



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 247 874**

② Número de solicitud: 200300745

⑤ Int. Cl.:

**C12N 9/52** (2006.01)

**C12R 1/01** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **26.03.2003**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2006**

Fecha de la concesión: **11.05.2007**

④ Fecha de anuncio de la concesión: **16.06.2007**

④ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**16.06.2007**

⑦ Titular/es: **Universidad de Sevilla  
Pabellón de Brasil  
Paseo de las Delicias, s/n  
41012 Sevilla, ES**

⑦ Inventor/es: **Sánchez-Porro Álvarez, Cristina;  
Mellado Durán, Encarna;  
Martín Rengel, Sara y  
Ventosa Ucero, Antonio**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Nueva haloproteasa producida por una bacteria halófila moderada: modo de producción de la enzima.**

⑤ Resumen:

Nueva haloproteasa producida por una bacteria halófila moderada: modo de producción de la enzima.

Nueva proteasa producida a partir de la bacteria halófila moderada *Pseudoalteromonas sp.* CECT 5782. Esta proteasa se caracteriza por poseer una elevada actividad en un amplio rango salino (entre 0 y 4 M de NaCl), también presenta unas características peculiares de termoestabilidad siendo activa en un rango de 20°C a 70°C, y de actividad a pH alcalinos. Siendo útil su aplicación en distintos procesos industriales que requieren condiciones extremas en cuanto a salinidad, temperatura y pH.

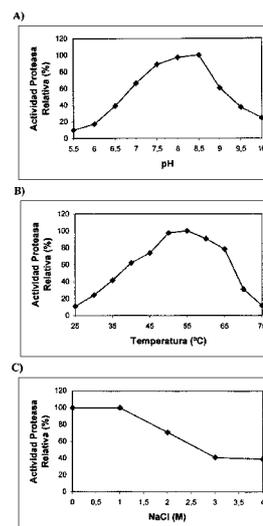


FIGURA 2

ES 2 247 874 B1

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

## DESCRIPCIÓN

Nueva haloproteasa producida por una bacteria halófila moderada: modo de producción de la enzima.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir una nueva proteasa, denominada haloproteasa CP1 a partir de la bacteria halófila moderada *Pseudoalteromonas sp.* cepa CP76. Esta proteasa se caracteriza por poseer una elevada actividad en un amplio rango salino (entre 0 y 4 M de NaCl), también presenta unas características peculiares de termoestabilidad (actividad óptima a 55°C), y de actividad a pH alcalinos (actividad óptima a pH 8,5). Estas características convierten a la haloproteasa CP1 en una enzima muy versátil con aplicación en distintos procesos industriales que requieren condiciones extremas en cuanto a salinidad, temperatura y pH.

Dos procesos industriales en los que la haloproteasa CP1 puede resultar de gran interés son en la industria de los detergentes y en la elaboración de cueros. En el primer caso la haloproteasa CP1 permitiría facilitar la eliminación de manchas de origen proteico en los tejidos, presentando la ventaja con respecto a las proteasas existentes, en cuanto a su capacidad para mantener su actividad óptima no solo en un rango amplio de temperatura valores de pH sino también tanto en condiciones no salinas como de elevada salinidad.

Generalmente los procesos industriales en los que se utilizan detergentes requieren enzimas, entre ellas proteasas, con actividad a elevadas temperaturas y pH alcalinos y en algunos casos debido a las características del agua y/o la presencia de determinados compuestos químicos dichos enzimas también deben poseer actividad óptima en un rango salino.

En cuanto a su aplicación en la industria peletera tradicionalmente se han venido utilizando diversos compuestos químicos con la finalidad de tratar las pieles para obtener cueros. En la actualidad se utilizan proteasas de origen microbiano como alternativa con la ventaja de su mayor inocuidad y menos agresividad ambiental. Actualmente se utilizan proteasas alcalinas que deben actuar a distintas concentraciones de cloruro sódico en el proceso de eliminación de los pelos y restos proteicos durante el curtido de los cueros. La haloproteasa CP1 tendría una aplicación en este campo industrial al poseer actividad óptima en las condiciones de pH alcalino y de salinidad que habitualmente se utilizan en este tipo de procesos.

La proteasa purificada tiene un peso molecular de 38 kDa y la secuencia aminoterminal determinada mostró similitud con otras metaloproteasas previamente descritas. La producción máxima de la haloproteasa CP1 tiene lugar cultivando la cepa CP76 en medio salino conteniendo un 7,5% de NaCl, al principio de la fase estacionaria de crecimiento, a una temperatura de 37°C, en ausencia de maltosa y en presencia de sacarosa, fructosa o glicérol.

40 **Estado de la técnica**

Determinados procesos industriales requieren la utilización de enzimas con actividad proteasa óptima en condiciones extremas de salinidad, temperatura y pH. El procesado del cuero en la industria peletera requiere numerosos procesos en los cuales se utilizan diferentes compuestos químicos que constituyen un riesgo de contaminación para el medio ambiente. El reciente desarrollo de las “tecnologías verdes” hace que se hayan desarrollado procesos alternativos que se basan en el uso de microorganismos o sus enzimas. En este sentido, en determinadas industrias peleteras que utilizan aguas salinas para el procesado de la piel mediante tecnologías no contaminantes, se requiere el uso de proteasas para realizar la hidrólisis selectiva de constituyentes no colagenosos de la piel y la eliminación de proteínas no fibrilares tales como albúminas y globulinas. Estas proteasas deben mostrar actividades óptimas en condiciones de alta salinidad y pH.

Las bacterias halófilas son un grupo de microorganismos que se caracterizan por su elevada resistencia al estrés salino y que están especializados para vivir en ambientes hipersalinos. Dichos hábitats hipersalinos son aquellos que presentan una elevada concentración de sal y constituyen un ejemplo típico de ambiente extremo. Estos hábitats comprenden tanto suelos como ambientes acuáticos y además, suelen poseer peculiaridades ambientales tales como elevadas temperaturas, bajas concentraciones de oxígeno, valores de pH extremos, etc., (Rodríguez-Valera, F., 1993, Introduction to saline environments, En: Vreeland, R.H. and Hochstein, L., eds, The Biology of Halophilic Bacteria, Boca Raton: CRC Press, p: 1).

En general los ambientes acuáticos hipersalinos se han estudiado en mayor profundidad. Estos se caracterizan por poseer concentraciones salinas superiores a la del agua del mar (Edgerton, M.E. and Brimblecome, P., 1981. Can. J. Microbiol. 27: 899). En dichos hábitats pueden coexistir una gran diversidad de seres vivos, que varía en función de una serie de parámetros entre los que destacan la salinidad, la composición iónica, la solubilidad del oxígeno, el pH o la temperatura (Rodríguez-Valera, F., 1988, Characteristics and Microbial Ecology of Hypersaline Environments, En: Rodríguez-Valera, F., ed, Halophilic Bacteria. Boca Raton: CRC Press. p: 3).

Los dos grupos de microorganismos predominantes en los ambientes hipersalinos, especialmente en aquellos con una salinidad superior al 1,5 M de NaCl, son las bacterias halófilas moderadas, que poseen un crecimiento óptimo en medios con 0,5-2,5 M de NaCl y los microorganismos halófilos extremos con crecimiento óptimo en medios con

2,5-5,2 M. (Kushner, D.J., 1985, The Halobacteriaceae. En: Woese, C.R. and Wolfe, R.S., eds. The Bacteria, vol. 8. London: Academic Press. p: 171). En los últimos años estos microorganismos han despertado un gran interés desde un punto de vista científico gracias al enorme potencial biotecnológico que poseen (Mellado, E. and Ventosa, A., 2003, Biotechnological potential of moderately and extremely halophilic microorganisms En: Barredo, J.L., ed. Microorganisms for Health Care, Food and Enzyme Production. Kerala: Research Signpost. p: 233). Muchos de ellos son capaces de producir una serie de enzimas de gran interés industrial, como es el caso de las nucleasas, amilasas, proteasas o lipasas, que presentan gran estabilidad y resistencia al estrés salino y por lo tanto tienen importantes aplicaciones industriales. Las altas concentraciones salinas afectan a la estabilidad de las proteínas, así las enzimas extracelulares producidas por bacterias halófilas poseen unos mecanismos específicos que las hacen permanecer estables a elevadas salinidades. En este sentido, las enzimas de microorganismos halófilos suelen tener un carácter marcadamente ácido en su superficie si se compara con las enzimas no halófilas, estos residuos ácidos contribuyen a la estabilidad de las mismas (Madigan y col., 1999, Curr. Opin. Microbiol. 2: 265; Mevarech y col., 2000, Biophys. Chem. 86: 155).

Entre las enzimas con actividad hidrolítica, las proteasas constituyen un grupo extensamente estudiado que catalizan la hidrólisis total de proteínas. Los microorganismos producen una gran variedad de proteasas, que pueden ser intracelulares y/o extracelulares. Las proteasas intracelulares intervienen en varios procesos celulares y metabólicos, como son la esporulación y diferenciación o la maduración de distintas enzimas. Las proteasas extracelulares juegan un papel importante en la hidrólisis de las proteínas en el espacio extracelular y permite a la célula la utilización de distintos productos hidrolíticos (Kalisz, H.M., 1988, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 36: 1). Además de su importancia fisiológica y ecológica, este grupo de enzimas tiene un enorme interés industrial siendo ampliamente utilizado en la industria de detergentes, alimentos, bebidas, textil ó papelería (Rao y col., 1998, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 597; Gupta y col., 2002, Appl. Microbiol. Biotechnol. 59: 15). Por otro lado, a pesar de que las proteasas poseen una acción muy específica, es un grupo de enzimas muy diverso, por lo que resulta muy atractivo para su explotación biotecnológica. Las estimaciones de ventas mundiales de enzimas industriales son muy elevadas, de las cuales el 75% presentan actividades hidrolíticas. Las proteasas representan uno de los tres grandes grupos de enzimas industriales y constituyen alrededor del 60% del total de las ventas mundiales. Este dominio de las proteasas en el mercado industrial se espera que aumente hacia el año 2005 (Godfrey, T. and West, S., 1996, Introduction to Industrial Enzymology. In: Godfrey, T. and West, S., eds, Industrial enzymology, 2<sup>nd</sup> edn. Macmillan Press, London, p: 1).

Durante los últimos años se han aislado y caracterizado varias enzimas con actividad proteasa producidas por distintos microorganismos no halófilos (Rao y col., 1998, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 597); sin embargo, las proteasas de microorganismos halófilos no se han estudiado en profundidad, y tan solo se han caracterizado algunas proteasas de bacterias halófilas extremas (Norberg, P. and Hofsten, B., 1969, J. Gen. Microbiol 55: 251; Kamekura, M. and Seno, Y., 1990, Biochem. Cell Biol. 68: 352; Stepanov y col., 1992, Biochem. J. 285: 281; Kamekura y col., 1992, J. Bacteriol. 174: 736; Ryu y col., 1994, Enzyme Microbiol. Technol. 16: 266; Jiménez y col., 2000, Extremophiles 4: 181). Una de las proteasas mejor caracterizadas y que es producida por una bacteria halófila extrema es la *Halolysin*, una serina proteasa aislada de *Natrialba asiática* de este grupo (Kamekura, M. and Seno, Y., 1990, Biochem. Cell Biol. 68: 352). Este enzima presenta gran actividad a temperaturas de 75-80°C cuando se encuentra en presencia de una concentración del 25% de NaCl. La proteasa caracterizada por Ryu y col. (R. col., 1994, Enzyme Microbiol. Technol. 16: 266) presenta unas características idóneas para su utilización en procesos de síntesis peptídica y la actividad enzimática es muy dependiente de las concentraciones salinas del medio de reacción.

Aunque la producción de enzimas extracelulares por bacterias halófilas moderadas tiene un gran interés biotecnológico, no es un campo de investigación muy estudiado. Sin embargo, los enzimas de este grupo bacteriano poseen una serie de características de tolerancia a la sal y en algunos casos también a la temperatura y pH, que los hace muy interesante para procesos industriales tales como la industria de los detergentes, en la industria del cuero, alimenticia, farmacéutica, en procesos de tratamientos de residuos industriales que poseen compuestos tóxicos, etc. (Ventosa y col., 1998, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62: 504).

En 1986 Kamekura (Kamekura, M., 1986, FEMS Microbiol. Rev. 39: 145) revisó una serie de enzimas producidas por varias especies halófilas moderadas y analizó el efecto de la sal en la producción y actividad de las mismas. Desde entonces pocos más estudios se han realizado en este campo y se encuentran recogidos en una revisión reciente (Mellado y col., en prensa, Extracellular hydrolytic enzymes produced by moderately halophilic bacteria. En: Ventosa, A., ed, Halophilic Microorganisms. Springer-Verlag, Berlin).

### Descripción detallada de la invención

En un estudio reciente se han aislado y caracterizado una serie de bacterias halófilas moderadas productoras de proteasas (Sánchez-Porro y col., 2003, J. Appl. Microbiol. 94: 295). Para ello se realizó un amplio screening a partir de diversos ambientes hipersalinos. Se aislaron un total de 201 cepas productoras de proteasas pertenecientes a los géneros *Salinivibrio*, *Halomonas*, *Bacillus*, etc. De ellas, para estudios posteriores se seleccionó una cepa de una bacteria halófila moderada aislada de una salina de Isla Cristina (Huelva), al ser la que presentaba una mayor actividad enzimática en el sobrenadante. La cepa seleccionada capaz de producir la proteasa, se caracterizó taxonómicamente; para ello se estudió tanto desde el punto de vista fenotípico como genotípico. En base tanto a la caracterización fenotípica como de comparación de secuencias del ARNr 16S, la cepa se asignó al género *Pseudoalteromonas*.

A partir de ahora nos referiremos a esta enzima como la haloproteasa CP1.

Dado el interés que industrialmente posee la disponibilidad de proteasas activas en un amplio rango de salinidad así como de pH y temperatura, según un aspecto de la presente invención se proporciona una nueva proteasa, haloproteasa CP1, así como un método de producción a partir de la cepa de *Pseudoalteromonas sp.* cepa CP76, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo bajo el número CECT 5782.

Para la descripción de la presente invención se parte de esta bacteria halófila moderada *Pseudoalteromonas sp.* cepa CP76 (Depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo bajo el n° CECT 5782) como productora de la haloproteasa CP1. En primer lugar se procedió a la optimización de las condiciones de cultivo de la cepa de *Pseudoalteromonas* para la máxima producción de la proteasa, tal y como se describe en el ejemplo 2. Se analizó la influencia de distintos nutrientes en el medio de cultivo, cuyos resultados se detallan en la Tabla 1. Dichas condiciones quedaron establecidas como: medio SW-7,5, temperatura de 37°C y 24 horas de crecimiento en matraces con buena aireación, adicionados de sacarosa, fructosa o glicerol.

Una vez establecidas las condiciones de máxima producción de proteasa se procedió a la purificación de la misma. Para ello se inocularon 2 litros de medio SW-7,5 en fase exponencial de crecimiento y se procedió a centrifugar a 12000 rpm durante 30 minutos a 4°C, para obtener el sobrenadante libre de células. Este sobrenadante se dializó con un tampón 20 mM de Tris-HCl con el fin de eliminar los restos de sales que podrían interferir en los siguientes pasos de la purificación. El dializado se pasó por una columna de intercambio iónico Q-Sepharose y se recogieron y concentraron las fracciones que mostraron actividad enzimática. A continuación se pasaron estas fracciones activas por una columna de cromatografía Superdex S-200, se recogieron las fracciones activas y se analizó mediante un gel SDS-12% PAGE. Los distintos pasos de esta purificación se muestran en la Tabla 2.

Para comprobar la purificación de la proteasa se realizó un gel de SDS-PAGE, como el que se observa en la Figura 1A, donde en el carril 2 se muestra el extracto enzimático crudo y en los carriles 3 y 4 la preparación de proteasa después de los pasos a través de las dos columnas de purificación de Q-Sepharose y de Superdex S-200. Para detectar la actividad proteasa de la enzima purificada se realizó un gel de actividad (zimograma) tal y como se describe en el apartado 3.4 del ejemplo 3 (Figura 1B).

Un vez purificada la enzima, se procedió a su caracterización bioquímica. Así, se determinaron los valores óptimos de pH, temperatura y condiciones de salinidad para su actividad. Estos ensayos se realizaron por triplicado con muestras de sobrenadante de *Pseudoalteromonas sp.* cepa CP76 incubado en las condiciones óptimas de cultivo previamente establecidas. El método seguido se describe con detalle en el ejemplo 4.

El valor de pH óptimo para la actividad enzimática fue de 8,5, observándose además que es una enzima relativamente estable a valores alcalinos de pH (Figura 2A) presentando además actividad en un amplio rango de valores de pH. Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una proteasa que es activa en un amplio rango de pH, entre valores de pH superiores a 5 y valores de pH 10. De acuerdo con otro aspecto aún más preferido de la presente invención, se proporciona una proteasa cuyo valor de pH óptimo para la actividad enzimática es de 8,5.

Por otro lado, en relación a la temperatura, se trata de una enzima moderadamente termoactiva, mostrando un óptimo de actividad a 55°C (Figura 2B). De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una proteasa que es activa en un amplio rango de temperaturas, entre 20°C y 70°C. Según otro aspecto aún más preferido de la presente invención, se proporciona una proteasa la cual alcanza el óptimo de actividad a los 55°C.

En cuanto a la actividad a las distintas salinidades, debemos indicar que la enzima posee una actividad elevada en un rango salino muy amplio, entre 0 y 4 M NaCl (Figura 2C). Por lo tanto, según un aspecto de la presente invención, se proporciona una proteasa la cual es activa en condiciones de salinidad NaCl de 0 a 4 M. De acuerdo con otro aspecto más preferido de la presente invención, se proporciona una proteasa la cual alcanza el óptimo de actividad en concentraciones de NaCl de 0 a 1 M.

Estas características excepcionales, hacen esta enzima muy interesante desde el punto de vista biotecnológico. En la industria de detergentes se requieren proteasas con un amplio rango de acción para facilitar la eliminación de manchas de los tejidos de diversos orígenes, tales como alimentos, sangre y secreciones corporales. Además la proteasa debe ser activa en un amplio rango de temperaturas y valores de pH y debe ser compatible y estable con el resto de los componentes de los detergentes. En la industria alimenticia también se requieren proteasas estables en amplios valores de temperatura, pH y salinidad, como las que se emplean rutinariamente en la elaboración de quesos, carnes, hidrolizados de soja y en la elaboración del pan.

Para determinar el peso molecular de la enzima pura se realizó un gel de actividad en condiciones nativas, observándose una sola banda de 38 kDa, indicando que se trata de un monómero. Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una proteasa cuya masa molecular estimada por electroforesis en condiciones desnaturizantes es de 38 kDa.

Estudios cinéticos en presencia de distintas concentraciones de caseína como sustrato nos han permitido determinar la cinética de la haloproteasa CP1 como una cinética de Michaelis-Menten y el valor de la Km es de 7,1 mg, medido a pH 8,5 y 55°C. La Vmax calculada según la ecuación de Lineweaver-Burk es de 961 U/mg. Por lo tanto, la presente invención proporciona una proteasa cuyos parámetros cinéticos son Km: 7,1 mg y Vmax: 961 U/mg.

## ES 2 247 874 B1

Continuando la caracterización bioquímica de la haloproteasa CP1 se estudió la actividad de la misma en medios de reacción con distintos sustratos, tales como urea, SDS, sulfato amónico, guanidina HCl, 2-mercaptoetanol y ditiotreitól. Estos ensayos se realizaron por triplicado añadiendo en cada caso el sustrato correspondiente al buffer de reacción 50 mM Tris-HCl pH 8,5.

5

La actividad proteolítica de la proteasa CP1 fue inhibida por distintas concentraciones de SDS (0,1 y 0,5%), urea y guanidina HCl (0,4, 0,8 y 1,6 M), lo cual nos indica que los puentes de hidrógeno son importantes para la actividad de la enzima. La adición de una concentración de urea de 0,8 M a la mezcla de incubación incrementa levemente la actividad enzimática (14%) si lo comparamos con el control de la reacción, sin embargo, la adición de una mayor concentración de urea (1,6 M) afecta negativamente a la actividad (82%). La inhibición que sufre la proteasa CP1 cuando se añade ditiotreitól (1 y 10 mM) y 2-mercaptoetanol (1 y 10 mM) sugiere que los puentes disulfuro también son importantes en el mantenimiento de la conformación funcional de la enzima.

15

Para clasificar la proteasa CP1 dentro de algunos de los tipos de proteasas conocidos se realizó el ensayo enzimático de la misma usando distintos inhibidores específicos de proteasas (Tabla 3). Para la realización de este apartado de la caracterización bioquímica se procedió de la misma forma descrita anteriormente, realizando cada ensayo por triplicado y adicionando cantidades crecientes de estos inhibidores específicos al tampón de reacción 50 mM Tris-HCl pH 8,5. Los inhibidores usados fueron: antipaina, bestatina, quimostatina, E-64, EDTA-Na, leupeptina, pepstatina, fosforamidón, pefabloc, PMSF y aprotinina. La actividad de la haloproteasa CP1 se vio inhibida cuando se usaron PMSF, pefabloc (inhibidores específicos de serinas proteasas) y EDTA (quelante de metales e inhibidor de metaloproteasas). Los inhibidores de cisteinas proteasas E-64 y leupeptina no ejercieron ningún efecto en la actividad enzimática, sin embargo se observó un aumento de actividad al añadir fosforamidón, un inhibidor de metaloendopeptidasas. En base a estos resultados podríamos clasificar a la haloproteasa CP1 como una serina metaloproteasa.

25

Se ha estudiado también la influencia de distintos metales en la actividad enzimática. Se realizó el ensayo enzimático añadiendo al tampón de reacción 50 mM Tris-HCl pH 8,5 los siguientes metales: NiCl<sub>2</sub> CuCl<sub>2</sub> MgCl<sub>2</sub> ZnCl<sub>2</sub> CaCl<sub>2</sub> MnCl<sub>2</sub> BaCl<sub>2</sub> CoCl<sub>2</sub> S<sub>2</sub>Cl. En todos los casos se observó una inhibición de la actividad enzimática.

30

A continuación se procedió a secuenciar el extremo amino terminal de la haloproteasa CP1, según el método de degradación de Edman. La secuencia obtenida, SEQ. ID. NO 1 se comparó con las bases de datos Swiss-Prot y Genbank, y se observó una alta homología con metaloproteasas de diferentes organismos. La homología más alta la presenta con una metaloproteasa de una bacteria extremófila aislada de la Antártida (número de acceso de GenBank AF272770). Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, ésta proporciona una proteasa cuya secuencia N-terminal viene descrita como SEQ ID NO 1.

35

Los siguientes ejemplos describen en detalle, sin limitación, la presente invención.

### Ejemplo 1

40

#### *Ensayo de la actividad proteasa*

45

La detección de la actividad proteasa en el sobrenadante de los cultivos bacterianos se realizó según el método descrito por Kunitz (Kunitz, 1947, J. Gen. Physiol. 30: 291) con algunas modificaciones. Para la realización del ensayo se incubaron 100  $\mu$ l de sobrenadante de la cepa a la cual se quiere medir la actividad con 400  $\mu$ l de un tampón que contiene un 0,5% de caseína (Hammarsten, Merck) en 50 mM de Tris-HCl pH 8,5. La mezcla de reacción se incubó durante 30 minutos a 37°C. Para detener la reacción se añadieron 500  $\mu$ l de ácido tricloroacético al 10% y se mantuvo a temperatura ambiente durante al menos 10 minutos. Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 13000 rpm, se midió la absorbancia a 280 nm y se comparó con un control (misma mezcla pero sin incubarse). Para la determinación de la concentración total de proteínas se utilizó el método descrito por Bradford (Bradford, 1976, Anal. Biochem. 72: 248).

50

### Ejemplo 2

55

#### *Determinación de las condiciones óptimas para la producción de la haloproteasa CP1 en Pseudoalteromonas sp. cepa CP76*

60

Con objeto de establecer las condiciones óptimas de cultivo para la máxima actividad enzimática, se analizó la influencia de diversos factores tales como: 1) condiciones de oxigenación, 2) el tiempo de incubación del cultivo bacteriano, (3, 5, 10, 20, 30, 40 y 60 horas), 3) la concentración de sales del medio de cultivo (de 0 a 25%) y 4) la presencia o ausencia de distintas fuentes de carbono en el medio de cultivo (Tabla 1). Para ello se determinó la actividad proteasa en el sobrenadante de los cultivos celulares incubados en las distintas condiciones, según el método descrito en el ejemplo 1.

65

Inicialmente, se procedió a la determinación del espectro salino de crecimiento de la cepa a distintas concentraciones de sales (0, 0,5, 1, 2, 3, 5, 7,5, 10, 15, 20 y 25%). Para ello se utilizó un medio salino al que a partir de ahora nos referiremos como medio SW. Este medio se prepara a partir de una solución base de sales al 30% (Sudow, N.N., 1931, Oceanographical tables. Commissariat of agriculture of URSS. Hydro-Meteorological Committee of URSS. Oceanographical Institute of URSS. Moscow) cuya proporción de sales es (g/l) : NaCl, 234; MgCl<sub>2</sub>. 6H<sub>2</sub>O,

## ES 2 247 874 B1

39,0; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 61,0; CaCl<sub>2</sub>, 1; KCl, 6,0; NaHCO<sub>2</sub>, 0,2; NaBr, 0,7, a la cual se adiciona un 0,5% de extracto de levadura. El pH de dicho medio se ajustó a 7,5. Para preparar las soluciones de las distintas concentraciones salinas, se hicieron las diluciones pertinentes a partir de la solución concentrada. Se determinó la curva de crecimiento de la cepa midiendo la D.O. a 600 nm de los cultivos a distintos tiempos. Del mismo modo se determinó las condiciones óptimas para la máxima producción de esta proteasa por la cepa de *Pseudoalteromonas*. Se procedió a determinar la concentración de NaCl óptima para la máxima producción de proteasa (Figura 3). Para este estudio se utilizó el medio de sales SW líquido, con la concentración salina final adecuada para cada caso. Se usaron matraces de 250 ml añadiendo en cada uno 100 ml de medio de cultivo. Se partió de un cultivo de 16 h de *Pseudoalteromonas sp* cepa CP76 y se inocularon los distintos matraces con 50 µl de cultivo y se incubaron a 37°C. Se tomaron muestras cada hora y se realizó el ensayo enzimático descrito en el ejemplo 1 a cada muestra de sobrenadante determinándose la máxima producción de proteasa a 7,5% de sales tras 24 horas de incubación a 37°C y en matraces con buena aireación.

Una vez determinada la concentración de sales óptimas, la temperatura y el tiempo de incubación para la máxima producción de proteasa se procedió a estudiar la influencia de la composición del medio de cultivo tanto en el crecimiento de *Pseudoalteromonas sp* cepa CP76 como en la producción de la haloproteasa CP1 por dicho microorganismo. Para ello se prepararon distintos medios de cultivo, usando SW-7,5, como base y añadiendo en cada caso el nutriente en estudio. Se utilizaron los siguientes nutrientes: lactosa 50 mM, sacarosa 50 mM, maltosa 50 mM, fructosa 50 mM, glucosa 50 mM, NH<sub>4</sub>Cl 50 mM, glicerol 1% (p/v), manitol 1% (p/v) y casaminoácidos 1% (p/v). También se usó peptona 1% (p/v) y caldo nutritivo 1% (p/v). En este caso también se usaron matraces de 250 ml con 100 ml de medio cada uno. A partir de un cultivo de *Pseudoalteromonas sp* cepa CP76 de 16 horas se inocularon estos medios con 50 mMl del mismo. Al añadir al medio de cultivo sacarosa, glicerol o fructosa la actividad proteasa se ve aumentada. Asimismo, cuando se añade al medio casaminoácidos, peptona o caldo nutritivo, el crecimiento de *Pseudoalteromonas sp* cepa CP76 se ve potenciado aunque la producción de la proteasa se ve disminuida. Estos resultados se muestran en la Tabla 1.

### Ejemplo 3

#### *Purificación de la haloproteasa CP1 a partir de cultivos de Pseudoalteromonas sp, cepa CP76*

##### 3.1. Diálisis del sobrenadante

Para eliminar los restos de sales presentes en el sobrenadante que podrían interferir en los siguientes pasos de purificación se procedió a su dializado. Para ello se prepararon 6 litros de Tris-HCl 0,02 M pH 8,5. Se usaron bolsas de diálisis de 21 mm de diámetro (SERVAPOR® Dialysis Tubing, SERVA). Se procedió al lavado de las bolsas de diálisis con Tris-HCl 0,02 M pH 8,5 y se llenaron con el sobrenadante. Se cerraron las bolsas con unas pinzas, se introdujeron en probetas de 3 litros de capacidad y se mantuvieron 16 horas en agitación lenta a 4°C. Se recuperó el dializado y se realizó el ensayo enzimático detallado en el ejemplo 1 para comprobar que no se había perdido la actividad proteasa.

##### 3.2. Preparación de las columnas de purificación

Para la purificación de la haloproteasa CP1 se utilizó en primer lugar una columna de intercambio iónico, concretamente Q-Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech 17-0510-10). En primer lugar, para equilibrar la columna, se añadieron 100 ml del buffer Tris-HCl 0,02 M pH 8,5 a una velocidad de 8-10 ml/min. Una vez equilibrada, se añadió el dializado obtenido en el apartado anterior a una velocidad de 10-15 ml/min. Seguidamente se procedió a eluir la columna, usando el buffer Tris-HCl 0,02 M, ClNa 1 M recogiendo las fracciones en tubos colectores de 5 ml de capacidad, recogiendo en cada uno de ellos 2,5 ml. La unión de los iones Cl<sup>-</sup> a la columna va liberando la proteasa unida a ella que se recogerá en los tubos colectores. Seguidamente se realizó el ensayo enzimático descrito en el ejemplo 1 a cada una de las fracciones eluidas, seleccionando aquellas que presentaban actividad.

Las fracciones activas se concentraron a un menor volumen usando el sistema de filtración AMICON. Columna de gel filtración SUPERDEX S-200

Una vez concentradas las fracciones activas, en un segundo y último paso de purificación se utilizó una columna SUPERDEX S-200, que separa las proteínas en función de su peso molecular. Se equilibró la columna con buffer Tris-HCl 0,02 M, NaCl 0,5 M y se adicionó el concentrado de muestras obtenidas en la elución de la columna de Q-Sepharose Fast Flow. Para eluir esta columna se utilizó el mismo buffer usado para el equilibrado de la misma y se recogieron las fracciones en tubos colectores. Se realizó el ensayo enzimático de actividad a las distintas fracciones y se seleccionaron las que presentaban actividad.

##### 3.3. Gel SDS- Acrilamida

La electroforesis de proteínas se realizó siguiendo el método descrito por Laemmli. (Laemmli, 1970, Nature 227: 680).

Se utilizaron geles verticales de poliacrilamida con la siguiente composición:

## ES 2 247 874 B1

Fase inferior o de separación: 1,2 ml agua destilada, 2,5 ml 30% acrilamida, 1,3 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 50  $\mu$ l 10% SDS, 50  $\mu$ l 10% APS y 2  $\mu$ l TEMED.

5 Fase superior o de concentración: 2,7 ml agua destilada, 670  $\mu$ l 30% acrilamida, 500  $\mu$ l 1,5 M Tris-HCl pH 6,8, 40  $\mu$ l 10% SDS, 40  $\mu$ l 10% APS y 4  $\mu$ l TEMED.

10 Las muestras se mezclaron al 50% con tampón de carga (2,5 ml Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, 4 ml SDS 10% (p/v), 0,5 ml 0,1% azul de bromofenol, 2 ml glicerol, 0,5 ml  $\beta$ -mercaptoetanol y agua destilada hasta 10 ml), se calentaron a 95°C durante 5 minutos y se cargaron en el gel de acrilamida. Como marcador de pesos moleculares se utilizó Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis (Amersham Pharmacia Biotech). Se introdujo el gel en una cubeta de electroforesis (BIO-RAD) con el tampón (29 g Tris base/litro, 144 g glicina/litro y 10 g SDS/litro) y se sometió a una diferencia de potencial de 120 V durante al menos 3 horas. Una vez finalizada la electroforesis los geles se tiñeron con Azul de Comassi R-250 (Sigma) durante 1 hora y se destiñeron durante al menos 6 horas en una solución decolorante que contiene 10% ácido acético y 10% metanol.

15

### 3.4. Zimograma

15 Para determinar la actividad de la proteasa CP1 una vez purificada se realizó un gel de actividad (zimograma) tal y como describen Heussen y Dowdle (Heussen and Dowdle, 1980, Anal. Biochem. 102: 196) con la siguiente composición:

20 Fase inferior o de separación: 0,7 ml agua destilada, 1 ml gelatina 0,5%, 2 ml 30% acrilamida, 1,3 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 50  $\mu$ l 10% SDS, 50  $\mu$ l 10% APS y 2  $\mu$ l TEMED.

25 Fase superior o de concentración: 2,7 ml agua destilada, 670  $\mu$ l 30% acrilamida, 500  $\mu$ l 1,5 M Tris-HCl pH 6,8, 40  $\mu$ l 10% SDS, 40  $\mu$ l 10% APS y 4  $\mu$ l TEMED.

30 Se mezcló 5  $\mu$ l de la proteasa CP1 al 50% con tampón de carga (2,5 ml Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, 4 ml SDS 10% (p/v), 0,5 ml 0,1% Azul de bromofenol, 2 ml glicerol, 0,5 ml R-mercaptoetanol y agua destilada hasta 10 ml), se cargaron en el gel que se introdujo en una cubeta de electroforesis (BIO-RAD) con el tampón (29 g Tris base/litro, 144 g glicina/litro y 10 g SDS/litro) y se sometió a una diferencia de potencial de 120 V durante al menos 3 horas. Una vez terminada la electroforesis el gel se sumergió durante 30 minutos en una solución de Tritón X-100, 0,25% (v/v) para eliminar los restos de SDS y se incubó en las condiciones óptimas para la máxima actividad proteasa, siendo éstas: tampón 50 mM de Tris-HCl pH 8,5, durante 30 minutos a 55°C de temperatura. Seguidamente el gel se tiñó con una solución al 0,6% (p/v) de amido black en agua: etanol: ácido acético (60:30:10) durante una hora y se destiñó en una solución de agua:etanol:ácido acético (60:30:10) durante 2 horas.

35 Ejemplo 4

### 40 Caracterización bioquímica de la haloproteasa CP1

#### 4.1. Determinación del pH óptimo de actividad

45 Para determinar el pH óptimo de actividad se realizó el ensayo descrito por Kunitz (Kunitz, 1947, J. Gen. Physiol. 30: 291) con las modificaciones detalladas anteriormente, pero variando el pH de las soluciones tampón utilizadas durante la incubación de la mezcla de reacción. Se utilizaron 5  $\mu$ l de la enzima pura en cada reacción.

50 Se utilizó el buffer universal (2,69 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/litro, 2,28 ml CH<sub>3</sub>COOH/litro, 2,47 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/litro) ajustado a distintos valores de pH.

55 La haloproteasa CP1 presenta actividad en un amplio rango de valores de pH (entre pH 5 y 10), siendo a pH 8,5 el valor donde esta actividad es máxima (Figura 2A).

#### 4.2. Determinación de la temperatura óptima de actividad

60 Para calcular la temperatura óptima de actividad de la enzima, se utilizó el mismo método de valoración de la actividad proteasa, variándose en este caso, la temperatura de incubación de la mezcla de reacción. Se ensayaron las siguientes temperaturas: 25, 37, 45, 55, 65, 75, 85 y 95°C.

65 La haloproteasa CP1 es activa en un rango de temperatura comprendido entre 25 y 75°C. La temperatura óptima de actuación es de 55°C (Figura 2B).

#### 4.3. Determinación de la concentración de NaCl óptima de actividad

Para determinar la concentración salina óptima de actividad de la enzima, se utilizó distintas concentraciones de NaCl en la mezcla de reacción, antes de la incubación de la misma. Así, se adicionó NaCl hasta obtener unas concentraciones finales en la mezcla de reacción de 0 a 4 M. Paralelamente se realizó el ensayo sin añadir NaCl.

## ES 2 247 874 B1

La haloproteasa CP1 presenta actividad a todas las concentraciones de NaCl ensayadas, presentando un óptimo entre 0 y 1 M (Figura 2C).

### 4.4. Determinación de la hidrólisis de diferentes sustratos

Para determinar los diferentes sustratos sobre los que la proteasa CP1 es capaz de actuar se procedió a realizar el ensayo enzimático descrito en el ejemplo 1 de la presente invención, utilizando en cada caso el sustrato correspondiente.

Los sustratos ensayados fueron: caseína, gelatina, azocaseína, seroalbúmina, ovoalbúmina y keratina.

La proteasa CP1 es capaz de hidrolizar la gelatina, azocaseína, albúmina y caseína, presentado con esta su mayor actividad.

### 4.5. Determinación del peso molecular

Para determinar el peso molecular de la proteasa CP1 se procedió de la siguiente manera: se realizó un gel de SDS-PAGE como se describe en el apartado 3.3 del ejemplo 3, utilizando 5  $\mu$ l de la proteasa CP1 purificada mezclado al 50% con el tampón de carga y se calentó a 60°C durante 10 minutos. Como marcador de pesos moleculares Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis (Amersham Pharmacia Biotech).

El peso molecular de cada banda es conocido: Fosforilasa B: 97 kDal, Albúmina: 66 kDal, Ovoalbúmina: 45 kDal, Anhidrasa Carbónica: 30 kDal, Tripsina: 20 kDal,  $\alpha$ -Lactoalbúmina: 14 kDal.

El gel se tiñó 1 hora con Azul de Comassi y se decoloró 4 horas con solución decolorante (10% Ácido acético y 10% metanol).

Para determinar el peso molecular se midió la distancia entre el frente del gel y cada una de las bandas, tanto del marcador de pesos moleculares como de la proteasa purificada y por extrapolación se determinó el peso molecular exacto de la haloproteasa CP1 siendo de 38 Kdal.

### 4.6. Determinación de la Km y Vmax

Para determinar los parámetros cinéticos de la proteasa CP1 se procedió a realizar el ensayo enzimático descrito en el ejemplo 1 disolviendo en el buffer Tris-HCl 0,05 M pH 8,5 concentraciones crecientes de caseína con el fin de saturar la actividad proteolítica de la enzima.

Se utilizaron las siguientes concentraciones de caseína: 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,75% y 1%, disueltas en el tampón de reacción del ensayo enzimático. Introduciendo los datos de actividad en la ecuación de Lineweaver-Burk se deducen los parámetros cinéticos siendo estos: Km: 7,1 mg y Vmax: 961 U/mg.

### 4.7. Estudio de la estabilidad de la haloproteasa CP1 en distintas condiciones

Para analizar la termoestabilidad de la enzima las muestras se incubaron durante 60, 120, 180 y 240 minutos en buffer Tris-HCl pH 8,5 con una concentración 1 M de NaCl a las temperaturas de 50 y 55°C, en esas condiciones la actividad proteasa se midió en las condiciones standard utilizando como sustrato la caseína. A 50°C la proteasa purificada retiene un 60% y 23% de la actividad inicial después de 60 y 240 minutos de incubación respectivamente. Del mismo modo, se determinó la estabilidad a distintas concentraciones de NaCl (0,5 a 4 M NaCl) después de una preincubación de la enzima a 4°C durante 24 horas. Los resultados mostrados en la Figura 4, claramente indican que la enzima es estable en un rango entre 0 y 2 M NaCl y retiene un 60% de actividad a 4 M de NaCl.

### 4.8. Inhibidores enzimáticos

Para clasificar a la haloproteasa CP1 dentro de algunos de los grupos de proteasas descritos se procedió a realizar el ensayo enzimático de actividad detallado en el ejemplo 1 añadiendo al buffer de reacción 50 mM Tris-HCl, pH 8,5, distintos inhibidores de proteasas conocidos. Se utilizó: Dihidrocloruro de Antipaina 1 mM, inhibidor de papaínas y tripsinas Bestatina 0,5 M, inhibidor de aminopeptidasas Quimostatina 0,5 mM, inhibidor de  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$  Quimotripsinas E-64 0,5 mM, inhibidor de cisteinas proteasas Leupeptina 0,5 mM, inhibidor de cisteinas proteasas Peptatina 0,1 mM, inhibidor de aspartato proteasas Fosforamidon 1 mM, inhibidor de metaloendopeptidasas EDTA-Na2 1,5 mM, 5 mM, 10 mM, inhibidor de metaloproteasas Pefabloc 5 mM, 10 mM, inhibidor de serinas proteasas Parametil sulfonil fluoride (PMSF) 1 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, inhibidor de serinas proteasas Aprotinina 0,01 mM, 0,05 mM, inhibidor de serina proteasas.

Se otorgó el valor máximo de 100% a la actividad proteasa obtenida cuando se realizó el ensayo enzimático sin añadir ningún inhibidor, los resultados de estos ensayos se detallan en la Tabla 3.

## ES 2 247 874 B1

### 4.9. Influencia de metales pesados

Para estudiar la influencia de los metales en la actividad proteasa se realizó el ensayo enzimático descrito en el ejemplo 1, añadiendo al buffer de reacción 0,5 M Tris-HCl pH 8,5, distintos metales. La concentración de los iones usados fue de 5 y 10 mM y los iones usados fueron los siguientes: NiCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, S<sub>2</sub>Cl.

En todos los casos se detectó una inhibición de la actividad de la proteasa CP1.

### 10 Ejemplo 5

#### Secuenciación del extremo amino terminal

La identificación del extremo amino terminal de proteínas y péptidos es esencial para la caracterización estructural y funcional de dominios proteicos. Para la obtención de la secuencia amino terminal de la haloproteasa CP1 se procedió a la realización de un Western Blotting; para ello se realizó un gel de SDS-PAGE con la enzima purificada. El gel se sumergió en el tampón de transferencia (39 mM de glicina, 48 mM de Tris-C1, 0.0375%(p/v) SDS y 20% de metanol) durante 5 minutos. Posteriormente se humedecieron 6 papeles Whatman 3MM CHR en este buffer de transferencia y se realizó la transferencia de la proteína a un filtro de nitrocelulosa.

La secuencia N-terminal de proteínas y péptidos se determinó usando repetidas veces (manual o automáticamente) los ciclos de Degradación de Edman.

La secuencia N-terminal de la haloproteasa CP1 así determinada se adjunta como SEQ. ID. NO 1.

### 25 Descripción detallada de las figuras

#### Figura 1

30 A. Electroforesis SDS-PAGE. 1) Marcador de pesos moleculares, 2) Preparación dializada de extracto crudo del sobrenadante, 3) Preparación de la proteasa después del paso a través de la columna de purificación de Q-Sepharose, 4) Preparación de la proteasa después del paso a través de la columna de purificación de Superdex S-200.

35 B. Zimograma. 1) Marcador de pesos moleculares 2) Preparación de la proteasa después del paso a través de la columna de purificación de Superdex S-200.

Figura 2. Efecto de A) pH, B) Temperatura y C) Concentración de NaCl de la haloproteasa CP1.

40 Figura 3. Producción de la haloproteasa CP1 durante el crecimiento de *Pseudoalteromonas sp.* cepa CP76. Influencia de la fase de crecimiento y de la salinidad del medio de cultivo (3 a 15% de sales totales) en la actividad proteasa relativa. La actividad proteasa relativa se define como el porcentaje de actividad observado en relación al mayor valor obtenido en el ensayo. Las muestras se tomaron a distintos tiempos para la determinación de la densidad óptica a 600 nm y la determinación de la actividad caseinólítica. Estos datos representan los valores promedios de tres experimentos. (-◆- SW-3, -■- SW-7,5, -▲- SW-10, -●- SW15).

45 Figura 4. A) Termoestabilidad de la proteasa CP1 a 55°C (-v-) y 50°C (-λ-). B) Estabilidad de la proteasa CP1 a diferentes concentraciones de NaCl. Para determinar la termoestabilidad la solución enzimática se incubó durante 60, 120, 180 y 240 minutos en solución tampón 50 mM Tris-HCl + 1 M NaCl pH 8,5. La estabilidad de la enzima a distintas concentraciones de NaCl se determinó incubando la solución enzimática en soluciones tampón conteniendo varias concentraciones de NaCl (hasta 4 M NaCl) durante 24 horas a 4°C y midiendo la actividad residual.

### 55 Listado de Secuencias

NÚMERO DE SECUENCIAS: 1

INFORMACIÓN SOBRE LA SECUENCIA 1:

60 CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

LONGITUD: 17

65 TIPO: PRT

FUENTE: *Pseudoalteromonas sp.* Cepa CECT 5782

## ES 2 247 874 B1

DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: Haloproteasa CP1

SEQ ID NO 1

5 Ala Asp Ala Thr Gly Pro Gly Gly Asn Gln Lys Thr Gly Gln Tyr  
1 5 10 15

Asn Tyr

10

TABLA 1

*Efecto de la composición del medio de cultivo en la actividad de la haloproteasa CP1*

15

Nutriente	Crecimiento (D.O. <sub>600</sub> )	Actividad (Unids.)	Producción proteasa (Unids./O.D. <sub>600</sub> )	Actividad relativa (%) <sup>a</sup>
<b>SW-7,5</b>	1,2	6,3	5,1	100
Lactosa	1,2	5,8	4,7	92,3
Sacarosa	1,2	6,9	6,0	117,3
Glicerol	1,2	6,7	5,4	106,3
30 Maltosa	1,3	0,5	0,5	7,87
Manitol	1,4	5,0	3,6	69,7
Fructosa	1,2	6,7	5,6	110,5
Glucosa	1,4	6,6	4,7	92,9
35 NH <sub>4</sub> Cl	1,4	5,7	4,2	82,7
Casaminoácidos	1,6	6,5	4,2	82,1
Casaminoácidos +NH <sub>4</sub> Cl	1,6	4,0	2,4	47,6
40 Caldo Nutritivo	1,6	5,2	3,2	63,6
Peptona	1,7	6,8	4,0	77,7

45

Para todos los estudios nutritivos se utilizó el medio de cultivo SW-7,5 adicionado con 0,5% (p/v) de extracto de levadura y el nutriente correspondiente (50 mM de cada carbohidrato y NH<sub>4</sub>Cl y 1% (p/v) de glicerol, manitol y casaminoácidos). Las muestras fueron obtenidas en la fase estacionaria de crecimiento (24 horas) y la actividad proteolítica fue determinada usando 100 µl de sobrenadante y realizando el ensayo enzimático.

50

<sup>a</sup> La actividad proteasa relativa fue determinada asignando el valor de 100% de actividad al ensayo enzimático realizado usando el medio SW-7,5.

55

60

65

# ES 2 247 874 B1

TABLA 2

*Purificación de la haloproteasa CPI*

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Purificación	Proteínas totales (mg.)	Actividad total (Unids.)	Act. Esp. (Unids./mg.)	Factor Purificación	Rendimiento (%)
Sobrenadante	30,5	69,2	2,3	1	100
Q- Sepharose	0,162	7,9	48,6	21,4	11,3
Superdex- 200	0,015	2,0	133	64,8	2,9

## ES 2 247 874 B1

TABLA 3

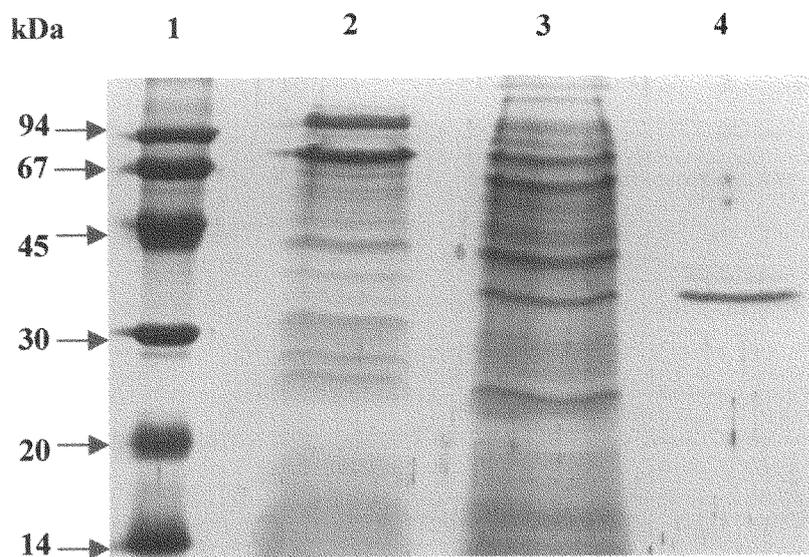
*Efecto de distintos inhibidores en la actividad haloproteasa de CPI*

<b>Inhibidor</b>	<b>Concentración (mM)</b>	<b>Actividad Residual (%)</b>
<b>Control</b>	-	100
<b>Antipaina</b>	1	92
Bestatina	0,5	100
Quimostatina	0,5	100
E-64	0,5	100
EDTA-Na	10	59
Leupeptina	0,5	100
Pepstatina	0,1	100
Fosforamidón	1	112
Pefabloc	10	81
PMSF	5	66
	10	17
	20	13
<b>Aprotinina</b>	<b>0,05</b>	<b>87</b>

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Proteasa **caracterizada** porque actúa de forma específica hidrolizando la caseína, la gelatina y la albúmina.
2. Proteasa según la reivindicación 1, **caracterizada** porque es producida por una bacteria halófila moderada del género *Pseudoalteromonas*.
- 10 3. Proteasa según las reivindicaciones 1-2, **caracterizada** porque es producida por la cepa CECT 5782 correspondiente a una bacteria halófila moderada del género *Pseudoalteromonas*.
4. Proteasa según las reivindicaciones 1-3, **caracterizada** porque es activa en condiciones salinas y no salinas, concretamente actúa en condiciones de salinidad NaCl de 0 a 4 M, alcanzando el óptimo de actividad en concentraciones de NaCl de 0 a 1 M.
- 15 5. Proteasa según las reivindicaciones 1-4, **caracterizada** porque es activa en un amplio rango de pH, alcanzando el óptimo de actividad con un pH = 8,5.
6. Proteasa según las reivindicaciones 1-5, **caracterizada** porque es activa en un amplio rango de temperaturas, concretamente entre 20°C y 70°C, alcanzando el óptimo de actividad a los 55°C.
- 20 7. Proteasa según las reivindicaciones 1-6 **caracterizada** porque tiene una masa molecular estimada por electroforesis en condiciones desnaturalizantes de 38 kDa.
8. Proteasa según las reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque sus parámetros cinéticos son Km: 7,1 mg y Vmax: 961 U/mg.
- 25 9. Proteasa según las reivindicaciones 1-8 **caracterizada** porque es una serina metaloproteasa
10. Proteasa según las reivindicaciones anteriores, **caracterizada** porque la secuencia N-terminal es la SEQ.ID. NO 1.
- 30 11. Procedimiento para la obtención de la proteasa de la bacteria halófila moderada *Pseudoalteromonas sp.* cepa CECT 5782 según las reivindicaciones 1-10 **caracterizado** por la producción de la enzima en cultivo de la bacteria en un medio salino SW-7,5, con una temperatura de incubación de 37°C durante 24 horas de crecimiento de los cultivos con buena aireación, utilizando como inductores de la producción de la enzima tres fuentes de carbono como son sacarosa, fructosa y glicerol.
- 35 12. Procedimiento para la obtención de la proteasa de la bacteria halófila moderada *Pseudoalteromonas sp.* cepa CECT 5782 según la reivindicación 11 **caracterizado** por purificar la proteasa producida por la bacteria halófila moderada *Pseudoalteromonas sp.* cepa CECT 5782 utilizando cromatografía de intercambio iónico y gel de filtración.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

A)



B)

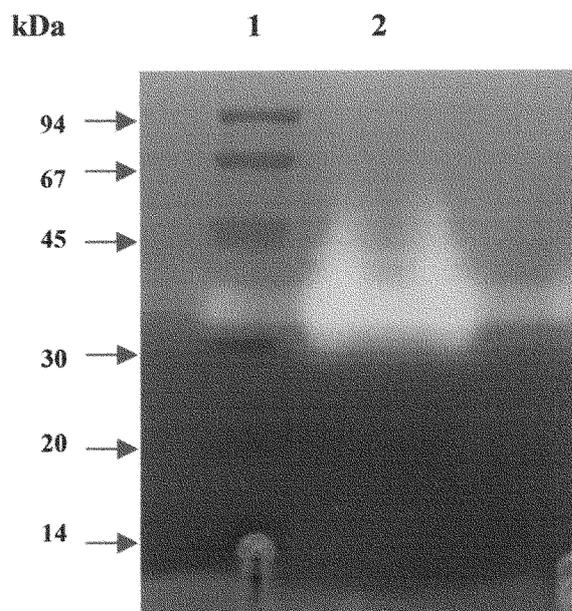
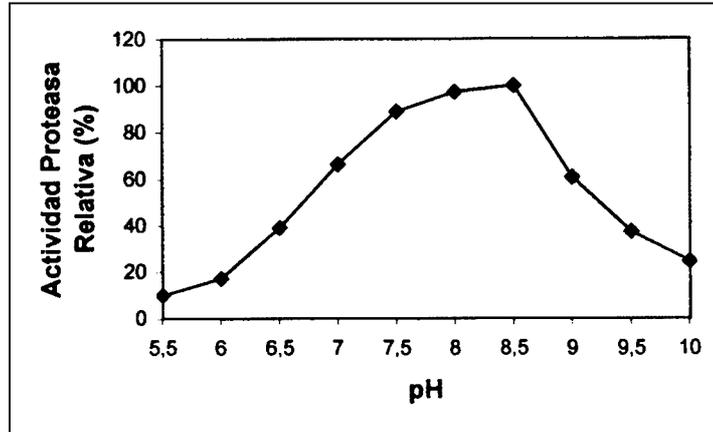
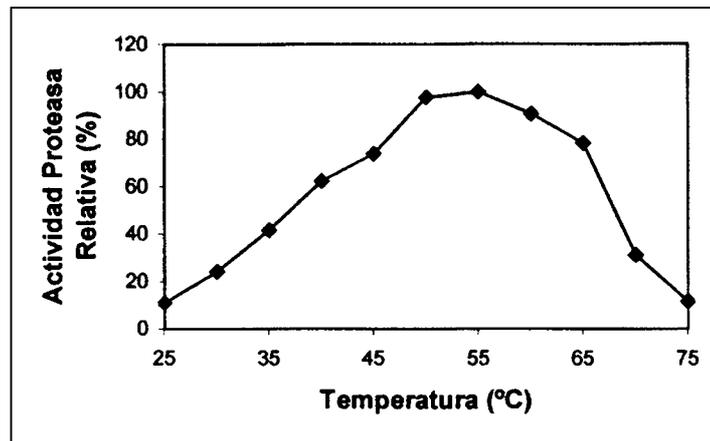


FIGURA 1

A)



B)



C)

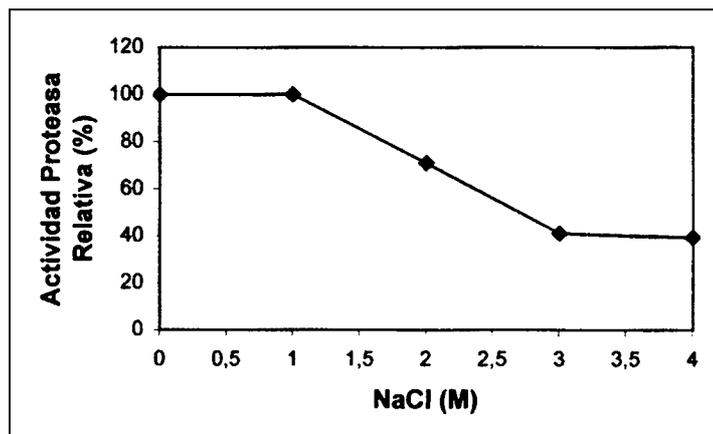


FIGURA 2

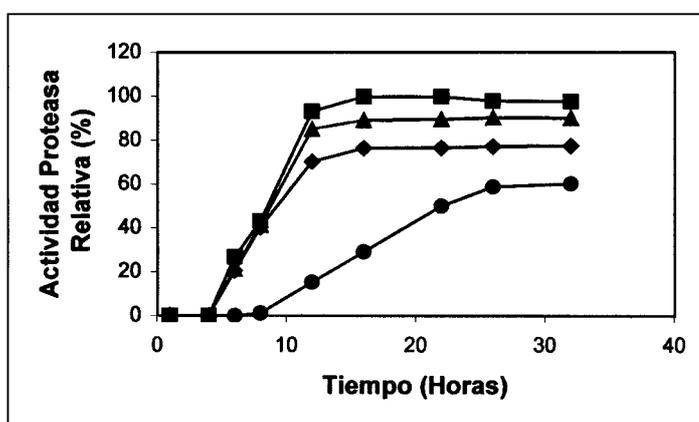
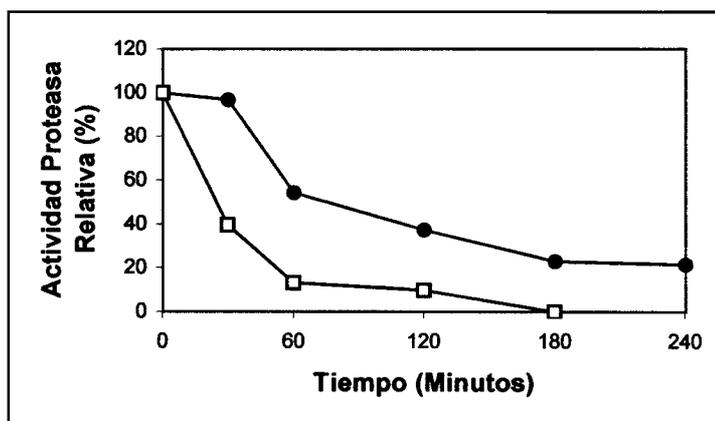


FIGURA 3

A)



B)

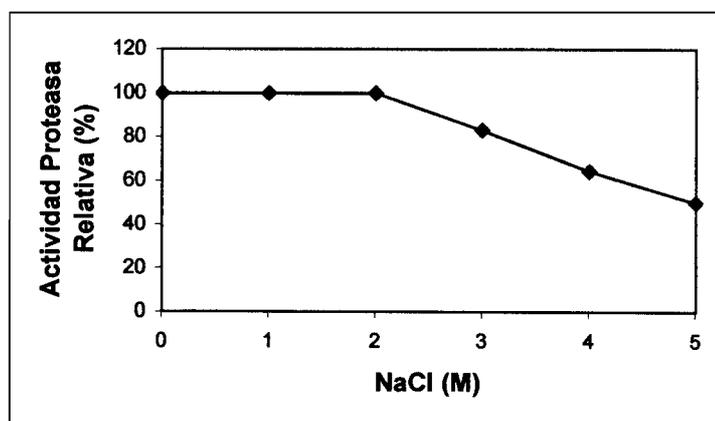


FIGURA 4

# ES 2 247 874 B1

## LISTA DE SECUENCIAS

### INFORMACIÓN GENERAL

5 <110> SOLICITANTE: Universidad de Sevilla

DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:

DESTINATARIO: Universidad de Sevilla

10 CALLE: C/ Valparaíso, 5 la Planta

CIUDAD: Sevilla

PAIS: España

ZIP: 41013

15 <120> TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Nueva haloproteasa producida por una bacteria halófila moderada: modo de producción de la enzima.

### INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 1:

20 CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

<211> LONGITUD: 17 amino ácidos

25 <212> TIPO: amino ácido

<213> ORGANISMO:  
*Pseudoalteromonas sp. CECT 5782*

30 <400> DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA:  
SEQ ID NO 1:

35 Ala Asp Ala Thr Gly Pro Gly Gly Asn Gln Lys Thr Gly  
1 5 10  
Gln Tyr Asn Tyr  
15

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 247 874

② N° de solicitud: 200300745

③ Fecha de presentación de la solicitud: 26.03.2003

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12N 9/52** (2006.01)  
C12R 1/01 (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X A	JP 3004789 A (NODA INST SCI RES) 01.10.1991	1-3 4-12
X A	KAMEKURA M. et al. "Protease formation by a moderately halophilic Bacillus strain". Appl Microbiol. 1974 Abril; Vol. 27, N° 4, páginas 809-10.	1-3 4-12
X	KIM J. et al. Unusual salt and solvent dependence of a Protease from an Extreme Halophile". Biotechnology an bioengineering 1997; Vol. 55, N° 3, páginas 471-479.	1-3
X	DEMIRJIAN DC. et al. "Enzymes from extremophiles". Curr Opin Chem Biol. 2001 Abril; Vol. 5, N° 2, páginas 144-51.	1-3
A	CAVICCHIOLI R. et al. "Low-temperature extremophiles and their applications". Curr Opin Biotechnol. 2002 Jun; Vol. 13, N° 3, páginas 253-61.	1-12

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<b>Fecha de realización del informe</b> 06.02.2006	<b>Examinador</b> J. Manso Tomico	<b>Página</b> 1/1
---	--------------------------------------	----------------------