el efecto de las etapas secuenciales de calentamiento y enfriamiento sobre las propiedades dinámicas y de cizallamiento constante de la solución EPS purificada, realizando ciclos de etapas consecutivas de calentamiento y enfriamiento. Después de registrar el espectro mecánico y los datos de estado estacionario a 25 ° C, la misma muestra se calentó hasta 40, 55, 70 y 80 ° C. Se observó que la viscosidad aparente y los módulos dinámicos (G' y G''), registrados a 25 ° C al final de cada ciclo, eran prácticamente coincidentes. De esto, podemos concluir que la muestra de polímero es bastante estable bajo fluctuaciones de temperatura, manteniendo sus propiedades en pruebas

consecutivas oscilatorias y de estado estacionario a 25 ° C, después de estar expuesto a temperaturas crecientes de hasta 80 ° C. Estas características nos permiten pensar que el polímero puede usarse en formulaciones acuosas (por ejemplo, productos alimenticios) sometido a fluctuaciones de temperatura durante el procesamiento.

- 5 Con respecto a las propiedades viscoelásticas, las soluciones acuosas del polímero que contiene fucosa presentan un comportamiento de un líquido viscoso ($G'' > G'$ en todo el intervalo de frecuencias estudiadas). No se detectó formación de gel bajo las condiciones probadas.

3.3.3 Actividad emulsificante

- 10 El polímero de la invención posee actividad emulsionante, lo que significa que es capaz de estabilizar emulsiones de gotitas de agua en compuestos hidrófobos, tales como aceites (por ejemplo, aceite de oliva, parafina) e hidrocarburos (por ejemplo, hexano, tolueno). Por lo tanto, el polímero se puede usar como bioemulsionante o agente estabilizador, y tiene el potencial de reemplazar los emulsionantes sintéticos en una amplia gama de aplicaciones, como en las industrias del petróleo, detergentes, textiles, papel, pintura, cosméticos, farmacéuticos y alimenticios.

- 15 La actividad emulsionante no se limita al polímero purificado. Otras formas, específicamente, cruda, nativa y semipurificada, han revelado la capacidad de estabilizar las emulsiones de agua en compuestos hidrófobos. Esta capacidad se verificó usando soluciones poliméricas de la invención, con una concentración entre 0.05 y 1.5 %, cuando se mezcla con varios hidrocarburos (por ejemplo, hexadecano, hexano, tolueno y xileno) y aceites (aceite de oliva y parafina). Las emulsiones formadas fueron bastante estables durante varias semanas. Además, han demostrado ser muy estables a la temperatura, resistiendo el calentamiento desde la temperatura ambiente hasta 40, 50, 60 y 100 ° C.

- 20 3.3.4. Actividad de floculación

- 25 El polímero de la invención presenta también una actividad floculante significativa, y puede usarse como agente biofloculante natural. Los agentes floculantes son útiles en la promoción de la agregación celular y coloidal, siendo ampliamente utilizados en aplicaciones industriales, como el tratamiento de aguas residuales y agua potable y productos alimenticios. La biodegradabilidad y la seguridad del polímero de la invención representan ventajas sobre los floculantes sintéticos, que son peligrosos para la salud humana y cuya degradación en el medio ambiente es difícil.

- 30 A temperatura ambiente y pH neutro, la actividad de floculación del polímero de la invención disminuye del 70 al 60 % con el aumento de la concentración del polímero del 0.1 al 0.8 % (p/v). Esta actividad de floculación se comparó con la de los polisacáridos comerciales, específicamente, xantano, alginato, goma guar y carboximetilcelulosa. El polímero de la invención reveló ser un buen agente floculante, con un rendimiento similar al de los productos comerciales, para la misma concentración de polímero.

3.3.5 Preparación de películas biodegradables.

- 35 El polímero que contiene fucosa puede usarse para producir películas compuestas biodegradables mezclándolo con otros biopolímeros, tales como almidón, pectina, alginato, carragenano, gluten, gellan y quitosano. Estas películas pueden aplicarse como membranas en el procesamiento de disolventes orgánicos y materiales de empaque.

- Los polisacáridos, como quitosano, almidón y goma guar, se han probado en la preparación de microesferas para la liberación controlada de fármacos. El polímero de esta invención puede usarse también para ese propósito, solo o mezclado con otros biopolímeros.

4. Aplicaciones del polímero de la presente invención

- 40 El polímero de esta invención presenta actividad emulsionante y floculante, y forma soluciones acuosas de alta viscosidad con un comportamiento de fluido pseudoplástico. Como consecuencia, puede sustituir a otros polisacáridos, como xantano, alginato, goma guar y goma arábica, en una amplia gama de aplicaciones, específicamente, como un espesante, potenciador de textura o agente aglomerante, en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética.

- 45 El polímero que contiene fucosa puede usarse para producir películas compuestas biodegradables mezclándolo con otros biopolímeros, tales como almidón, pectina, alginato, carragenano, gluten, gellan y quitosano. Estas películas se pueden aplicar como membranas en el procesamiento de disolventes orgánicos (por ejemplo, deshidratación de disolventes por pervaporación) y en materiales de empaque, como el empaque de alimentos, con respecto a su baja permeabilidad a gases (oxígeno y dióxido de carbono).

- 50 El polímero que contiene fucosa también puede usarse como fuente de oligosacáridos, obtenidos del polímero original mediante la aplicación de tratamientos físicos (por ejemplo, microondas, calor, irradiación y ultrasonificación), procesos químicos (por ejemplo, hidrólisis ácida), tratamientos enzimáticos (por ejemplo, con hidrolasas y liasas) o procesos biológicos (usando agentes microbianos capaces de degradar el polímero y usar todos los azúcares como fuente de carbono, excepto la fucosa). La fucosa y los fucooligosacáridos obtenidos, así como el polímero original, aislado o mezclados juntos, tienen un gran potencial en aplicaciones médicas como agentes anticancerígenos y antiinflamatorios, en el tratamiento de la artritis reumatoide, por nombrar algunos (Vanhooren e Vandamme, 1999;

Péterszegi et al, 2003b). Además, debido a la presencia de fucosa en su composición, el polímero de la invención también tiene un gran potencial para ser utilizado en cosméticos como aditivo hidratante y antienvjecimiento (Péterszegi et al, 2003a).

Ejemplos

5 **Ejemplo 1:** Producción del polímero que contiene fucosa mediante el cultivo de la bacteria *Enterobacter A47* (DSM 23139), usando subproducto de glicerol de la industria del biodiesel

10 Se inoculó un cultivo de *Enterobacter A47* (DSM 23139) en 8 L de medio de cultivo con la composición presentada en la Tabla 3. El biorreactor (BioStat B-plus, Sartorius) se operó bajo las siguientes condiciones: temperatura controlada a 30 ° C; pH controlado a 6.80 ± 0.05, adición automática de NaOH 1M y una rata de aireación constante de 1.6 L/min (0.2 vvm). A medida que se producía el crecimiento microbiano, la concentración de oxígeno disuelto disminuyó del 80 % de saturación al comienzo de la ejecución del cultivo, a aproximadamente el 20 % después de 1 día.

15 A partir de ese instante, se introdujo una alimentación continua (de aproximadamente 20 ml/h) en el reactor. Su composición fue la presentada en la Tabla 3, pero con una concentración diferente de glicerol (200 g/L). Estas condiciones de operación limitaron la concentración de nitrógeno en el caldo de fermentación (por debajo de 0.1 g N/L) y permitieron simultáneamente una buena disponibilidad de fuente de carbono.

Tabla 3: Composición del medio de cultivo.

Componente	Concentración
Coproducto de glicerol	25 g/L
K ₂ HPO ₄	5.8 g/L
KH ₂ PO ₄	3.7 g/L
(NH ₄) ₂ HPO ₄	3.3 g/L
Solución mineral ⁽¹⁾	1.0 mL/L
MgSO ₄ 100 mM	10 mL/L

(1) Composición de la solución mineral (para 1 litro de HCl 1N): FeSO₄·7H₂O, 2.78 g; MnCl₂·4H₂O, 1.98 g; CoSO₄·7H₂O, 2.81 g; CaCl₂·2H₂O, 1.67 g; CuCl₂·2H₂O, 0.17 g; ZnSO₄·7H₂O, 0.29 g)

20 La concentración de oxígeno disuelto disminuyó gradualmente hasta un 10 % de saturación, valor alcanzado después de 2 días de cultivo. A partir de ese momento, se controló por debajo del 10 % por variación automática de la rata de agitación entre 400 y 800 rpm. Después de 1 día bajo estas condiciones, la viscosidad del caldo de fermentación aumentó rápidamente, lo que estaba relacionado con la producción de polímeros.

25 Al final de los 4 días de cultivo, la concentración de polímero fue de casi 13.3 g/L, que se refiere al polímero extraído y cuantificado en su forma semipurificada (Figura 3). La viscosidad del caldo de fermentación aumentó significativamente entre el día 4 y el día 7, a pesar de que la producción de polímero había cesado. La productividad alcanzó el valor de 3.6 g L⁻¹ día⁻¹ y el rendimiento del glicerol fue de 0.47 g g⁻¹, considerando el intervalo de tiempo en el que tuvo lugar la producción de polímeros (del día 1 al día 4).

La ejecución del cultivo se detuvo el día 7, cuando la viscosidad del caldo de fermentación alcanzó 3.0 Pa.s, a una rata de cizallamiento de 5 s⁻¹ y T = 30 ° C.

30 **Ejemplo 2:** extracción y purificación del polímero que contiene fucosa producido por *Enterobacter A47* (DSM 23139) a partir del subproducto de glicerol

Al final de la ejecución del cultivo descrito en el Ejemplo 1, el polímero que contenía fucosa se recuperó del caldo de fermentación, en la forma de tres productos diferentes con diversos grados de pureza: polímero nativo, semipurificado y purificado.

35 El polímero nativo se obtuvo mediante la adición de acetona directamente al caldo de fermentación (3:1). La concentración de polímero nativo fue de 20.6 g/L.

40 Para obtener el polímero semipurificado, el caldo de fermentación se diluyó primero para reducir la viscosidad (2 L de agua desionizada a 1 L de caldo de fermentación) y luego la biomasa se separó por centrifugación (20000 rpm, 30 min). Posteriormente, el sobrenadante libre de células se añadió lentamente a acetona (1:3) bajo agitación suave, promoviendo la precipitación del polímero. El precipitado se disolvió en agua desionizada y se liofilizó. La concentración de polímero semipurificado fue de 11.6 g/L.

Para obtener el polímero purificado, se procesó una solución acuosa de polímero semipurificado por diálisis en contacto con agua desionizada durante 24 horas, usando una membrana de 3500 MWCO (tubo de diálisis plisado SnakeSkin™ 68035 - Thermo Scientific). Se añadió azida de sodio (6 ppm) para evitar la degradación microbiana del polímero. Después de eso, el polímero se precipitó mediante la adición de acetona, se redisolvió en agua y se liofilizó. La concentración de polímero purificado fue de 5.5 g/L.

Como una alternativa, el polímero puede extraerse/purificarse mediante la siguiente metodología: dilución del caldo de fermentación y separación de biomasa por centrifugación; calentar a 60 ° C durante 1 hora para inactivar las enzimas presentes en el sobrenadante que pueden ser responsables por degradación parcial del polímero; diálisis del sobrenadante en contacto con agua desionizada y finalmente liofilización. Con este método se recuperaron 5.0 g/L de polímero purificado.

Ejemplo 3: Análisis químico del polímero que contiene fucosa producido por *Enterobacter A47* (DSM 23139)

El polímero producido como se describe en el Ejemplo 1 y extraído como se describe en el Ejemplo 2 se caracterizó en términos de su composición química, específicamente, con respecto a su composición de azúcar, el contenido de grupos acilo y la cantidad de residuos sin azúcar (proteínas y cenizas), utilizando los métodos descritos en Freitas et al (2009). La composición química de todos los grados de pureza del polímero (nativo, semipurificado y purificado por diálisis) se analizó con el tiempo, durante la ejecución del cultivo.

Después de 1 día de cultivo, el polímero estaba constituido principalmente por glucosa (77 %) y galactosa (15 %), con cantidades más bajas de fucosa (6 %). A medida que avanzaba el cultivo, la proporción relativa de estos monómeros de azúcar cambió significativamente: el contenido de glucosa disminuyó gradualmente a 40 % en el día 4, y la cantidad relativa de galactosa y fucosa aumentó hasta 26 % y 28 %, respectivamente.

La composición de azúcar fue prácticamente constante en los últimos 3 días de operación (glucosa, 40-44 %; fucosa, 26-30 %; galactosa, 28-29 %).

También se observó una variación de la proporción relativa de los grupos acilo a lo largo del tiempo: varió de succinato al 2.4 %, piruvato al 0.2 % y acetato al 0.3 %, en el día 1, a succinato al 20 %, piruvato al 2.4 % y acetato al 2.0 % en el día 4. Posteriormente, en el día 7 se observó una disminución del contenido de succinato a 3.9 %, junto con un aumento de piruvato (4.9 %) y acetato (3.6 %).

La composición en términos de constituyentes de azúcar y grupos acilo es similar para los diferentes grados de pureza de polímeros. No ocurre lo mismo con el caso de proteínas y cenizas. El contenido de estos componentes disminuye del polímero nativo al semipurificado, y del último al polímero purificado.

Ejemplo 4: Producción del polímero que contiene fucosa mediante el cultivo de la bacteria *Enterobacter A47* (DSM 23139), usando subproducto de glicerol de la industria del biodiesel, bajo diferentes temperaturas y pH

El cultivo de *Enterobacter A47* (DSM 23139) se cultivó en biorreactores de 2 L, como se describe en el ejemplo 1, excepto por la temperatura y el pH que se controlaron bajo diferentes valores, de acuerdo con la Tabla 4. Al final de cada ejecución, el polímero se recuperó como se describe en el ejemplo 2.

Tabla 4: Valores de temperatura y pH probados.

Ejecución	Temp (° C)	pH	μ (h ⁻¹)	X _{max} (g/L)	EP S _{max} (g/L)	r _P (g/L.d)	Y _{P/S} (g.g ⁻¹)
1	30.0	7.0	0.30	7.14	8.37	5.00	0.17
2	30.0	7.0	0.32	7.58	10.13	4.94	0.21
3	20.0	6.0	0.14	7.41	0.82	0.19	0.01
4	40.0	6.0	0.34	9.20	2.59	0.81	0.03
5	20.0	8.0	0.13	8.39	4.40	2.54	0.10
6	40.0	8.0	0.22	5.63	1.62	1.34	0.04
7	15.9	7.0	0.08	8.17	1.12	0.33	0.02
8	44.1	7.0	-	0.21	0.23	0.06	0.02
9	30.0	5.6	0.10	10.62	7.50	2.05	0.09
10	30.0	8.4	0.07	3.01	2.67	2.38	0.09

- Se encontró que las condiciones que maximizan el crecimiento celular, producción de polímeros y productividad son temperaturas entre 25 y 34 ° C, y un pH controlado entre 6.5 y 7.5 (Tabla 5). Además, dentro de estos intervalos de temperatura y pH, el contenido del polímero en fucosa fue máximo. Fuera de estos intervalos, el cultivo ha sintetizado polímeros con diferentes composiciones, como, por ejemplo: reducción del contenido de fucosa (<14 %), concomitante con un aumento del contenido de glucosa (>50 %) y la adición de nuevos monómeros (por ejemplo, ramnosa y glucosamina) como componentes principales (hasta 20 % y hasta 10 %, respectivamente). El ácido glucurónico también se detectó en estos polímeros con un contenido de hasta el 15 %. El contenido de grupos acilo también se vio afectado por la temperatura y el pH durante el cultivo, reduciéndose a niveles inferiores al 10 % de la masa seca de los polímeros.
- 5
- 10 Referencias
- Canilha L, Silva DDV, Carvalho W, Mancilha M (2005) *Revista Analytica* 20, 332-341.
- Çelik E, Ozbay N, Oktar N, Çalk P (2008) *Ind Eng Chem Res* 47, 2985-2990.
- Freitas F, Alves VD, Carvalheira M, Costa N, Oliveira R, Reis MAM (2009) *Carbohydr Pol* 78, 549-556.
- Guetta O, Mazeau K, Auzely R, Milas M, Rinaudo M (2003a) *Biomacromol* 4, 1362-1371.
- 15 Guetta O, Milas M, Rinaudo M (2003b) *Biomacromol* 4, 1372-1379.
- Janda JM, Abbot SL (2007) *J Clin Microbiol* 45(9), 2761-2764.
- Joseleau JP, Marais MF (1979) *Carbohydr Res* 77, 183-190.
- Jukes TH, Cantor CR (1969) In *Mammalian protein metabolism*, N Munro, Academic Press, New York, pp 21-132.
- Kumar AS, Mody K, Jha B (2007) *J Basic Microbiol* 47, 103-117.
- 20 Kumar AS, Mody K (2009) *Microbial Production of Biopolymers and Polymer Precursors - Applications and Perspectives*. Caister Academic Press, Chapter 10.
- Maidak BL, Cole JR, Parker CT, Garrity GM, Larsen N, Li B, Lilburn TG, McCaughey MJ Olsen GJ, Overbeek R, Pramanik S, Schmidt S, Tiedje JM, Woese CR (1999) *Nucl Acids Res* 27, 171-173.
- Moreno J, Vargas MA, Olivares H, Rivas J, Guerrero MG (1998) *J Biotechnol* 60, 175-182.
- 25 Péterszegi G, Isnard N, Robert AM, Robert L (2003a) *Biomedicine Pharmacotherapy* 57, 187-194.
- Péterszegi G, Fodil-Bourahla I, Robert AM, Robert L (2003b) *Biomedicine Pharmacotherapy* 57, 240-245.
- Pruesse E, Quast C, Knittel, Fuchs B, Ludwig W, Peplies J, Glockner FO (2007) *Nucl Acids Res* 35, 7188-7196.
- Rainey FA, W-R N, Kroppenstedt RM, Stackenbrandt E (1996) *Int J Sys Bacteriol* 46, 1088-1092.
- Saitou N, Nei M (1987) *Mol Biol Evol* 4, 406-425.
- 30 Sutherland IW (2001) *Int Dairy J* 11, 663-674.
- van den Bulk RW, Zevenhuizen LPTM, Cordewener JHG, Dons JJM (1991) *Phytopathol* 81(6), 619-623.
- Vanhooren PT, Vandamme EJ (1999) *J Chem Technol Biotechnol* 74, 479-497.
- Listado de secuencias
- <110> Bio73100
- 35 73100
- 73100, Bio
- <120> Biopolímero bacteriano que contiene fucosa
- <130> PPI 42970/10
- <160> 1
- 40 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1

ES 2 806 933 T3

<211> 1523

<212> ADN

<213> Enterobacter

<400> 1

tgatcctggc	tcagattgaa	cgctggcggc	aggcctaaca	catgcaagtc	gaacggtaac	60
aggaagcagc	ttgctgcttc	gctgacgagt	ggcggacggg	tgagtaatgt	ctgggaaact	120
gcctgatgga	gggggataac	tactggaaac	ggtagctaata	accgcataay	gtcgcgaagac	180
caaagagggg	gaccttcggg	cctcttgcca	tcggatgtgc	ccagatggga	ttagctagta	240
ggtggggtaa	cggctcacct	aggcgacgat	ccctagctgg	tctgagagga	tgaccagcca	300
cactggaact	gagacacggt	ccagactcct	acgggaggca	gcagtgggga	atattgcaca	360
atgggcgcaa	gcctgatgca	gcatgcccgc	gtgtatgaag	aaggccttcg	ggttgtaaag	420
tactttcagc	ggggaggaag	gcgataaggt	taataacctt	gtcgattgac	gttaccgcga	480
gaagaagcac	cggctaactc	cgtgccagca	gccgcggtaa	tacggagggg	gcaagcgtta	540
atcggaatta	ctgggcgtaa	agcgcacgca	ggcggctctgt	caagtcggat	gtgaaatccc	600
cgggctcaac	ctgggaactg	cattcgaaac	tggcaggcta	gagtcttgta	gaggggggta	660
gaattccagg	tgtagcggtg	aatgcgtag	agatctggag	gaataccggt	ggcgaaggcg	720
gccccctgga	caaagactga	cgctcaggtg	cgaaagcgtg	gggagcaaac	aggattagat	780
acctggttag	tccaogccgt	aaacgatgtc	gacttgaggg	ttgtgccctt	gaggcgtggc	840
ttccggagct	aacgcgttaa	gtcgaccgcc	tggggagtac	ggccgcaagg	ttaaaactca	900
aatgaattga	cgggggcccg	cacaagcggg	ggagcatgtg	gtttaattcg	atgcaacgcg	960
aagaacctta	cctactcttg	acatccagag	aactttccag	agatggattg	gtgccttcgg	1020
gaactctgag	acaggtgctg	catggctgtc	gtcagctcgt	gttgtgaaat	gttggggttaa	1080
gtcccgcaac	gagcgcaacc	cttatccttt	gttgccagcg	gtyaggcccg	gaactcaaag	1140
gagactgcca	gtgataaact	ggaggaaggt	ggggatgacg	tcaagtcatc	atggccctta	1200
cgagtagggc	tacacacgtg	ctacaatggc	gcatacaaag	agaagcgacc	tcgcgagagc	1260
5 aagcggacct	cataaagtgc	gtcgtagtcc	ggattggagt	ctgcaactcg	actccatgaa	1320
gtcggaatcg	ctagtaatcg	tggatcagaa	tgccacggtg	aatacgttcc	cgggccttgt	1380
acacaccgcc	cgtcacacca	tgggagtggg	ttgcaaaaga	agtaggtagc	ttaaccttcg	1440
ggagggcgct	taccactttg	tgattcatga	ctgggggtgaa	gtcgtaaaca	ggtaaccgta	1500
gggaacctgc	gggctggatc	acc				1523

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar un polímero que comprende un polisacárido que contiene fucosa, en donde el polímero se obtiene mediante el cultivo de la bacteria *Enterobacter A47*, con número de acceso DSM 23139, el proceso comprende las siguientes etapas:
- 5 a) una fase por lotes que comprende cultivar la bacteria *EnterobacterA47* con número de acceso DSM 23139 en un medio de cultivo en un biorreactor agitado y aireado, en donde el medio de cultivo comprende una fuente de carbono que comprende glicerol o mezclas que contienen glicerol, una fuente de nitrógeno y sales inorgánicas;
- b) una fase alimentada por lotes que comprende cultivar la bacteria *Enterobacter A47* bajo condiciones de disponibilidad de carbono y limitación de nitrógeno;
- 10 y en donde la temperatura durante la fase por lotes y la fase alimentada por lotes se controla entre 15 y 45 °C y el pH se controla entre 5.0 y 9.0.
2. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:
 - a) la concentración inicial de oxígeno disuelto en el medio de cultivo bacteriano es superior al 70 %;
 - 15 b) la concentración de oxígeno disuelto se controla a niveles inferiores al 30 %, mientras se mantiene la fuente de nitrógeno limitada a cantidades inferiores a 0.1 g/L y se suministra la fuente de carbono para que coincida con su rata de consumo microbiano.
3. Proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-2 en donde el medio mineral se introduce en el biorreactor durante la fase alimentada por lotes.
- 20 4. Proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-3 en donde la temperatura de la etapa de cultivo se controla entre 25 y 34 ° C, y el pH se controla entre 6.5 y 7.5.
5. Proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, en donde el caldo de cultivo al final de la etapa de cultivo se seca a una temperatura de hasta 80 °C o se liofiliza.
6. Proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, en donde el caldo de cultivo después de la etapa de extracción se precipita mediante la adición de 1-3 volúmenes de agente precipitante por cada litro de caldo.
- 25 7. Proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, en donde el polímero se purifica adicionalmente mediante técnicas de diálisis, ultrafiltración o diafiltración.
8. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1-7, en donde el volumen de la bacteria *Enterobacter A47* con el número de acceso DSM 23139 inoculado en el medio es entre 10 y 30 % del medio de reacción total al comienzo del cultivo.
- 30 9. Proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-8, en donde la fuente de carbono es un residuo o subproducto alimentario o industrial.
10. Proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-9, en donde la fuente de carbono está entre 2 y 10 % (p/v) del medio de cultivo, durante la fase por lote, y superior al 0.1 % (p/v) en la fase alimentada por lotes.
11. Proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-10, en donde la fuente de nitrógeno tiene una concentración inicial entre 0.6 y 3.0 g/L, durante la fase por lote, y está por debajo de 0.3 g/L en la fase alimentada por lotes.
- 35 12. Un polímero con un peso molecular promedio de 10^6 - 10^7 , obtenible por el proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde este comprende fucosa en una cantidad de al menos 10 %, una cantidad de glucosa entre 20 %-70 %, una cantidad de galactosa entre 10-40 %, una cantidad de ácido glucurónico hasta el 15 % del contenido total de carbohidratos y los grupos acilo representan hasta el 25 % del peso seco del polímero.
- 40 13. Polímero de acuerdo con la reivindicación 12 anterior, en donde los grupos acilo son succinato y/o piruvato y/o acetato.
14. Polímero de acuerdo con la reivindicación 12-13, en donde los compuestos acilados comprenden cantidades de succinato de hasta 20 %, piruvato y/o acetato en cantidades de hasta 5 % del peso seco del polímero.
15. Polímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en donde este tiene un contenido de al menos 5 % en azúcares neutros, seleccionados entre ramnosa, manosa, glucosamida y/o ácido glucurónico.
- 45 16. Polímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-15, que tiene un comportamiento de fluido pseudoplástico en medios acuosos, con viscosidad estable bajo temperaturas de hasta 80 ° C, pH entre 3-10 y concentración iónica de hasta NaCl al 20 %.
17. Polímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-15, que es insoluble en disolventes orgánicos.

18. Polímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-17, que tiene una capacidad de formación y estabilización de emulsión contra varios compuestos hidrófobos, seleccionados de aceites e hidrocarburos vegetales y minerales, siendo la emulsión estable al calentamiento a temperaturas de hasta 100 °C.
19. Polímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-17, que tiene actividad de floculación.
- 5 20. Películas, recubrimientos y empaques que comprenden el polímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-19.
21. Películas compuestas biodegradables que comprenden el polímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-19.
- 10 22. Microesferas para liberación controlada de fármacos que comprenden el polímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-19.
23. Formulaciones farmacéuticas y/o cosméticas que comprenden el polímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-19.
24. Uso del polímero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-19 en la industria agroalimentaria, en las industrias farmacéutica y cosmética y/o en el tratamiento de residuos.

15

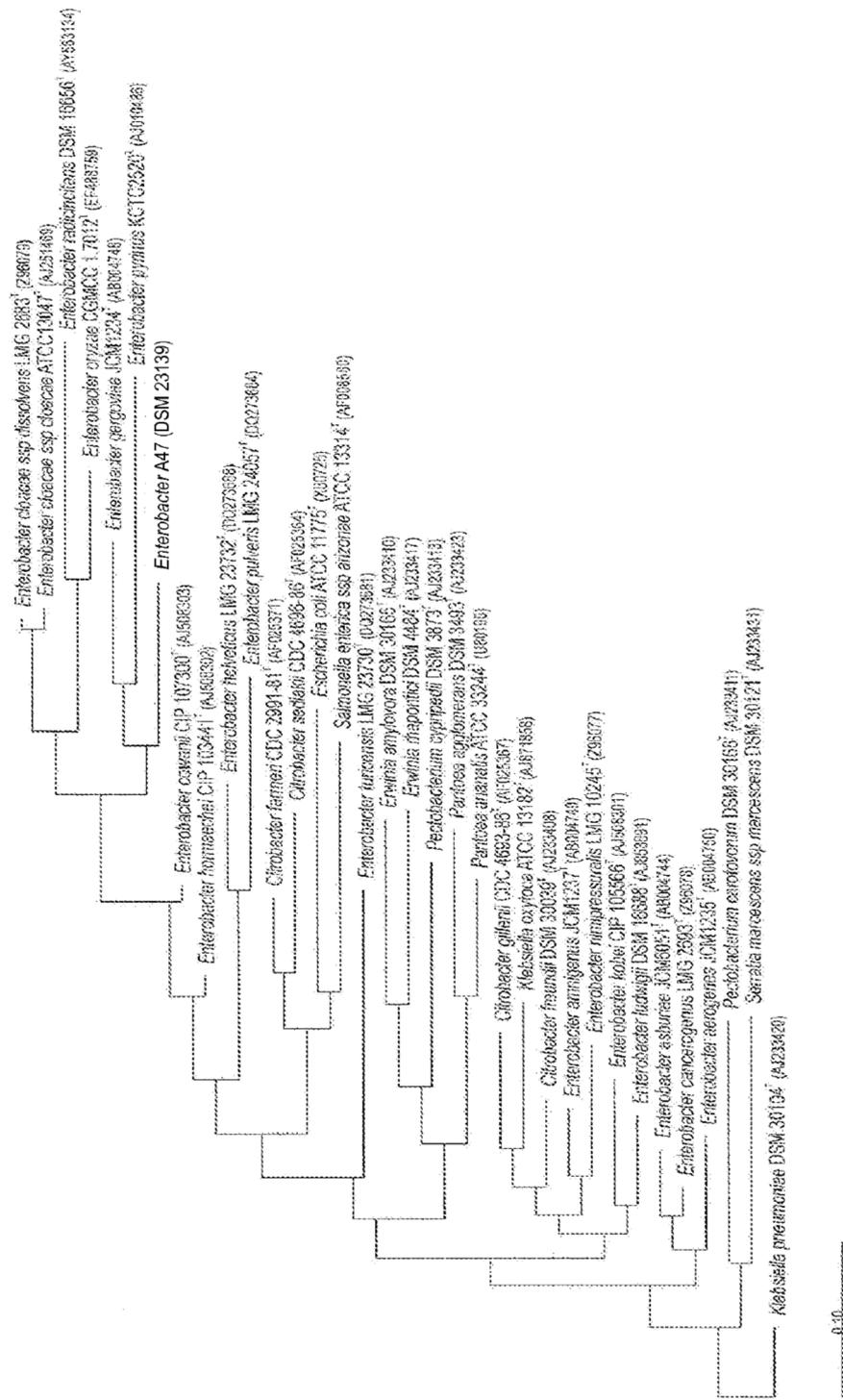


FIG. 1

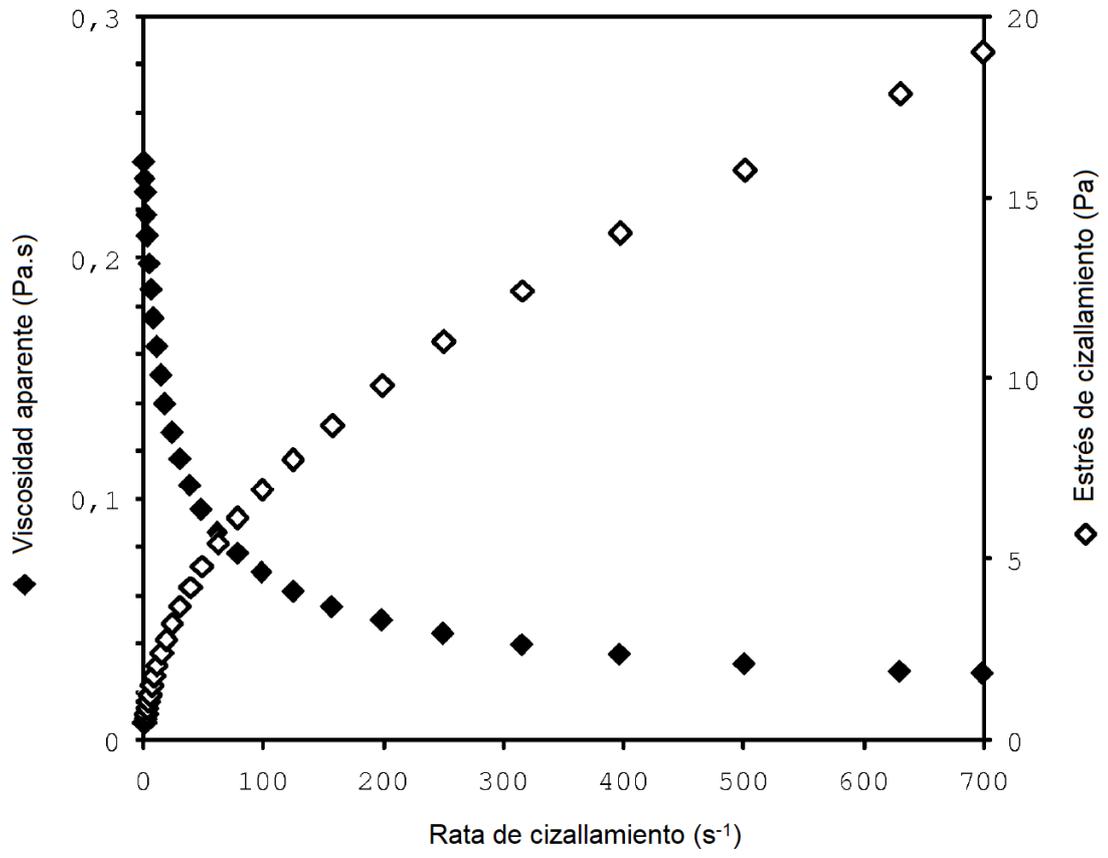


FIG. 2

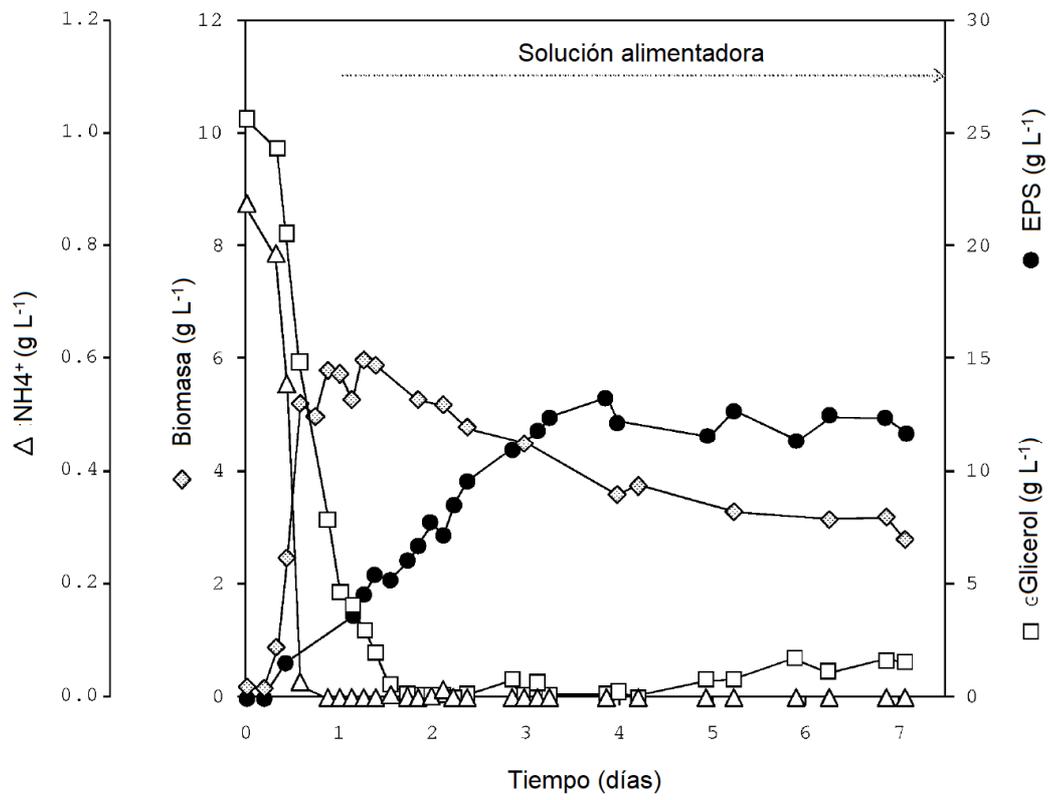


FIG. 3