



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 323 025**

51 Int. Cl.:  
**C08B 37/00** (2006.01)  
**C12N 1/20** (2006.01)  
**C12P 19/26** (2006.01)  
**B01F 17/00** (2006.01)  
**C11D 17/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **98123614 .4**  
96 Fecha de presentación : **10.12.1998**  
97 Número de publicación de la solicitud: **0924221**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.06.1999**

54 Título: **Nuevo biotensioactivo de lipopolisacárido.**

30 Prioridad: **19.12.1997 IT MI97A2809**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.07.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.07.2009**

73 Titular/es: **ENI S.p.A.**  
**Piazzale E. Mattei 1**  
**00144 Rome, IT**

72 Inventor/es: **Prosperi, Giulio;**  
**Camilli, Marcello;**  
**Crescenzi, Francesco;**  
**Fascetti, Eugenio;**  
**Porcelli, Filippo y**  
**Sacceddu, Pasquale**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 323 025 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

Nuevo biotensioactivo de lipopolisacárido.

5 La presente invención se refiere a un nuevo biotensioactivo de lipopolisacárido, a una cepa de *Acinetobacter calcoaceticus* que produce este biotensioactivo, a un procedimiento para la preparación del biotensioactivo y a su utilización en los campos energético y medioambiental.

10 Son bien conocidos los fenómenos que resultan de la fuga de contaminantes de hidrocarburo en entornos acuosos. El principal mecanismo con el que reacciona el ecosistema frente a la contaminación por hidrocarburos consiste en la biodegradación por la flora hidrocarbonoclasta.

15 El petróleo, que en condiciones normales es un líquido que es sustancialmente inmisible en agua, tiende a extenderse sobre la superficie del agua en forma de una capa fina (“mancha”).

20 Con respecto a la biodegradación, debe considerarse como positivo cualquier fenómeno que pueda romper y dispersar la “mancha”. De hecho, una solubilización parcial o adhesión sobre partículas sólidas en suspensión o el emulsionamiento en agua favorece la acción de microorganismos a los que se les facilita una superficie de unión más amplia.

25 Basándose en estas consideraciones, se ha producido una amplia gama de agentes emulsionantes/dispersantes sintéticos, cuya utilización sin embargo es todavía objeto de opiniones opuestas debido a la toxicidad y persistencia en el medio ambiente de estos productos.

30 Esto explica que en los últimos años se haya estudiado ampliamente la posibilidad de utilizar biotensioactivos de origen microbiano. De hecho, los biotensioactivos son biodegradables y, por lo tanto, potencialmente menos tóxicos que los compuestos sintéticos utilizados en la actualidad.

35 Un grupo de biotensioactivos de particular interés está representado por biopolímeros de lipopolisacárido producidos a partir de cepas de *Acinetobacter calcoaceticus*.

40 En la actualidad, el único producto disponible en el mercado es Emulsan, un lipopolisacárido polianiónico obtenido mediante la fermentación de la cepa *Acinetobacter calcoaceticus* RAG1 ATCC 31012 (patente US nº 3.941.692, patente US nº 4.395.354).

45 Este biotensioactivo es responsable de la formación y estabilización de emulsiones de aceite/agua y se utiliza esencialmente para el transporte de petróleos crudos pesados en asociación con agentes tensioactivos sintéticos (documento PCT WO 8501.889) y para la limpieza de tanques.

50 Emulsan también puede utilizarse en campos tales como los cosméticos (documentos EP 242.296, DE 3.610.384, JP 62.286.914, JP 62.289.508) y los detergentes (documento JP 62.297.397).

55 Es conocido que la dispersión de aceite en agua producida por un biotensioactivo, además de aumentar la superficie de la interfase agua/aceite, también modifica sus características. Esto puede provocar una variación en la afinidad entre la superficie del aceite y los microorganismos.

60 En particular, puede cambiar la afinidad de la flora hidrocarbonoclasta cuya adhesión a la interfase agua/aceite es una suposición esencial para la activación de procesos de biodegradación.

65 Actualmente, no es posible predecir *a priori* si un agente dispersante mejorará o inhibirá la adhesión de células a hidrocarburos, principalmente debido a que el fenómeno está gobernado por complejas interacciones entre la membrana celular y la superficie del aceite.

70 Sin embargo, puede suponerse que los biotensioactivos de lipopolisacárido, debido a su estructura lineal y alto peso molecular, modifican enormemente las características de la interfase agua/aceite, determinando así una variación significativa en la capacidad de adhesión de los microorganismos.

75 De hecho se ha descubierto que el biotensioactivo polimérico Emulsan inhibe la adhesión de microorganismos a la interfase agua/aceite [E. Rosenberg *et al.*, Infect. Immun., 39, 1024-1028 (1983)]. En otras palabras, la superficie del aceite cubierta con el biotensioactivo se vuelve menos análoga a la biomasa y se reduce la capacidad de adhesión a la misma.

80 También se ha observado que Emulsan reduce la biodegradación de alcanos lineales y otros hidrocarburos saturados, así como compuestos aromáticos, en un 50÷90%, por parte de cultivos mixtos o cultivos purificados, [J.M. Foght *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 55, 36-42 (1989)].

85 Como resultado, este grupo de agentes emulsionantes no es adecuado para resolver problemas de tipo ambiental que pueden tener lugar en el caso de escape de petróleos crudos en agua.

## ES 2 323 025 T3

Ahora se ha descubierto que es posible superar las desventajas de la técnica conocida descrita anteriormente mediante la utilización de una nueva cepa de *Acinetobacter calcoaceticus*.

5 En particular, esta cepa produce un biotensioactivo de lipopolisacárido hexocelular (también indicado en la presente memoria con el término EPS) que presenta una excelente capacidad para formar y estabilizar emulsiones de aceite/agua y al mismo tiempo favorece la adhesión de microorganismos a la interfase agua/aceite y promueve la biodegradación de hidrocarburos en agua.

10 Se depositaron muestras de esta cepa el 22.07.1997, en el Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) donde recibieron el número de depósito CBS 962.97.

En consecuencia un objeto de la presente invención se refiere a la cepa *A. calcoaceticus* CBS 962.97.

15 Otro objeto de la presente invención se refiere a un biotensioactivo obtenido a partir de *A. calcoaceticus* CBS 962.97.

Un objeto más de la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de este biotensioactivo caracterizado por la utilización de la cepa *A. calcoaceticus* CBS 962.97.

20 Otro objeto de la presente invención se refiere a la utilización del biotensioactivo así obtenido en los campos energético y medioambiental.

Otros objetos de la presente invención resultan evidentes a partir de la descripción y los ejemplos siguientes.

25

### Descripción de las figuras

Figura 1: Espectro de FT-IR de EPS II en estado sólido en una pastilla de KBr.

30 Figura 2: Espectro de RMN de EPS II hidrolizado con HCl 5 M a 105° durante 4 horas y luego extraído con éter.

Figura 3: Parte de la figura 2 que comprende desde 4,5 hasta 5,5 ppm. Pueden observarse 3 hidratos de carbono a partir de las tres parejas de dobletes referentes a las formas  $\alpha$  y  $\beta$  en las que A,A' = 2-amino-2,6-didesoxialdohexosa, B,B' = glucosamina y C,C' = hidrato de carbono sin identificar, S = disolvente.

35

Figura 4: Espectro de RMN de protón de 2-amino-2,6-didesoxialdohexosa que representa el constituyente principal del esqueleto del polisacárido de EPS II.

### 40 Descripción detallada de la invención

Con el fin de aislar una cepa microbiana productora de biotensioactivo que puede emulsionar productos del petróleo, se utilizaron muestras de suelo tomadas de lugares contaminados por hidrocarburos (petróleo crudo, gasóleo y gasolina).

45

Se llevó a cabo el aislamiento mediante fases sucesivas de enriquecimiento y purificación en tierra salina que contenía un hidrocarburo (por ejemplo fueloil, petróleo crudo, aceite de vaselina, n-hexadecano o gasóleo) como única fuente de carbono según el procedimiento de Bushnell-Haas (J. Bacteriol., 41, 653-673 (1940)), aunque pueden utilizarse otras técnicas convencionales.

50

Se sometió a prueba la capacidad emulsionante de los diversos fenotipos, de manera preliminar, por medio del "ensayo de grietas" [Krigsvoll *et al.*, "Microbial emulsification of crude oil" en las Actas del 5° Congreso Europeo de Biotecnología, vol. I, páginas 221-224, Copenhagen, julio de 1990].

55

El procedimiento consiste en poner un cultivo puro en contacto con un hidrocarburo, por ejemplo, petróleo crudo, y en verificar la fractura del menisco de aceite que se obtiene en presencia de un biotensioactivo.

Los resultados obtenidos mostraron la presencia de una única cepa con una alta capacidad emulsionante. Esta cepa se distinguió de manera preliminar con la abreviatura ER-96.

60

Para la caracterización de la cepa ER-96, se hizo referencia a los procedimientos descritos en Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. I, página 306, Krieg & Holt Eds., 1984, Williams & Wilkins, Baltimore, y en "The Biology of *Acinetobacter*", Towner, Bergogne-Bérézin and Fewson eds., 1991, Plenum Press, Nueva York. A continuación en la presente memoria, se proporciona una lista de las características taxonómicas de la cepa ER-96:

65

## ES 2 323 025 T3

### A) Características morfológicas y de tinción

5	Reacción GRAM	Negativa
	Morfología celular	Cocoide en fase estacionaria
	Dimensiones celulares ( $\mu\text{m}$ )	0,8 x 1,8 (células pleomorfas)
	Movilidad	Negativa
10	Producción de cápsulas	Positiva

### B) Características de cultivo

15	Colonia sobre agar nutritivo	Circular
	Cromogénesis sobre agar	Negativa
	Elevación de las colonias	Convexa
20	Superficie de las colonias	Lisa
	Borde de las colonias	Completo
	Capacidad de emulsión de las colonias	Positiva
	Temperatura	30°C
25	pH	7.

### C) Características fisiológicas

30	Citocromo oxidasa	Negativa
	Catalasa	Positiva
35	Ox/F, según Leifson	Oxidante
	Prueba con rojo de metilo	Negativa
	Ureasa	Negativa
	Gelatinasa, según Kohn	Negativa
40	Fosfatasa alcalina	Positiva
	Esterasa-lipasa	Positiva
	Tripsina	Negativa
	Fosfatasa ácida	Positiva
45	Naftol-fosfohidrolasa	Positiva
	$\alpha$ -galactosidasa	Negativa
	$\beta$ -galactosidasa	Negativa
	Indol a partir de triptófano	Negativa
50	Acetoína a partir de piruvato	Positiva
	Reducción de nitrato $\rightarrow$ nitrito	Negativa
	Reducción de nitrato $\rightarrow$ $\text{N}_2$	Negativa

55

60

65

## ES 2 323 025 T3

### D) Utilización de fuentes de carbono

	Glicerol	-	Arbutina	-	D-Fucosa	+
	Eritritol	-	Esculina	-	L-Fucosa	-
5	D-Arabinosa	+	Celobiosa	-	L-Arabitol	-
	Ribosa	+	Maltosa	-	Gluconato	-
	D-Xilosa	-	Lactosa	-	2-ceto-gluconato	-
	L-Xilosa	-	Melibiosa	+	5-ceto-gluconato	-
10	Adonitol	-	Sacarosa	-	Caprato	+
	Galactosa	+	Trealosa	-	Adipato	+
	Glucosa	+	Inulina	-	Malato	+
	Fructosa	-	Melecitosa	-	Fenil-Acetato	+
15	Manosa	+	Rafinosa	-	Citrato	+
	Sorbosa	-	Almidón soluble	-	Etanol	+
	Ramnosa	-	Glucógeno	-	Acetato de Ca	±
	Dulcitol	-	Xilitol	-	Hexadecano	+
20	Inositol	-	Gentiobiosa	±	Aceite de oliva	+
	Manitol	-	Turanosa	-	Tween-80	+
	Sorbitol	-	D-Lisosa	-		
	Amigdalina	-	D-Tagatosa	-		

25 donde: + = asimilación positiva; - = asimilación negativa; ± = asimilación débil

Basándose en los resultados de las pruebas morfológicas, fisiológicas y en cultivo, fue posible asignar la cepa ER-96 de la presente invención al grupo *Acinetobacter* y, más específicamente, a la especie *Acinetobacter calcoaceticus*.

El examen de la cepa ER-96 también mostró características que la distinguen de otras cepas de *A. calcoaceticus* descritas en la bibliografía de patentes: *A. calcoaceticus* RAG-1 (Rosenberg, E.), productora de Emulsan; *A. calcoaceticus* 217 (Tanaka, Y.), productora de un nuevo biotensioactivo (documento EP-401700).

Las características de las cepas ER-96, RAG-1 y 217 se indican en la tabla 1 a continuación:

TABLA 1

		ER-96	RAG-1	217
40	Dimensiones celulares promedio en $\mu\text{m}$ (células pleomorfas)	0,8x1,8	1,3x3,3	1,8x2,6
	<u>Características fisiológicas distintivas</u>			
45	Gelatinasa	-	+	+
	Reducción de nitratos a nitritos	-	+	+
	Reducción de nitratos a $\text{N}_2$	-	n.d.	+
	Producción de indol	-	n.d.	+
50	Utilización de $\text{NH}_4^+$	+	+	-
	Ureasa	-	-	+
	Prueba Ox./Ferm.	Oxidativa	n.d.	Fermentativa
	Lisina descarboxilasa	-	n.d.	+
	<u>Asimilación de diversas fuentes de carbono</u>			
55	L-Arabinosa	+	+	-
	D-Xilosa	-	+	-
	D-Manosa	+	+	-
	D-Fructosa	-	+	+
60	Galactosa	+	+	-
	D-Maltosa	-	+	+
	Sacarosa	-	+	+
	Trealosa	-	+	+
65	D-Manitol	-	+	+
	Glicerol	-	+	-

donde: + = actividad positiva; - = actividad negativa; n.d. = dato no disponible

## ES 2 323 025 T3

### *Producción y propiedades del biotensioactivo*

Se ha observado que cuando se cultiva la cepa ER-96 en un medio líquido usando un hidrocarburo tal como, por ejemplo, n-hexadecano, petróleo crudo, gasóleo u otros productos, como fuente de carbono, ésta se emulsiona a medida que crecen las células.

Si se cultiva la cepa ER-96 usando una fuente de carbono que es soluble en agua, tal como etanol por ejemplo, no puede observarse directamente el emulsiónamiento, pero si se añaden hidrocarburos al cultivo, éstos se emulsionan inmediatamente.

También se ha observado que si se cultiva la cepa ER-96 usando etanol como fuente de carbono, y durante la fermentación se toman alícuotas del caldo de cultivo y se retiran las células, por ejemplo, mediante centrifugación, el sobrenadante sin células emulsiona los hidrocarburos de una manera muy estable y esta capacidad aumenta hasta el final de la fermentación. Este resultado indica que el biotensioactivo producido por la cepa ER-96 se libera en el caldo de fermentación.

Las emulsiones de hidrocarburos en agua obtenidas usando el biotensioactivo producido por la cepa ER-96 permanecen estables durante meses. Durante un periodo de tiempo y en condiciones estáticas, las gotas de aceite dispersas ascienden hasta la superficie debido a la menor densidad pero no hay coalescencia y la crema formada puede redispersarse muy fácilmente.

La producción del biotensioactivo puede seguirse midiendo la capacidad emulsionante del caldo de fermentación.

Para este fin, pueden utilizarse diversos métodos que consisten en diluir una alícuota de caldo de cultivo, sin células, con agua o con un tampón adecuado, añadir una cierta cantidad de hidrocarburos, agitar esta mezcla y medir la turbidez de la emulsión.

El sistema, que es extremadamente reproducible, utilizado en la presente invención es una variación del procedimiento descrito por Gutnick *et al.* [documento EP 16.546]: se añaden 50  $\mu$ l de una mezcla de hexadecano y 2-metilnaftaleno (1:1) a 3,25 ml de una disolución de biotensioactivo en tampón tris-hidroximetilaminometano 20 mM, pH 7,2, que contiene  $MgSO_4$  10 mM y se agita la mezcla completa; se mide la densidad óptica de la emulsión a 620 nm en una cubeta con un camino óptico de 1 cm.

Las unidades de capacidad emulsionante de Eniricerche (1 UE) se refieren a la cantidad de biotensioactivo que en las condiciones descritas anteriormente, producen una densidad óptica de 1.

En consecuencia, la capacidad emulsionante especificada se define como la capacidad emulsionante de 1 mg de producto.

Continuando la investigación, se descubrió que sometiendo el caldo de fermentación sin células y que contiene el biotensioactivo, a diálisis, éste no se dializa, lo que indica la naturaleza polimérica de este biotensioactivo.

El caldo de fermentación sin células y liofilizado se indicó con la expresión EPS bruto.

Para determinar la estructura y las propiedades del biotensioactivo, se aisló éste y se purificó.

Pueden utilizarse diversas técnicas para este fin, tales como por ejemplo precipitación selectiva con sulfato de amonio, concentración y desalación del caldo de fermentación por medio de membranas de ultrafiltración en espiral tales como, membranas planas o de fibras huecas, o también absorción selectiva sobre un soporte sólido.

Según una forma de realización de la presente invención, se hizo precipitar el biotensioactivo polimérico mediante la adición de sulfato de amonio al caldo de fermentación. El precipitado obtenido con concentraciones de sulfato de amonio que oscilaban desde el 30 hasta el 40% del valor de saturación, recuperado mediante centrifugación, dializado frente a agua y liofilizado se denominó EPS.

Se demostró que este biotensioactivo consiste en aproximadamente el 20-25% en peso de proteínas (kit de ensayo de proteína Bio-Rad), aproximadamente el 65-70% en peso de un lipopolisacárido y el porcentaje restante de iones metálicos, esencialmente magnesio y sodio.

Se demostró que la capacidad emulsionante específica de EPS es de 93 UE/mg (correspondiente a 428 UG/mg, en el que UG se refiere a las unidades definidas por Gutnick *et al.* [documento EPA 16546] para Emulsan que corresponde a 330 UG/mg).

### *Purificación y caracterización del lipopolisacárido*

Para facilitar la caracterización fisicoquímica y estructural del lipopolisacárido presente en el biotensioactivo, se purificó EPS adicionalmente para eliminar cualquier posible contaminación por parte de ácidos nucleicos y para separar el lipopolisacárido de las proteínas y los iones metálicos.

## ES 2 323 025 T3

La retirada de los ácidos nucleicos puede llevarse a cabo enzimáticamente con una nucleasa, mientras que puede retirarse la fracción proteica mediante digestión enzimática o tratamiento con fenol caliente o mediante una combinación de ambos.

5 Según una forma de realización de la presente invención, el EPS, sin ácidos nucleicos, se trató en primer lugar con una proteasa y luego con fenol caliente según el procedimiento de O. Westphal & K. Jann [“Methods in Carbohydrate Chemistry”, R.L. Whistler Ed., vol. V, páginas 83-91, Academic Press, Nueva York, 1965].

10 Se lavó el extracto acuoso con etil éter, posteriormente se dializó frente a agua, EDTA sódico, agua, NaCl, agua, HCl, agua, y luego se liofilizó. El biotensioactivo de lipopolisacárido sin proteínas se denominó EPS II.

Se demostró que la capacidad emulsionante específica de EPS II es aproximadamente la mitad (48 UE/mg) de la de EPS.

15 La caracterización fisicoquímica de EPS II proporcionó los siguientes resultados:

- un peso molecular, determinado por HPLC-SEC (cromatografía de exclusión por tamaños), de aproximadamente 1.556.400 daltons.

20 - análisis elemental (%): C = 44,5; H = 7,33; N = 4,99; O = 40,6; S = 0.

- *espectro infrarrojo* (FT-IR).

25 Haciendo referencia a la figura 1: 3418  $\text{cm}^{-1}$  (OH, NH); 2924-2854  $\text{cm}^{-1}$  (CH); 1735  $\text{cm}^{-1}$  (CO de ácido y éster) 1656-1550  $\text{cm}^{-1}$  (CO de amida); 1037  $\text{cm}^{-1}$  (COC glucosídico).

- *Análisis de RMN*

30 El análisis de EPS II tal cual disuelto en  $\text{D}_2\text{O}$  (agua deuterada) mostró la estructura de un polisacárido que contiene cadenas alifáticas; además de la presencia de grupos metileno, se observan señales muy intensas relacionadas con la presencia de grupos metilo y acetilo.

35 - *Azúcares aminados*

Se determinaron los azúcares aminados en EPS II hidrolizado con el procedimiento de Z. Dische [Methods of Biochem. Anal., 2, 352-358 (1967)] que consiste en desaminar los azúcares con ácido nitroso, destruir el reactivo en exceso con carbamato de amonio y hacer reaccionar los azúcares desaminados con indol en HCl.

40 - Se determinaron *otros azúcares* con el procedimiento de Dubois *et al.*, [Anal. Chem. 28, 350-356 (1956)] usando un patrón de glucosa.

45 - Se demostró la ausencia de *glucosa* determinada con la prueba UV de Boehringer (hexocinasa, ATP, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y NADP).

- *Ácidos grasos esterificados* [I. Stern & B. Shapiro, J. Clin. Path., 6, 158-160 (1953)]; patrón de dipalmitato de sacarosa (SERVA): los radicales ácido esterificados mediante reacción con hidroxiamina se transforman en ácidos hidroxámicos que proporcionan una coloración púrpura con cloruro férrico.

50 Se demostró que EPS II consiste en un esqueleto de heteropolisacárido unido mediante un enlace éster a una fracción lipídica que consiste en radicales ácido saturados y/o insaturados con una longitud de la cadena lipófila de 10 a 18 carbonos y en el que dicha fracción consiste en aproximadamente el 5-20% de lipopolisacárido.

55 Para identificar los constituyentes de la fracción lipídica se llevó a cabo una hidrólisis alcalina del EPS II con el fin de obtener directamente ésteres metílicos de ácidos grasos (según el protocolo n° 969.33 de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales [“Official Methods of Analysis of AOAC International”, P. Cunnif Ed., 16ª ed., vol. II, n° 41,1.28, AOAC Int. (1995)].

60 En la práctica se trató el EPS II en el punto de ebullición con metanol-sosa en presencia de trifluoruro de boro como catalizador para la formación de ésteres metílicos de ácidos grasos. Posteriormente se extrajeron los ésteres con n-heptano y se identificaron los ácidos grasos mediante cromatografía de gases / espectrometría de masas.

65 Los resultados mostraron la presencia de ácido dodecanoico (ácido láurico) como producto principal, ácido 3-hidroxi-dodecanoico como producto secundario y cantidades menores de ácidos 2-hidroxidodecanoico, hexadecanoico (ácido palmítico), octadecanoico (ácido esteárico) y octadecenoico (ácido oleico).

## ES 2 323 025 T3

Una comparación con Emulsan mostró las siguientes diferencias:

TABLA 2

Ácido graso	EPS II	Emulsan
	% de ácidos grasos totales	
decanoico (cáprico)	-	11,4
dodecanoico (láurico)	69,8	23,0
dodecenoico	-	2,4
2-hidroxidodecanoico	2,6	10,5
3-hidroxidodecanoico	20,3	39,5
hexadecanoico	2,0	0,7
hexadecenoico	-	trazas
octadecanoico	0,8	0,3
octadecenoico	0,9	trazas
no identificado	3,9	12,0

Aunque la cantidad de ácidos grasos puede variar entre muestras y en relación con las condiciones de crecimiento, el ácido dodecanoico y el ácido 3-hidroxi-dodecanoico están siempre presentes como productos principales y dentro de un intervalo del 95 al 50% y el ácido dodecanoico es generalmente predominante con respecto a ácido 3-hidroxi-dodecanoico.

Se llevó a cabo la caracterización del esqueleto del polisacárido de EPS II mediante hidrólisis ácida del polímero, en una atmósfera inerte, incubando a 105°C durante 4 horas. Tras el enfriamiento se retiró el ácido a vacío, se rompió el precipitado resultante y se extrajo con etil éter, y entonces se disolvió en D<sub>2</sub>O y se sometió a análisis de RMN.

El espectro de RMN del protón completo se indica en la figura 2, mientras que la figura 3 muestra una ampliación de la región del espectro anterior (figura 2) entre 4,5 y 5,5 ppm, que comprende las señales de los protones referentes a carbono en la posición 1 de monosacáridos en general.

Estas señales generalmente son dobles debido a la presencia simultánea en disolución de formas anoméricas  $\alpha$  y  $\beta$  del monosacárido. El espectro de la figura 3 muestra 3 pares de dobletes referentes a 3 especies de monosacáridos, uno de los cuales es predominante con respecto a los otros dos.

Para identificar los monosacáridos que forman el esqueleto de polisacárido de EPS II se llevó a cabo una hidrólisis ácida preparativa. En primer lugar, se determinaron las condiciones de hidrólisis más adecuadas incubando alícuotas de EPS II a 100°C durante diversos tiempos con diferentes concentraciones de HCl. Se siguieron las hidrólisis por la determinación tanto de azúcares aaminados como de azúcares reductores [J.T. Park & M.J. Johnson, J. Biol. Chem., 181, 149 (1949)]. Se identificaron las mejores condiciones en una hidrólisis con HCl 0,5 M durante 6 horas.

Basándose en estos resultados, se disolvió el EPS II en HCl 0,5 M, y bajo una cubierta de gas de N<sub>2</sub>, se sometió a ebullición con reflujo durante 6 horas. Se enfrió la disolución, se concentró a vacío y se extrajo tres veces con volúmenes iguales de etil éter. Posteriormente se evaporó la disolución, entonces, se diluyó con agua y volvió a concentrarse a vacío; se repitió este tratamiento tres veces antes del secado.

Se añadió el producto seco a agua y entonces se trató según el esquema descrito por R.W. Weath [Methods Enzymol., 8, 60-78 (1966)]. Se cargó el producto hidrolizado en una columna de resina catiónica fuerte en forma de de H<sup>+</sup> y posteriormente se eluyó la columna con agua hasta que el pH del eluato había retornado a la neutralidad.

La fracción no retenida por la resina y que estaba constituida por azúcares neutros y/o ácidos se caracterizó sólo parcialmente: se encontró una reacción positiva para la prueba de Dubois, negativa para la prueba de azúcar aaminado, positiva para ácidos urónicos [T. Bitter & H.H. Muir, Anal. Biochem., 4, 330-334 (1962)].

La columna, sobre la cual se habían fijado los aminoazúcares, se eluyó de manera isocrática con HCl 0,3 M. Se analizaron las fracciones recogidas para los azúcares reductores y se observaron dos picos cromatográficos. Las fracciones referentes a los picos se juntaron, se secaron y se añadieron a agua varias veces para retirar el HCl y entonces se liofilizaron y se sometieron a análisis de RMN.

El primer pico se identificó como glucosamina: el espectro de RMN del protón era igual al de una muestra comercial de glucosamina-HCl (Fluka). El espectro del segundo pico (figura 4) concordaba con el de una aminohexosa con un metilo en la posición 6 (en lugar de -CH<sub>2</sub>OH), más específicamente, se demuestra que el compuesto es una 2-amino-2,6-didesoxialdohexosa y representa aproximadamente el 70-80% del esqueleto de polisacárido.

## ES 2 323 025 T3

La presencia del grupo amino en la posición 2 también se confirmó mediante la reacción Randle-Morgan que generó un cromóforo con absorción máxima a 530 nm [C.J.M. Randle & W.T.J. Morgan, *Biochem. J.*, 61, 586 (1955); N. Suzuki, *Biochem. Biophys. Acta*, 177, 371-373 (1969)].

5 En conclusión, los resultados experimentales indican que el lipopolisacárido comprende una cadena de heteropolisacárido que consiste en el 70-80% de una 2-amino-2,6-didesoxihexosa, el 5-10% de glucosamina y el 15-20% de uno o más azúcares no aminados. Se demuestra que los grupos amino están totalmente o casi totalmente acetilados.

10 Las principales diferencias con los agentes bioemulsionantes de la técnica conocida se indican en la tabla 3 a continuación.

TABLA 3

Monosacárido	EPS	Emulsan	BSF217
Glucosa	ausente	0-5,2%	31%
Manosa	n.d.	ausente	15,5%
Galactosa	n.d.	ausente	22,5%
20 D-galactosamina	ausente	20-30%	ausente
Glucosamina	5-10%	ausente	ausente
2-amino-2,6-didesoxihexosa	70-80%	ausente	ausente
25 Ác. 2-amino-2-desoxihexurónico	ausente	33%	ausente
Ácidos urónicos	probable	ausente	10-18%

30 La caracterización funcional del biotensioactivo de la presente invención se refiere principalmente al estímulo para la biodegradación de petróleo crudo en agua de mar y al estímulo de la adhesión de las células microbianas a la superficie de hidrocarburos.

35 Para este fin se llevaron a cabo dos tipos de experimentos en los que se registró la degradación de un petróleo crudo en agua de mar en la parte de flora microbiana hidrocarbonoclasta adaptada para crecimiento en hidrocarburos y también flora microbiana autóctona de agua de mar.

La experimentación se llevó a cabo incubando la flora microbiana anterior con petróleo crudo en presencia de y sin el biotensioactivo producido por *A. calcoaceticus* ER-96 y también comparando el efecto inducido por este biotensioactivo con el de un agente dispersante comercial.

40 Se usaron tanto EPS bruto como EPS con el fin que de separar los efectos debidos a sustancias nutritivas posiblemente presentes en el caldo de fermentación de los referentes al biotensioactivo, con los mismos resultados.

45 Para medir la biodegradación del petróleo crudo, los cultivos, tras diversos tiempos de incubación, se mezclaron con Freon-113<sup>®</sup>, se centrifugaron, y se determinaron los hidrocarburos residuales en los extractos orgánicos mediante espectrofotometría en infrarrojo según el procedimiento EPA 418.1 [en "Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes", J.F. Kopp & G.D. McKee Eds., informe n° EPA-600/4-79-020 (1983)].

50 Los resultados mostraron que una flora microbiana adaptada para el crecimiento en n-hexadecano había degradado en presencia de EPS bruto, tras 14 días de incubación, el 75% del petróleo crudo inicial. Se demostró que este valor era aproximadamente 6 veces el de sin EPS y aproximadamente 3 veces superior al obtenido con el agente dispersante comercial.

55 También se observó que la biodegradación en presencia de EPS es el doble y también aumenta la biomasa en 5 órdenes (desde  $1,10^4$  hasta  $3,10^9$ ) lo que en el control sin EPS aumenta solamente cien veces.

Además el análisis de cromatografía de gases de las variaciones en las razones entre n-heptadecano y pristano y entre n-octadecano y fitano mostraron que también estos índices en presencia de EPS varían mucho más que en los controles sin EPS.

60 En conclusión, el biotensioactivo de la presente invención estimula la biodegradación de hidrocarburos en agua de mar en la parte de tanto la flora microbiana hidrocarbonoclasta adaptada para el crecimiento en hidrocarburos como la flora microbiana autóctona. Es importante recordar que a este respecto Emulsan presenta un efecto de inhibición.

65 Para determinar la capacidad de EPS para promover la adhesión de microorganismos hidrocarbonoclastas a hidrocarburos, se utilizó el procedimiento adoptado para Emulsan [E. Rosenberg *et al.* [*Infect. Immun.*, 39, 1024-1028, 1983]. El procedimiento consiste en mezclar una suspensión microbiana con una cierta cantidad de hidrocarburos y medir la reducción en turbidez de la suspensión microbiana debido a adhesión.

## ES 2 323 025 T3

Se encontró que, en contraposición directa con lo que se produce con Emulsan, EPS promueve la adhesión de las células bacterianas a la interfase agua/hidrocarburo.

De hecho, utilizando tanto un cultivo puro de *Arthrobacter sp.* como la flora heterótrofa total presente en agua de mar, la adhesión fue desde 2 hasta 4 veces superior con EPS que el control sin EPS.

En conclusión, además de las diferencias en estructura de los dos biotensioactivos, hay evidencia experimental de que hay un comportamiento funcional diferente de EPS con respecto a Emulsan: 1) la biodegradación de hidrocarburos en agua que Emulsan inhibe y que EPS parece promover y 2) la adhesión a la interfase agua/aceite que aumenta en lugar de disminuir con el biotensioactivo de la presente invención.

El biotensioactivo de la presente invención es por lo tanto particularmente adecuado para el tratamiento de “derrames de petróleo” tanto en el mar como en agua interior.

Se obtiene la producción del biotensioactivo mediante cultivo de la cepa *A. calcoaceticus* ER-96 en un medio de cultivo que contiene fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo y azufre, y sales minerales.

Las fuentes de carbono asimilables comprenden por ejemplo etanol, sodio, palmitato, ácido oleico, aceite de soja, etc.

Estas fuentes se utilizan generalmente a una concentración comprendida entre 0,2 y 5% con respecto a la mitad del cultivo, y preferentemente entre 1 y 3%.

Las fuentes de nitrógeno pueden seleccionarse, por ejemplo, de sales de amonio minerales, tales como nitrato de amonio, sulfato de amonio, cloruro de amonio, bicarbonato de amonio o materiales que contienen nitrógeno orgánico o inorgánico tal como peptona, extracto de levadura o extracto de carne, y también puede utilizarse amoniaco.

Las fuentes de fósforo comprenden fosfato de amonio, fosfato de sodio, fosfato de potasio dibásico o monobásico, etc.

Los siguientes cationes y aniones son igualmente adecuados en el contexto de la presente invención: potasio, sodio, magnesio, hierro, calcio, manganeso, cobalto, cobre, zinc, molibdeno, fosfatos, sulfatos y cloruros. Se utilizan generalmente concentraciones comprendidas entre 1 y 100 mM.

La fermentación se lleva a cabo en un medio agitado y extremadamente aireado, a una temperatura comprendida entre 25 y 37°C, preferentemente entre 28 y 32°C.

Aire comprimido estéril se hace circular en el medio de fermentación en una cantidad comprendida entre 0,2 y 1 vol/vol/minuto.

El pH del medio de fermentación se mantiene dentro de valores comprendidos entre 6,5 y 7,5 y preferentemente entre 6,8 y 7,2. La regulación del pH puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la adición de una disolución acuosa básica tal como una disolución acuosa de amoniaco, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio.

Resulta preferido mantener el pH en el valor deseado utilizando hidróxido de amonio 10 M.

La espuma que se forma en la fermentación puede controlarse mediante la adición de un agente antiespuma adecuado seleccionado de los disponibles en el mercado tal como por ejemplo polipropilenglicol, o con dispositivos mecánicos.

El procedimiento de fermentación puede llevarse a cabo de manera discontinua, con alimentación discontinua o de manera continua.

Al final de la fermentación el biotensioactivo puede aislarse y purificarse utilizando una de las técnicas conocidas. Alternativamente el caldo de fermentación como tal o sin células, puede utilizarse directamente.

La determinación de la concentración de lipopolisacárido en el caldo de cultivo durante y al final de las fermentaciones de la cepa productora pueden llevarse a cabo de dos maneras: la primera consiste en medir la capacidad emulsionante del caldo de fermentación y obtener la concentración de Enispol por medio de una curva de calibración; la segunda consiste en determinar los azúcares aminados y también en este caso obtener la concentración de EPS por medio de una curva de calibración.

Los ejemplos siguientes se proporcionan únicamente para describir la presente invención con mayor detalle y no deben considerarse limitativos del alcance de la invención.

## ES 2 323 025 T3

### Ejemplo 1

#### *Aislamiento de Acinetobacter calcoaceticus ER-96*

5 Se colocaron porciones de 150 g de una mezcla de suelos contaminados, para favorecer la reactivación de la biomasa, en matraces de 2000 ml que contenían 500 ml de medio Bushnell-Haas (BHB) con la siguiente composición por litro de agua destilada:

10 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 1 g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 0,2 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,02 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,05 g de  $\text{FeCl}_3$ ; pH 7,0 con NaOH 0,1 N; 100 mg/l de extracto de levadura.

Se incubaron los matraces durante 8 horas a 22°C en un agitador orbital a 200 revs/min.

15 Se utilizaron alícuotas de 10 ml de los caldos de cultivo como inóculos de un conjunto de matraces de 500 ml conteniendo cada uno 100 ml de medio mineral tamponado (BMM) modificado según Mills *et al.* [Can. J. Microbiol., 24, 552-557 (1978)] que contenía por litro de agua destilada:

20 5 g de NaCl; 1 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,7 g de KCl, 2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1 g de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , pH 7,2 y un 1% de una fuente de carbono hidrocarbonada seleccionada de fueloil AGIP®, petróleo crudo “Forties” y aceite de vaselina Carlo Erba®. Se incubaron los matraces a 22°C, en un agitador orbital a 200 revs/min., durante 10 días.

Entonces se utilizaron los caldos de cultivo para llevar a cabo una serie de tres subcultivos para cada una de las fuentes de carbono utilizadas.

25 Se inocularon los diversos caldos de cultivo en matraces de 50 ml que contenían cada uno 20 ml de BMM y 0,1 ml de la fuente de carbono, incubando posteriormente a 22°C en un agitador orbital a 200 revs/min. durante 5 días.

30 Se llevó a cabo el aislamiento de los fenotipos microbianos individuales presentes en los caldos de cultivo enriquecidos sembrando en placa en medio de caldo “LAB-LEMCO” (OXOID) con agar al 2%. Se incubaron las placas a 22°C durante 48 horas.

Se seleccionaron entre todas las colonias desarrolladas las que diferían aparentemente entre sí en características morfológicas y/o pigmentación.

35 Se aislaron estas colonias y se inocularon en matraces de 50 ml que contenían 20 ml de BHB y un 1% de petróleo crudo “Arabia ligero”. Se incubaron los matraces durante 7 días a 22°C en una incubadora orbital a 200 revs/min.

Se pusieron tiras de los cultivos puros individuales así obtenidos en placas de medio BHB con agar al 2%.

40 Se administró la fuente de carbono en fase gaseosa, colocando un disco de papel de filtro empapado con una mezcla de petróleo crudo/aceite de vaselina/gasóleo mediante autotracción (50:40:10), en la tapa de la placa. Se incubaron las placas durante 7 días a 22°C en un horno.

45 Se suspendieron las colonias retiradas de cada placa en BHB a diversas diluciones y se utilizaron para la “ensayo de grietas” [Krigsvoll *et al.*, “Microbial emulsification of crude oil” en las Actas del 5º Congreso Europeo de Biotecnología, vol. I, páginas 221-224, Copenhague, julio de 1990].

50 Para este fin se utilizaron placas de poliestireno con 24 orificios de prueba, introduciendo 1 ml de suspensión microbiana en cada orificio de prueba y llenando cuidadosamente con 0,025 ml de petróleo crudo. Se examinaron inmediatamente los orificios de prueba bajo el microscopio (10 X) para observar la fractura del menisco de aceite, lo que indica la presencia de tensioactivos.

55 Entre las diversas cepas que dieron una señal positiva, se demostró que solamente una podía producir un biotensioactivo con una alta capacidad emulsionante. Se indicó esta cepa con la abreviatura ER-96 y se identificó posteriormente como *Acinetobacter calcoaceticus*.

### Ejemplo 2

#### *Producción de EPS en fermentación discontinua*

60 Se reactivaron células liofilizadas de *A. calcoaceticus* ER-96 en medio de caldo “Lab-Lemco” (OXOID CM 15) y se inoculó un matraz de 250 ml que contenía 50 ml de medio de cultivo (T1) que contenía por litro: 10 g de etanol, 10 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4,0 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,08 mg de  $\text{CaCl}_2$ , 2,08 mg de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1,73 mg de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 2,12 mg de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 1,49 mg de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 2,52 mg de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,43 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , pH ajustado a 7,4 con NaOH, con este cultivo (5%).

Se incubó el matraz en un agitador orbital a 180 revs/min., a 30°C durante 48 horas y entonces se utilizó para inocular un matraz de 2 l, provisto de rompeolas, que contenía 500 ml de medio T1.

## ES 2 323 025 T3

Se prolongó el cultivo durante 48 horas en las condiciones anteriores y se utilizó posteriormente para inocular (5%) un fermentador de 14 l Chemap<sup>®</sup>, con rompeolas, que contenía 10 l de caldo de cultivo T2 que presentaba la misma composición que el medio T1, pero con 7 g/l de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 g/l de NH<sub>4</sub>Cl y 1 g/l de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.

5 Se llevó a cabo la fermentación con una aeración de 0,5 l/l por minuto, a 30°C, agitación con 2 turbinas a 700 revs/min.

Se corrigió automáticamente el pH a 7 con NaOH y se controló el espumado con polipropilenglicol (PPG 2000).

10 Tras 22 horas, el caldo de fermentación se centrifugó para eliminar las células y se liofilizó el sobrenadante (que forma EPS bruto). Se obtuvieron 700 mg/l de producto y 3,7 g/l (peso seco) de biomasa.

### Ejemplo 3

15 Se llevó a cabo la fermentación en las mismas condiciones de funcionamiento descritas en el ejemplo 2, pero utilizando NH<sub>4</sub>OH 10 M para corregir el pH a 7.

20 Se obtuvieron 1,3 g/l de producto y 4,2 g/l (peso seco) de biomasa.

### Ejemplo 4

#### *Producción de EPS a partir de etanol con fermentación de alimentación discontinua*

25 Se cultivó *A. calcoaceticus* ER-96 en las mismas condiciones de operación que el ejemplo 3. Cuando la densidad óptica a 660 nm del caldo de cultivo alcanzó un valor de 4, se añadió una disolución de etanol acuoso al 47,5% al caldo de fermentación con una tasa de flujo tal como para imponer un tiempo de duplicación de 24 horas de las células. Tras 83 horas de cultivo, se interrumpió la fermentación. El rendimiento de EPS fue de 6,7 g/l, el de las células 13 g/l (peso seco).

### Ejemplo 5

35 Se cultivó *A. calcoaceticus* ER-96 con el mismo procedimiento que el ejemplo 4, excepto que el espumado se controló mecánicamente con la utilización del desespumante Fundafoam<sup>®</sup> (Chemap); además, la concentración inicial de etanol era de 5 ml/l. Tras 14 horas, cuando la densidad óptica a 660 nm del caldo de cultivo había alcanzado un valor de 4,5, se inició la adición de etanol, en una cantidad tal como para imponer un tiempo de duplicación de 16 horas. Se prolongó la fermentación durante 90 horas. Se obtuvieron 20 g/l de EPS y 21 g/l de biomasa.

### Ejemplo 6

#### *Producción de EPS a partir de ácido oleico*

45 Se cultivó *A. calcoaceticus* ER-96 en las mismas condiciones de funcionamiento que el ejemplo 4, pero utilizando ácido oleico en lugar de etanol como única fuente de carbono. Tras 83 horas el rendimiento de EPS fue de 7,5 g/l, el de las células 24,8 g/l (peso seco).

### Ejemplo 7

#### *Producción de EPS a partir de aceite de soja*

55 Se cultivaron células de *A. calcoaceticus* ER-96 adoptando el mismo procedimiento que el ejemplo 6, pero utilizando aceite de soja en lugar de ácido oleico como única fuente de carbono. Tras 72 horas de fermentación el rendimiento de EPS fue de 15 g/l, el de las células 20 g/l (peso seco).

### Ejemplo 8

#### *Preparación de EPS*

65 Se cultivaron células de *A. calcoaceticus* ER-96 en un fermentador de 14 litros Chemap<sup>®</sup> que contenía 10 l de medio T2 al cual se habían añadido 20 g/l de etanol. Se añadió etanol adicionalmente en diversos momentos según se requiriera y se mantuvo el pH a 7 con amoníaco.

## ES 2 323 025 T3

Se llevó a cabo la fermentación con aeración (0,5 l/min) durante 70 horas, a 30°C. Al final se enfrió el cultivo hasta temperatura ambiente y se retiraron las células mediante centrifugación (Alfa-Laval® LAPX 202).

5 Se añadió sulfato de amonio (166 g/l) al sobrenadante (10,4 l) que se dejó con agitación durante una noche y entonces se centrifugó (13.000 x  $g_{max}$ ; Sorvall-DuPont® RC-5B).

Se añadió sulfato de amonio (57 g/l) al sobrenadante limpio y tras 4 horas de agitación se recuperó el precipitado mediante centrifugación, se disolvió con una cantidad mínima de agua, se dializó frente a agua y se liofilizó.

10 Se obtuvieron de 38,5 g de EPS con una capacidad emulsionante específica de 93 UE/mg.

Se determinó la capacidad emulsionante con una modificación del procedimiento de Gutnick *et al.* [documento EPA 16546]. En la práctica, 3,25 ml de una disolución de EPS en un tampón de tris-hidroximetilaminometano (Tris-HCl) 50 mM que se lleva a pH 7,2 con HCl y contenía  $MgSO_4$  10 mM se introdujeron en un tubo de ensayo de vidrio de borosilicato de 25 x 80 mm, con una tapa de rosca y junta de teflón y se añadieron 50  $\mu$ l de una mezcla de n-hexadecano y 2-metilnftaleno (1:1; v/v). Se agitó la mezcla a 800 impulsos/min. con un agitador vertical que presentaba una amplitud de 10 mm ("Agitest" Bioblock) durante 5 minutos, entonces se vertió el contenido total del tubo de ensayo en una cubeta de vidrio y se determinó la absorbancia a 620 nm. La cantidad de biotensioactivo que en las condiciones convencionales descritas anteriormente proporciona una densidad óptica de 1 se define con Unidades de capacidad emulsionante de Eniricerche (1 UE). Por consiguiente, se definió la capacidad emulsionante específica como la capacidad emulsionante de 1 mg de producto.

Se demostró que el EPS consiste en aproximadamente el 22% de proteínas (kit de ensayo de proteína Bio-Rad), aproximadamente el 67% de un lipopolisacárido y el porcentaje restante de iones metálicos, esencialmente magnesio y sodio.

### Ejemplo 9

#### 30 Preparación de EPS II

Se llevó a cabo una fermentación de *A. calcoaceticus* ER-96 en las mismas condiciones que el ejemplo 4. Al final, se añadieron 1660 g de sulfato de amonio a 10 l de este caldo de cultivo. Tras una noche a 4°C con agitación, se centrifugó la suspensión (13.000 x  $g_{max}$ ) y se añadieron 434 g de sulfato de amonio al sobrenadante resultante (7,6 litros).

Tras una noche a 4°C, se centrifugó la suspensión y se disolvió el precipitado en 2 l de agua y se concentró mediante paso a través de una membrana de ultrafiltración en espiral con un punto corte de 10.000 Daltons (Amicon S1Y10) hasta un volumen de 400 ml.

Entonces se diluyó de nuevo con agua la disolución hasta 2 litros y volvió a concentrarse hasta 400 ml y se repitió este tratamiento 10 veces. La retención final (1 l), a la que se habían añadido 1 l de tampón Tris-HCl 0,1 M que contenía  $MgCl_2$  10 mM pH 7,2 y 500 unidades de benzonasa grado I (Benzon Nuclease®, Merck), se mantuvo a 25°C durante 3 horas para destruir cualquier ADN y ARN posiblemente presente.

Se concentró la disolución así obtenida hasta 1 litro, se añadieron 1 l de tampón Tris-HCl 50 mM que contenía  $EDTANa_2$ , 0,2 M y 1,4-ditiotreitol 2 mM, pH 8 y se incubó la mezcla completa en presencia de 32 mg de papaína (Calbiochem) a 25°C durante una noche.

50 Se calentó hasta 70°C la mezcla reducida hasta 1 litro y entonces se añadió un volumen igual de fenol redistilado y precalentado hasta 70°C, según el procedimiento de O. Westphal & K. Jann ("Methods in Carbohydrate Chemistry" elaborado por R.L. Whistler, vol. V, páginas 83-91, Academic Press, Inc., Nueva York, 1965). Tras 15 minutos a 70°C con agitación vigorosa, se enfrió la mezcla hasta temperatura ambiente y se separó la emulsión formada mediante centrifugación a 23.000 x  $g_{max}$ .

55 Se extrajo la fase fenólica tres veces con un volumen igual de agua y se juntaron los extractos acuosos y, tras haberse extraído tres veces con un volumen igual de éter, se concentraron con la membrana hasta 500 ml. Tras la adición de 500 ml de  $EDTANa_2$  0,1 M pH 8, volvió a concentrarse la disolución hasta 500 ml y se repitió este tratamiento 6 veces.

60 Posteriormente, utilizando el mismo procedimiento, se añadieron 10 litros de  $H_2O$  (20 veces), 10 litros de NaCl 0,1 M (20 veces) 10 litros de HCl 50 mM (20 veces) y 10 litros de  $H_2O$  (20 veces) y se eluyó. Se liofilizó la disolución resultante obteniendo 6,9 g de EPS II con una capacidad emulsionante específica de 48 UE/mg.

65

## ES 2 323 025 T3

### Ejemplo 10

#### Caracterización fisicoquímica de EPS II

5 Se analizó el EPS II obtenido tal como se describió en el ejemplo 9 y se determinaron las siguientes características:

- *Pérdida en el secado* (70°C; a vacío; 16 horas): 3,7% (p/p).

- *Análisis elemental* (%): C= 44,5; H= 7,33; N= 4,99; O= 40,6; S= 0.

10

- *Cenizas* (900°C): 3,6% (p/p).

- *Proteínas* [ensayo de proteína Bio-Rad; M. Bradford, Anal. Biochem., 72 248 (1976), patrón de  $\gamma$ -globulina bovina]: 58,6 mg/g.

15

- *Metales* (espectroscopía de absorción y emisión o atómica): Na = 7800; Ca < 10; Mg = 60; Mn = 1; Cu = 3; Co < 10; Ni < 2; Fe < 10 (en ppm).

20 - *Espectro infrarrojo (FT-IR)*

Haciendo referencia a la figura 1: 3417,5  $\text{cm}^{-1}$  (OH, NH); 2924-2853  $\text{cm}^{-1}$  (CH); 1735  $\text{cm}^{-1}$  (CO de éster y ácido) 1655-1554  $\text{cm}^{-1}$  (CO de amida); 1038  $\text{cm}^{-1}$  (COC glucosídico).

25

- *Espectros de RMN*

Se registraron los espectros de protón y  $^{13}\text{C}$  de EPS II disuelto en  $\text{D}_2\text{O}$ . Se demostró que los espectros concuerdan con la estructura de un polisacárido que contiene cadenas alifáticas, pero así como la presencia de grupos metileno se observaron señales muy intensas con respecto a la presencia de grupos metilo y acetilo.

30

- *Azúcares aminados*

35 Se hidrolizó el EPS II en HCl 5 M, a 100°C durante 30 minutos y se neutralizó. Entonces se determinaron los azúcares aminados con el procedimiento de Z. Dische [Methods of Biochem. Anal., 2, 352-358 (1967)] que consiste en desaminar los azúcares con ácido nitroso, destruyendo el reactivo en exceso con carbamato de amonio y haciendo reaccionar los azúcares desaminados con indol en HCl.

40

Utilizando N-acetilglucosamina como patrón se encontró un valor de 604 mg/g.

- *Otros azúcares* [Dubois *et al.*, Anal. Chem. 28, 350-356 (1956); patrón de glucosa]: 190 mg/g.

- *Glucosa* (Prueba UV de Boehringer: hexocinasa, ATP, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y NADP): ausente.

45

- *Peso molecular*: esto se determinó con análisis por HPLC-SEC (cromatografía de exclusión por tamaños) en columnas Styragel 10<sup>6</sup>, Styragel 10<sup>5</sup> y Styragel 10<sup>4</sup> de Waters, utilizando dimetilsulfóxido como fase móvil y pululanos como patrones (Hayashibara Biochemical Laboratories Inc., Japón). Se encontró un valor de 1.556.400 daltons.

50

- *Ácidos grasos esterificados* [I. Stern & B. Shapiro, J. Clin. Path., 6, 158-160 (1953); dipalmitato de sacarosa como patrón (SERVA)]: se transforman los radicales ácido esterificados mediante reacción con hidroxiamina en ácidos hidroxámicos que proporcionan una coloración morada con cloruro férrico; se encontró 1,15 meq/g.

55

Suponiendo un peso molecular promedio de 182,32 (radical laurilo) se calculó un contenido en ácidos grasos de 209,7 mg/g.

### 60 Ejemplo 11

#### Caracterización del lipopolisacárido

65 Para caracterizar la fracción lipídica del biotensioactivo se utilizó el protocolo n° 969.33 de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales ["Official Methods of Analysis of AOAC International", P. Cunniff Ed., 16ª ed., vol. II, n° 41.1.28, AOAC Int. (1995)].

## ES 2 323 025 T3

En la práctica se trató el EPS II en el punto de ebullición con metanol-sosa en presencia de trifluoruro de boro como catalizador para la formación de ésteres metílicos de ácidos grasos.

Entonces se extrajeron los ésteres en n-heptano y se identificaron los ácidos grasos mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas.

En un funcionamiento tal como se describió anteriormente se identificaron los siguientes productos:

- ácido dodecanoico (ácido láurico) como producto principal;
- ácido 3-hidroxi-dodecanoico como producto secundario y
- cantidades menores de ácidos 2-hidroxidodecanoico, hexadecanoico (ácido palmítico), octadecanoico (ácido esteárico) y octadecenoico (ácido oleico).

Se llevó a cabo la caracterización del esqueleto de polisacárido de EPS II mediante hidrólisis ácida del polímero.

Se disolvieron 80 mg de EPS II en 8 ml de HCl 5 M y se incubaron, en una atmósfera inerte, durante 4 horas a 105°C. Tras enfriar hasta temperatura ambiente se retiró el HCl a vacío.

Se rompió el precipitado resultante y se extrajo con etil éter, entonces se disolvió en D<sub>2</sub>O y se sometió a análisis de RMN.

El espectro de RMN del protón completo se indica en la figura 2.

La figura 3 muestra una ampliación de la región del espectro anterior entre 4,5 y 5,5 ppm, que comprende las señales de los protones referentes al carbono en la posición 1 de monosacáridos en general.

Estas señales generalmente son dobles debido a la presencia simultánea en disolución de formas anoméricas  $\alpha$  y  $\beta$  del monosacárido. El espectro de la figura 3 muestra 3 pares de dobletes referentes a 3 especies de monosacáridos en una razón de 7:2:1.

Para identificar los monosacáridos que forman la fracción de polisacárido de EPS II, se llevó a cabo una hidrólisis ácida preparativa.

En primer lugar, se determinaron las condiciones de hidrólisis más adecuadas incubando alícuotas de EPS II a 100°C durante diversos tiempos con diferentes concentraciones de HCl. Se siguieron las hidrólisis por la determinación tanto de azúcares aminados como de azúcares reductores [J.T. Park & M.J. Johnson, J. Biol. Chem., 181, 149 (1949)]. Se identificaron las mejores condiciones en una hidrólisis con HCl 0,5 M durante 6 horas.

Basándose en estos resultados, se disolvieron 500 mg de EPS II en 500 ml de HCl 0,5 M y se sometió a ebullición con reflujo durante 6 horas, bajo una cubierta de gas de N<sub>2</sub>.

Entonces se enfrió la disolución, se concentró hasta 50 ml a vacío y se extrajo tres veces con volúmenes iguales de etil éter.

Se evaporó la disolución resultante hasta 10 ml, se diluyó hasta 100 ml con agua y volvió a concentrarse hasta 10 ml a vacío. Se repitió este tratamiento tres veces antes de secar mediante rotavapor.

Se añadió el producto seco a 200 ml de H<sub>2</sub>O y entonces se trató según el esquema descrito por R.W. Weath [Methods Enzymol., 8, 60-78 (1966)].

Se cargó el producto hidrolizado en una columna (1,2 cm d.i. x 50 cm h) de Dowex<sup>®</sup> 50 X-4, resina catiónica fuerte de 200-400 de malla, en forma de H<sup>+</sup>, y posteriormente se eluyó la columna con agua hasta que el pH del eluato era neutro.

La fracción presente en el eluato, no retenida por la resina, está constituida por azúcares neutros y/o ácidos y representaba aproximadamente el 20% del total. Su caracterización mostró una reacción positiva para la prueba de Dubois, negativa para la prueba de azúcar aminado y positiva para ácidos urónicos [T. Bitter & H.H. Muir, Anal. Biochem., 4, 330-334 (1962)].

La columna, en la cual se habían fijado los aminoazúcares, se eluyó de manera isocrática con HCl 0,3 M. Se analizaron las fracciones recogidas para determinar los azúcares reductores y se observaron dos picos cromatográficos.

Se juntaron las fracciones referentes a estos picos, se secaron y se añadieron a agua varias veces para eliminar el HCl. Entonces se liofilizaron las fracciones y se sometieron a análisis de RMN.

## ES 2 323 025 T3

Se identificó el primer pico, que era aproximadamente el 10% del total, como glucosamina; el espectro de RMN del protón era igual al de una muestra comercial de glucosamina-HCl (Fluka). El espectro del segundo pico (figura 4) concordaba con el de una aminohexosa con un metilo en la posición 6. Más específicamente, se demostró que el compuesto era una 2-amino-2,6-didesoxialdohexosa.

La presencia del grupo amino en la posición 2 también se confirmó mediante la reacción Randle-Morgan que generó un cromóforo con absorción máxima a 530 nm [C.J.M. Randle & W.T.J. Morgan, *Biochem. J.*, 61, 586 (1955); N. Suzuki, *Biochem. Biophys. Acta*, 177, 371-373 (1969)].

### Ejemplo 12

#### *Biodegradación de petróleo crudo en agua de mar con EPS*

Alícuotas (7,5 mg) de EPS bruto, preparado liofilizando un caldo de cultivo obtenido tal como se describe en el ejemplo 4, tras quitarle las células mediante centrifugación, se introdujeron en una serie de matraces de 250 ml que contenía cada uno 50 ml de agua de mar con una carga total de bacterias heterótrofas de  $1,1 \cdot 10^3$  UFC (Unidades Formadoras de Colonia)/ml y un contenido en nitrógeno y fósforo de 4 y 0,9 ppm respectivamente.

Entonces se introdujeron en los matraces 150 mg de petróleo crudo "combinación Belahim", del que se ha eliminado previamente la fracción más volátil calentando hasta 80°C durante 20 horas.

Se prepararon paralelamente controles sin EPS y una segunda serie de matraces que contenían una agente dispersante comercial utilizado por la autoridades portuarias italianas para tratar derrames de petróleo en el mar.

Se incubaron los matraces en condiciones aerobias en un agitador orbital a 100 revs/min. a 22°C, tomando muestras de prueba en el tiempo cero y en diferentes intervalos de tiempo para determinar el contenido en biomasa e hidrocarburos. Se determinó la biomasa por medio de un recuento de las bacterias heterótrofas totales realizado en medio de cultivo con agar con triptona-peptona de soja (Oxoid, CM 131). Se dosificaron los hidrocarburos extrayendo cada matraz individual con 1,2-tricloro-1,2,2-trifluoroetano (Freon®-113), midiendo la extinción a  $2930 \text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a la absorción máxima, y obteniendo la concentración de hidrocarburos por medio de una curva de calibración formada con un patrón que consiste en n-hexadecano/iso-octano/clorobenceno en una razón volumétrica 15/15/10.

Se indican los resultados en la tabla 4. Se expresa la cantidad de residual hidrocarburos en porcentaje con respecto a la cantidad presente en el tiempo cero.

TABLA 4

Tiempo (h)	Hidrocarburos degradados (%)			Biomasa (UFC)		
	Control sin dispersantes	EPS	Dispersante comercial	Control sin dispersantes	EPS	Dispersante comercial
0	0	0	0	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$
7	12,2	52,6	19,4	n.d.	n.d.	n.d.
14	12,5	73,5	23,5	$1,4 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$

\* n.d. = no determinado

Los valores indicados en la tabla muestran que la degradación con EPS tras 14 días es 5,9 veces superior al control y 3,1 veces superior con respecto al agente dispersante comercial.

### Ejemplo 13

#### *Biodegradación de petróleo crudo con EPS*

Para separar los efectos debidos a sustancias nutritivas posiblemente presentes en el caldo de fermentación de los referentes al biotensioactivo, se utilizó EPS preparado tal como se describe en el ejemplo 8.

En este experimento se utilizaron diferentes cantidades de EPS, desde 0,75 hasta 7,5 mg/50 ml de agua de mar con una carga total de bacterias heterótrofas de  $1 \cdot 10^4$  U.F.C./ml a la cual se habían añadido 150 mg de petróleo crudo. Tras 45 días de incubación se determinaron los siguientes parámetros: la biomasa, la cantidad de petróleo crudo degradado y las razones, medidas con análisis de cromatografía de gases (columna capilar Supelco SPB1) del extracto en Freon, entre: (a) las cantidades de n-heptadecano (n-C<sub>17</sub>) y pristano y (b) las cantidades de n-octadecano (n-C<sub>18</sub>) y fitano.

## ES 2 323 025 T3

Estas razones se consideran generalmente importantes índices de biodegradación [P. Sveum *et al.*, en "Hydrocarbon bioremediation" bajo la supervisión de R.H. Hincee *et al.*, Lewis Publisher, Boca Ratón; páginas 163-174 (1994)]. Se prepararon 7 matraces para cada una de las siguientes mezclas:

- 5           1) agua de mar (50 ml) + petróleo (150 mg)
- 2) agua de mar (50 ml) + petróleo (150 mg) + EPS (0,75 mg)
- 3) agua de mar (50 ml) + petróleo (150 mg) + EPS (3,75 mg)
- 10          4) agua de mar (50 ml + petróleo (150 mg) + EPS (7,50 mg)

Se muestran los resultados en las tablas 5-7:

TABLA 5

*Petróleo biodegradado (%)*

Tiempo (días)	Muestras			
	1	2	3	4
7	16,1	10,2	10,9	17,1
14	16,4	21,8	18,3	21,5
21	19,0	23,7	16,3	27,8
28	19,8	21,6	20,7	31,9
35	19,7	20,2	25,7	30,4
45	17,8	27,3	29,0	32,0

TABLA 6

*Razones de n-C<sub>17</sub>/Pristano y n-C<sub>18</sub>/Fitano*

Tiempo (días)	Muestras							
	1		2		3		4	
	C17/P	C18/F	C17/P	C18/F	C17/P	C18/F	C17/P	C18/F
0	2,41	1,70	2,43	1,70	2,40	1,73	2,46	1,70
7	2,41	1,65	2,42	1,66	2,35	1,68	2,43	1,68
14	2,38	1,70	2,41	1,66	2,28	1,57	2,41	1,61
21	2,38	1,70	2,40	1,70	2,32	1,57	2,12	1,52
28	2,37	1,70	2,25	1,62	2,29	1,61	2,17	1,57
35	2,34	1,63	2,23	1,52	2,19	1,47	2,17	1,52
45	2,34	1,63	1,99	1,38	1,91	1,35	2,00	1,49

TABLA 7

*Recuento microbiano*

20 (bacterias heterótrofas totales, UFC/ml)

Tiempo(días)	Muestras			
	1	2	3	4
0	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$
7	$3,7 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$5,6 \times 10^6$
14	$1,3 \times 10^8$	$8,7 \times 10^6$	$2,4 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$
21	$3,5 \times 10^6$	$3,4 \times 10^9$	$5,0 \times 10^8$	$7,1 \times 10^3$

## ES 2 323 025 T3

### Ejemplo 14

#### *Capacidad de EPS para promover adhesión de células de Arthrobacter sp. FA-17 a n-hexadecano*

5 Se midió la capacidad de EPS de inducir la adhesión de células bacterianas a hidrocarburos con la prueba de E. Rosenberg *et al.* [Infect. Immun., 39, 1024-1028 (1983)]. Esta prueba consiste en agitar vigorosamente una suspensión celular con una cierta cantidad de n-hexadecano y medir el número de células que permanecen unidas a la interfase agua-petróleo midiendo la disminución en turbidez de la suspensión.

10 Para este fin se tomó una unidad de colonia aislada de la cepa *Arthrobacter sp.* FA-17 (Colección Eniricerche) de un cultivo de mantenimiento en agar nutritivo (Oxoid, CM 003B) y se utilizó como inóculo de un subcultivo en un matraz, en 50 ml de caldo de infusión cerebro corazón (Oxoid, CM 225B).

15 Se retiraron 0,1 ml de caldo de este subcultivo, se incubaron durante una noche en un agitador orbital a 30°C y 150 rpm, para un inóculo adicional de un cultivo en un matraz de 125 ml que contenía 50 ml de caldo de infusión cerebro corazón. Se mantuvo el matraz en el agitador orbital durante 18 horas a 30°C y 150 rpm hasta que se alcanzó la fase de crecimiento estacionario. Entonces se recogieron las células mediante centrifugación, se lavaron y resuspendieron dos veces con 50 ml de disolución de tampón PUM (que contenía por litro: 22,2 g de  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ; 7,26 g de  $K_2PO_4$ ; 1,8 g de urea; 0,2 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; pH 7,1).

20 Entonces se resuspendieron alícuotas de células lavadas en tampón PUM (volumen final de 4 ml) en cuatro tubos de vidrio de borosilicato (14 x 140 mm) en diversas razones para dar valores de extinción a 400 nm de 0 a 1,5. Entonces se añadieron 0,2 ml de una disolución que contenía 2,1 mg/ml de EPS bruto y 1 ml de n-hexadecano a todos los tubos. Se prepararon cuatro duplicados de la misma manera con la misma concentración de células y de nuevo conteniendo 1 ml de n-hexadecano, pero, en lugar de de EPS, 0,2 ml de tampón; se introdujeron solamente 4,2 ml de tampón y 1 ml de n-hexadecano en otro tubo, que actuó como blanco. Se agitaron los tubos con una mezcladora con vórtice durante 120 segundos y entonces se dejó reposar durante 15 minutos en un horno regulado por termostato a 30°C para permitir que las fases de agua/hidrocarburo se separasen. Se retiró la fase acuosa de cada tubo y se midió su densidad óptica a 400 nm. Se indican los resultados en la tabla 8.

TABLA 8

Muestra	Células (UFC)	Adhesión con EPS (%)	Adhesión sin EPS (%)
1	$0,5 \times 10^8$	89	28
2	$1 \times 10^7$	60	24
3	$2 \times 10^7$	51	22
4	$4 \times 10^7$	44	17

### Ejemplo 15

#### *Capacidad de EPS para promover la adhesión de flora bacteriana marina*

45 Para determinar la capacidad de EPS para promover la adhesión de flora bacteriana marina endógena a n-hexadecano, se llevó a cabo un experimento análogo al del ejemplo 13, pero utilizando un cultivo mixto de bacterias aisladas de una muestra de agua de mar tomada de Ostia Lido (Roma).

50 Para este fin, se insemnaron 0,1 ml de agua de mar, inmediatamente tras la retirada, mediante la aplicación con espátula en la superficie de un medio de cultivo con agar con tripton-peptona de soja (OXOID CM 131), que contenía NaCl 24 g/l.

55 Se recogieron las colonias que se hicieron crecer con un asa estéril en tampón PUM, en un tubo bacteriano de 19 x 180 mm, hasta que se obtuvieron suspensiones celulares de una concentración adecuada.

Se realizó la medición de la adhesión de las células a n-hexadecano tal como se describe en el ejemplo 14. Se indican los resultados en la tabla 9.

TABLA 9

Muestra	Células (UFC)	Adhesión con EPS(%)	Adhesión sin EPS(%)
1	$1 \times 10^5$	76	0
2	$1 \times 10^6$	68	17
3	$2 \times 10^6$	52	25
4	$4 \times 10^6$	38	15

## REIVINDICACIONES

1. Biotensioactivo de lipopolisacárido producido por la cepa de *Acinetobacter calcoaceticus* CBS 962.97 en el que el lipopolisacárido está constituido por una cadena de polisacárido constituida por azúcar 2-amino-2,6-didesoxialdohexosa y glucosamina y uno o más azúcares no aaminados, en el que los grupos amínicos de los azúcares aaminados están en su totalidad o sustancialmente en su totalidad en forma acetilada, y en el que dicha cadena de polisacárido está unida con un enlace éster a una fracción lipídica constituida por radicales ácidosaturados y/o insaturados con una longitud de la cadena lipófila de 10 a 18 átomos de carbono de los cuales el 95-50% está constituido por ácido dodecanoico y ácido 3-hidroxi-dodecanoico y en el que el ácido dodecanoico está presente en una cantidad superior al ácido 3-hidroxi-dodecanoico.
2. Biotensioactivo según la reivindicación 1, en el que la cadena de polisacárido está constituida por 70-80% de 2-amino-2,6-didesoxialdohexosa, 5-10% de glucosamina y 15-20% de uno o más azúcares no aaminados.
3. Biotensioactivo según la reivindicación 1, en el que el ácido dodecanoico forma 70-80% de la fracción lipídica.
4. Biotensioactivo según la reivindicación 1, que comprende además 20-25% en peso de proteínas.
5. Cepa de *Acinetobacter calcoaceticus* CBS 962.97 que produce un biotensioactivo de lipopolisacárido según la reivindicación 1.
6. Procedimiento para la preparación de un biotensioactivo de lipopolisacárido en asociación con moléculas proteicas, en el que el lipopolisacárido está constituido por una cadena de polisacárido está constituida en su mayor parte por azúcar 2-amino-2,6-didesoxialdohexosa y glucosamina y uno o más azúcares no aaminados, en el que los grupos amínicos de los azúcares aaminados están en su totalidad o casi en su totalidad en forma acetilada, y en el que esta cadena de polisacárido está unida con un enlace éster a una fracción lipídica constituida por radicales ácidosaturados y/o insaturados con una longitud de la cadena lipófila de 10 a 18 átomos de carbono de los cuales el 95-50% está constituido por ácido dodecanoico y ácido 3-hidroxi-dodecanoico y en el que el ácido dodecanoico es predominante con respecto al ácido 3-hidroxi-dodecanoico, en el que dicho procedimiento comprende:
- (a) cultivar la cepa de *Acinetobacter calcoaceticus* CBS 962.97 que produce dicho biotensioactivo de lipopolisacárido en un medio de cultivo adecuado que contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y microelementos; y
  - (b) retirar las células del medio de cultivo y recuperar el sobrenadante acelular **caracterizado** porque presenta una actividad emulsionante.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el cultivo en la etapa a) se lleva a cabo a una temperatura comprendida en el intervalo de 25 a 37°C.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la temperatura está comprendida en el intervalo de 28 a 32°C.
9. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que el cultivo en la etapa a) se lleva a cabo a un pH comprendido en el intervalo de 6,5 a 7,5.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que el pH está comprendido en el intervalo de 6,8 a 7,2.
11. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que tras retirar las células microbianas (etapa b) se purifica el biotensioactivo de lipopolisacárido y se aísla del medio de fermentación.
12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que la purificación se lleva a cabo mediante precipitación selectiva con sulfato de amonio, concentración y desalación del caldo de fermentación por medio de membranas de ultrafiltración en espiral, tales como membranas planas o de fibras huecas, o absorción selectiva sobre un soporte sólido.
13. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que el biotensioactivo de lipopolisacárido purificado está desproteínizado.
14. Utilización del biotensioactivo de lipopolisacárido según la reivindicación 1, para la biodegradación de hidrocarburos en agua.
15. Utilización del biotensioactivo de lipopolisacárido según la reivindicación 1, para formar y estabilizar una emulsión de aceite/agua.
16. Utilización del biotensioactivo de lipopolisacárido según la reivindicación 1, para la estimulación por adhesión de las células microbianas a una interfase agua/aceite de hidrocarburos en agua.
17. Composición que contiene el biotensioactivo de lipopolisacárido según la reivindicación 1.

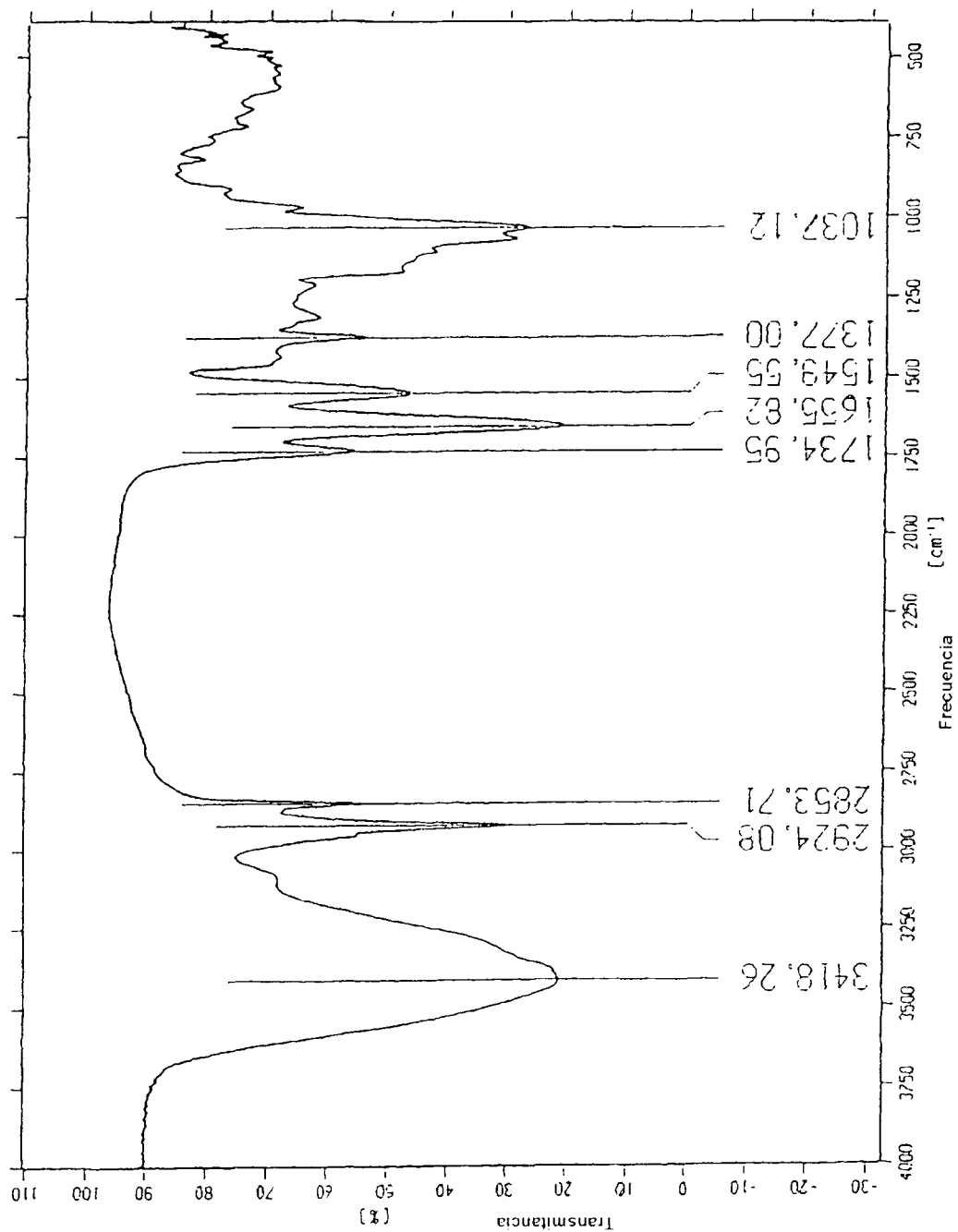


Fig. 1

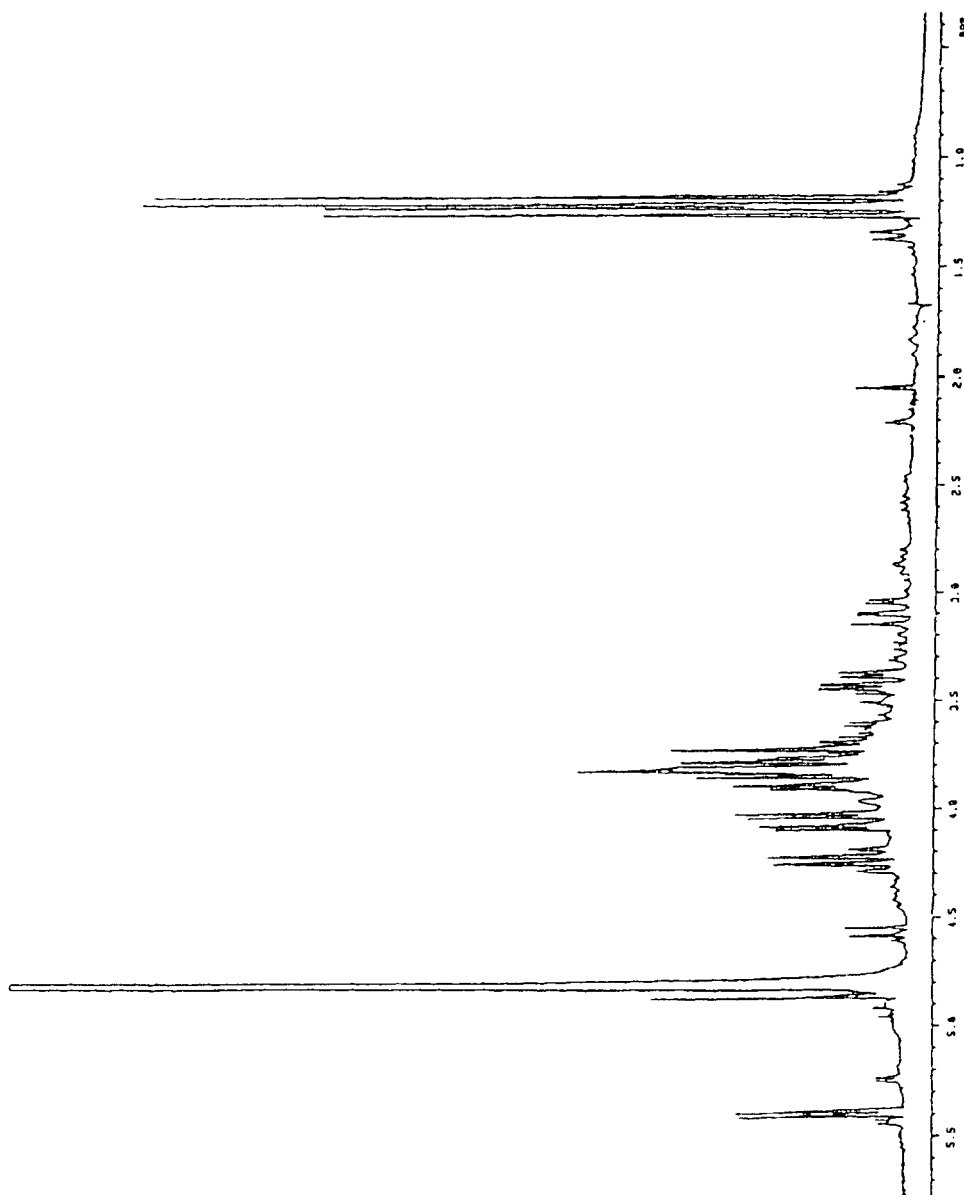


Fig. 2

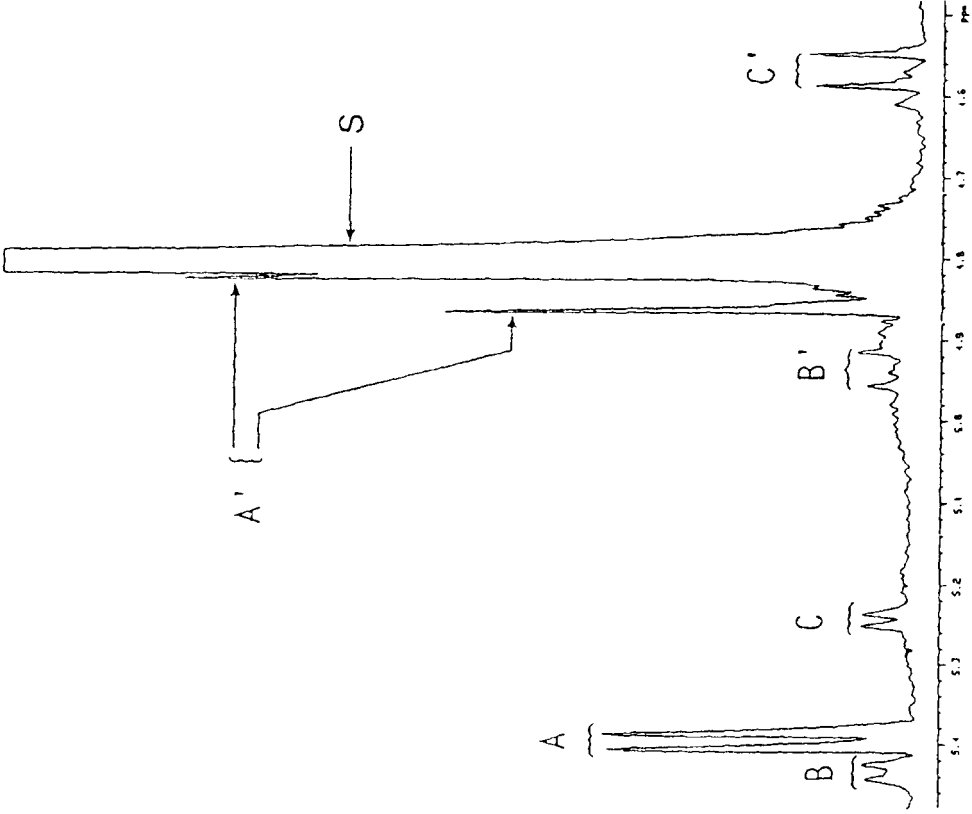


Fig. 3

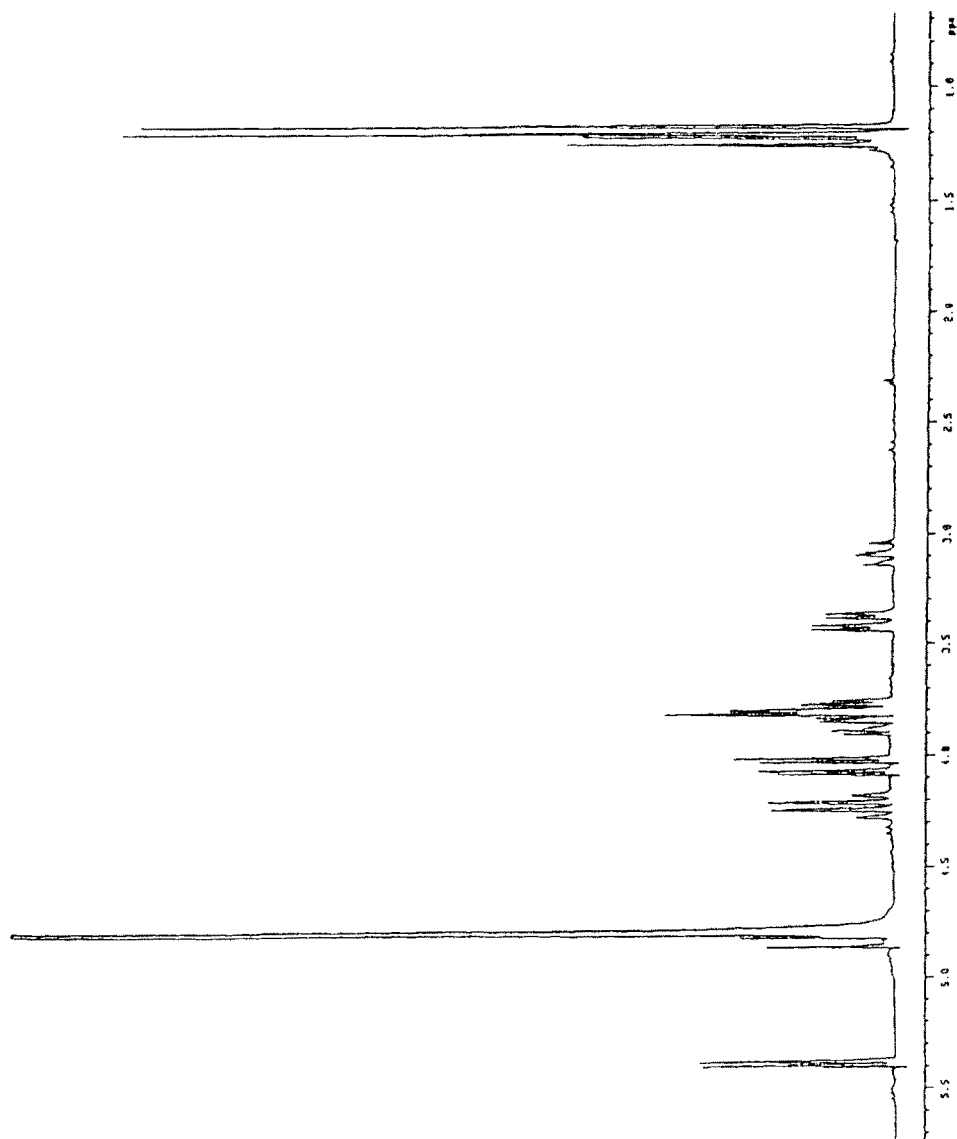


Fig. 4