



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 094 695**

② Número de solicitud: 9500467

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>: C12N 1/20

C07K 14/215

C12P 21/02

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **09.03.95**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.97**

Fecha de concesión: **28.07.97**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.09.97**

⑮ Fecha de publicación del folleto de patente:  
**01.09.97**

⑰ Titular/es: **Universidad de Alicante  
Ctra. San Vicente del Raspeig, s/n  
03690 San Vicente del Raspeig, Alicante, ES**

⑱ Inventor/es: **Meseguer Soria, Inmaculada;  
Torreblanca Calvo, Marina;  
Soria Escoms, Bernat;  
Colom Valiente, Francisca y  
Alba Carballo, Itziar**

⑳ Agente: **Ungría López, Javier**

⑳ Título: **Nueva cepa de *Haloferax gibbonsii*, Halocina H7 producida por ella y procedimiento de obtención de ambas.**

㉑ Resumen:

Nueva cepa de *Haloferax gibbonsii*, halocina H7 producida por ella y procedimiento de obtención de ambas.

La nueva cepa es una variedad de *Haloferax gibbonsii* depositada como CECT 4547 y se obtiene mediante una serie de subcultivo de la cepa salvaje Ma 2.39 de *Haloferax gibbonsii* en placas de medio sólido a 37°C durante varios días.

La Halocina H7 es una proteína con un peso molecular de  $30.500 \pm 500$  y se obtiene cultivando la cepa CECT 4547 con aireación a unos 37°C, separando las células y sometiendo el caldo de cultivo a técnicas de ultrafiltración y purificación de proteínas.

Aplicación en el campo microbiológico.

ES 2 094 695 B1

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

## DESCRIPCION

Nueva cepa de *Haloferax gibbonsii*, halocina H7 producida por ella y procedimiento de obtención de ambas.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se encuentra dentro del campo técnico de las halobacterias que son microorganismos procarióticos capaces de producir halocinas, las cuales a su vez son sustancias protéicas inhibitoras del crecimiento de otros microorganismos.

Más específicamente, la presente invención se refiere a una nueva cepa de *Haloferax gibbonsii* productora de halocina H7.

15 **Estado de la técnica anterior a la invención**

Las halobacterias son microorganismos procarióticos halófilos extremos. Su habitat natural lo constituyen medios con elevadas concentraciones de sales tales como las salinas solares o los lagos salados. Estos microorganismos, tan sencillos como las bacterias en su organización celular, están incluidos en el “dominio” de las *Archaea* (Woese, CR, Kankler, O, Weelis, ML, 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87; 4576), es decir han evolucionado paralela e independientemente del resto de los seres vivos. Esto supone importantes diferencias en composición química, genética y capacidades biosintéticas y metabólicas con respecto a los otros “dominios”: *Bacteria* y *Eucarya*.

Entre las múltiples características peculiares de las halobacterias, las más destacables o definitorias que los distinguen respecto de otros microorganismos halófilos se refieren a su espectro de crecimiento en elevadas concentraciones de sales, su pigmentación, la composición de lípidos de su membrana celular y la resistencia a ciertos antibióticos tales como la penicilina.

La taxonomía de este grupo de microorganismos ha sido recientemente modificada en base a un exhaustivo estudio de sus características morfológicas, composición y pruebas metabólicas (Torreblanca, M. Rodríguez-Valera, F. Juez, G. Ventosa, A. Kamekura, M. Kates, M. 1986. *Sistem. Appl. Microbiol.* 8: 89-99). Asimismo, existe una reciente revisión bastante completa sobre microorganismos halófilos, en la que se recopilan diversos aspectos de su estudio (Rodríguez-Valera, F. 1988. *Halophilic bacteria* vol. I-II. Ed. F. Rodríguez-Valera. CRC Press, Boca Raton, Florida). Sin embargo, existe una propiedad interesante de las halobacterias a la cual no se ha prestado la atención debida. Dicha propiedad es su capacidad de producción de sustancias protéicas del tipo de las bacteriocinas denominadas *halocinas*. Las bacteriocinas son sustancias capaces de inhibir el crecimiento de otros microorganismos a través de mecanismos de acción que afectan a objetivos específicos y vitales para la célula (Reeves, P, 1972 *Bacteriol. Rev.* 29: 24-45; Tagg, JR, Dajany, AS, Wannamaker, LW, 1976. *Bact. Rev.* 40: 722-756). A pesar de haberse descrito multitud de sustancias del tipo de las bacteriocinas, el número de ellas que se han estudiado en profundidad es muy reducido y solo de unas pocas se conoce con precisión el mecanismo de acción (Konisky, J, 1982. *Ann. Rev. Microbiol.* 36: 125-144), debido en gran parte a la dificultad que ello entraña. No obstante el potencial farmacológico que representan estas sustancias es probablemente incalculable. La producción de halocinas es una característica casi universal de las halobacterias (Meseguer, I. Ventosa, A. Rodríguez-Valera, F. 1986. *FEMS Microbiol. Lett.* 36: 177-182; Torreblanca, M. Meseguer, I. Ventosa, A. 1994. *Lett. Appl. Microbiol.* 19: 201-205) aunque en la actualidad solo se han estudiado dos halocinas H6 y H4 (Meseguer, I. Rodríguez-Valera, F. 1985. *FEMS. Microbiol. Lett.* 28: 177-182; Torreblanca, M. Meseguer, I. Rodríguez-Valera, F. 1989. *J. Gen. Microbiol.* 135: 2655-1661) existe una gran diversidad de ellas.

50 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención, tal y como se indica en su enunciado se refiere a una nueva cepa de *Haloferax gibbonsii*, a la halocina H7 producida por ella y a un procedimiento para la obtención de ambas.

La presente invención proporciona una nueva cepa variedad “alicante SPH7” de *Haloferax gibbonsii*, depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con la referencia CECT 4547 el 27 de febrero de 1.995.

Esta cepa ha sido aislada por el solicitante a partir de un cultivo de la cepa de *Haloferax gibbonsii* Ma 2.39, ya descrita con anterioridad.

## ES 2 094 695 B1

Las características morfológicas y metabólicas de estas dos cepas, así como las de la especie tipo ATCC 33959 de *Haloferax gibbonsii* aparecen en la siguiente Tabla I.

TABLA I

5		SPH7	Ma 2.39	ATCC 33959
	Morfología celular	b.c.p.	b.c.p.	b.m.p.
	Morfología colonial	r.l.m	r.l.m	r.l.m
	Formación de telo	-	-	-
10	Vacuolas de gas	-	-	-
	Crecimiento en ClNa saturado	+	+	+
	[sales] mínima para crecimiento	5%	5%	10%
15	Requerimiento mínimo de Mg <sup>+2</sup>	5 mM	5 mM	5 mM
	Actividad inhibitoria sobre <i>H. salinarium</i>	++	+	-
20	Variación de pigmentos respecto [sales]	-	-	-
	Temperatura óptima	35-40°C	35-40°C	40°C
	Tem. máxima de crecimiento	55°C	55°C	55°C
25	Rango de pH de crecimiento	5-8	5-8	6-8
	Crecimiento en medio líquido	+	+	+
30	Pruebas bioquímicas:			
	Almidón	-	-	-
	Tween 40	+	+	+
	Tween 80	+	+	+
35	Gelatina	-	-	+
	Caseína	-	-	+
	Indol	+	+	+
	Producción SH <sub>2</sub>	-	-	+
40	Producción SH <sub>2</sub> Cys	+	+	+
	Producción NO <sub>3</sub>	+	+	-
	Producción N <sub>2</sub>	+	+	-
	Utilización de azúcares:			
45	Sacarosa	+	+	+
	Glucosa	+	+	+
	Lactosa	-	-	+
	Xilosa	±	±	-
	Fructosa	+	+	+
50	Galactosa	+	+	+
	Utilización de Aminoácidos:			
	Arginina	-	-	-
	Glutámico	±	±	±
55	Lisina	-	-	±
	Metionina	-	-	-
	Glicina	±	±	±
	Utilización de Polialcoholes:			
60	Glicerol	+	+	±
	Manitol	-	-	±
	Sorbitol	-	-	-

# ES 2 094 695 B1

TABLA I (Cont.)

		SPH7	Ma 2.39	ATCC 33959
	Acidos orgánicos:			
5	Succínico	-	-	-
	Málico	-	-	-
	Pirúvico	-	-	-
	Acético	-	-	±
10	Citrato	±	±	±
	Crecimiento en medio mínimo con:			
	Glucosa	+	+	
	Glutamato Na	+	+	+
15	Casarninoácidos	+	+	-
	Acidificación del medio con:			
	Lactosa	6.5	6.5	5.5
	Sacarosa	5	5	4.5
	Glucosa	5.5	5.5	4.5
20	Maltosa	4.5	4.5	4.5
	Fructosa	4.5	4.5	4.5
	Manosa	6	6	5.5
	Galactosa	5.5	5.5	5.5
25	Manitol	6	6	6
	Arabinosa	5.5	5.5	4.5
	Xilosa	5.5	5.5	6.5
	Antibiograma:			
30	Novobiocina	R	R	R
	Bacitracina	±	±	R
	Eritromiicina	+	+	+
	Cloranfenicol	+	+	+
	Anisomicina	R	R	R
35	Esculina	-	-	+
	Josamicina	+	+	+
	Rifampicina	+	+	R
	Penicilina	R	R	R
40	Neomicina	+	+	+
	Pteridina	R	R	R
	Cl <sub>2</sub> Hg	R	R	R
	Resistencia a lisis			
	a bajas [sales]:			
45	25%	+	+	+
	10%	+	+	+
	5%	+	+	+
	4%	+	+	+
50	3%	-	-	+
	2%	-	-	+
	1%	-	-	-
	0%	-	-	-

55 Abreviaturas de la tabla:

b.c.p.: bacilos cortos pleomórficos

60 b.m.p.: bacilos medianos pleomórficos

r.l.m.: redondeada, superficie lisa y color rojo anaranjado

R: resistente

[sales]: concentración de sales totales en porcentaje respecto al volumen total.

5 Como se desprende de los datos que se muestran en la tabla, la única diferencia apreciable entre las cepas SPH7 y Ma 2.39, es la actividad inhibitoria sobre *H. salinarium*. Esto se pone de manifiesto al determinar la actividad inhibitoria de los sobrenadantes procedentes de cultivos de ambas cepas (tabla II). La actividad inhibitoria de una muestra se mide en Unidades Arbitrarias por ml de muestra (UA/ml), mediante un método de diluciones dobles ya descrito (Meseguer, I. Rodriguez-Valera, F. 1985. *FEMS Microbiol. Lett.* 28: 177-182)

TABLA II:

Actividad de los sobrenadantes procedentes de cultivos en idénticas condiciones de las cepas SPH7 y Ma 2.39

CEPA	Dilución							
	0	2	4	8	16	32	64	128
SPH7	+	+	+	+	+	+	±	-
Ma 2.39	+	+	+	±	-	-	-	-

La presente invención proporciona también un procedimiento para el aislamiento de la nueva cepa SPH7 a partir de la cepa salvaje Ma 2.39 de *Haloferax gibbonsii*.

Dicho procedimiento se caracteriza porque comprende una serie de subcultivos a partir de la citada cepa salvaje Ma 2.39, en placas de medio sólido, con doble capa de la cepa indicadora, incubándolos a unos 37°C durante varios días.

Las colonias que manifiestan un mayor efecto inhibitor sobre la indicadora, se aíslan y subcultivan para obtener cultivos puros. Luego se compara la actividad inhibitoria de éstos con la cepa origen, seleccionándose aquel cultivo que muestre un poder inhibitor superior al de la cepa origen y con él se repite el procedimiento tantas veces como sea necesario hasta obtener una cepa cuya actividad inhibitoria supere en varios órdenes de magnitud la actividad inhibitoria de la cepa origen.

En este proceso, el solicitante también pudo apreciar la presencia de colonias cuya capacidad inhibitoria era aparentemente inferior. De estos resultados se deduce, que la cepa Ma 2.39 está en realidad constituida por una población que si bien pueda ser más o menos homogénea en cuanto a las características morfológicas y metabólicas, es sin duda heterogénea en otros aspectos, coexistiendo variedades con mayor o menor actividad inhibitoria y por tanto de escaso valor como tal cepa con fines de obtención de halocina. En contraste, la variedad SPH7, se comporta como una población homogénea en este sentido, ya que las actividades inhibitorias que muestran sus colonias son similares.

La presente invención se refiere también a una nueva halocina, concretamente la halocina H7 aislada de los cultivos de la nueva cepa SPH7 anteriormente mencionada.

La halocina H7 es una proteína con un peso molecular de  $30.500 \pm 500$ , con la siguiente secuencia N-terminal:

N-Alanina-Aspártico-Glutámico-Asparagina-Glicina-Valina-Glicina-Aspártico-Glicina-Isoleucina-Glicina-Lisina-Aspártico-Fenilalanina-Aspártico-Fenilalanina-Triptófano-Leucina-Aspártico-Proli-  
na

no habiéndose encontrado ningún péptido homólogo de la misma.

La halocina H7 es una proteína termorresistente, capaz de soportar un amplio rango de temperaturas. mantiene su actividad a 90° durante 10 minutos y es necesario un tratamiento de 10 minutos a 121° centígrados para destruir totalmente su actividad por calor. Aunque la mayoría de las proteínas de organismos halofílicos son saldependientes, en este caso se trata de una proteína capaz de mantener toda su actividad en un rango de soluciones tan amplio que va desde el agua destilada hasta concentraciones tan elevadas de sales como del 30%. Asimismo mantiene su actividad en las más diversas soluciones acuosas, no habiéndose encontrado hasta el momento pérdida de actividad por estos motivos en ningún caso. También soporta un amplio rango de pH del disolvente, siendo activa al menos, entre valores de pH

de 5 a 9. Proteasas tales como la tripsina tampoco le afectan, sin embargo, si es sensible a otras enzimas tales como la pronasa. Es susceptible de liofilización y rehidratación sin pérdida alguna de actividad. Se trata además de una sustancia muy estable, capaz de conservar toda su actividad en soluciones acuosas estériles durante largos períodos de meses o años, incluso a temperatura ambiente. De igual modo soporta bien las bajas temperaturas, incluso la congelación aunque es sensible a sucesivas congelaciones y descongelaciones, que disminuyen parcialmente su actividad.

Finalmente, la presente invención proporciona también un procedimiento para la obtención de halocina H7 a partir de los cultivos de la cepa SPH7. Dicho procedimiento comprende cultivar en un medio adecuado la cepa SPH7 con aireación a unos 37°C, separar las células y someter el caldo resultante a técnicas de ultrafiltración y purificación de proteínas.

### Modos de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

#### Ejemplo 1

##### Obtención de la cepa CECT 4547

A partir de un cultivo reciente de la cepa Ma 2.39 en medio líquido, se efectúa un banco de diluciones hasta obtener una suspensión del orden de  $10^3$  cel/ml y se inocula 0,1 ml en placas de medio sólido con doble capa de la cepa indicadora *Halobacterium salinarium* NRC 817. Las placas se incuban durante 4-5 días a 37°C.

Después se aíslan y subcultivan, en condiciones similares, las colonias que manifiestan un mayor efecto inhibitor sobre la indicadora y con ellas se repite el procedimiento las veces que sea necesario hasta obtener una cepa que tenga una actividad al menos 10 veces superior a la de la cepa Ma 2.39.

#### Ejemplo 2

##### Obtención de halocina H7

Se emplea una solución de sales base para el medio que contiene un 20% de sales totales por volumen (26,6 M ClNa, 0,13 M Cl<sub>2</sub>Mg x 6H<sub>2</sub>O, 0,16 M SO<sub>4</sub>Mg x 7H<sub>2</sub>O, 6,64 mM Cl<sub>2</sub>Ca, 53,3 mM ClK, 1,6 mM CO<sub>3</sub>HNa, 4,48 mM BrNa). Se añade extracto de levadura al 0,5% y se ajusta el pH a 7,2. Se inocula con un cultivo fresco de la cepa SPH7 y se incuba con aireación 37°C hasta que el crecimiento alcance una densidad óptica de aproximadamente 1. Luego mediante filtración tangencial o centrifugación se separan las células para obtener el caldo o sobrenadante en el que se encuentra la halocina H7. Este caldo se somete a ultrafiltración tangencial utilizando para ello un sistema Pellicon (Millipore) con ultrafiltros (Millipore) de 10.000 daltons de tamaño de poro para eliminar moléculas de tamaño superior. A continuación el filtrado se somete nuevamente a ultrafiltración en el mismo sistema con ultrafiltros (Millipore) de 10.000 daltons para concentrar moléculas de tamaño superior. El concentrado resultante, que contiene la halocina H7, se dializa frente a agua destilada y se procesa para purificar la sustancia obtenida. La purificación se lleva a cabo mediante tres pasos consecutivos. Primero se somete a precipitación con tres volúmenes de acetona, con lo que precipitan un gran número de proteínas, pero la H7 se recupera en un 80-90% en el sobrenadante; la acetona se elimina con un rotavapor. En segundo lugar se realiza una cromatografía en columna con concanavalina A, esto permite retener los polisacáridos y glicoproteínas que contiene la muestra, mientras que el resto de las proteínas se eluyen de la columna. Finalmente la muestra eluida se concentra varias veces por ultrafiltración en sistema Minitan (Millipore) con ultrafiltros (Millipore) de 10.000 daltons y se somete a cromatografía en un sistema FPLC (Biosys 500, Beckman) utilizando una columna de intercambio iónico con un gradiente desde 0-0,5M de NaCl a pH 8. Las fracciones de mayor actividad se concentran y se pasan nuevamente por la misma columna utilizando un gradiente de 0,15-0,4M de NaCl a pH 7,5. El grado de pureza de la halocina H7 se determina mediante electroforesis en gel SDS-poliacrilamida en cada uno de los pasos.

REIVINDICACIONES

1. Nueva cepa, variedad "alicante SPH7" de *Haloferax gibbonsii*, depositada con la asignación CECT 4547.

5

2. Procedimiento de obtención de la nueva cepa de la reivindicación 1, **caracterizado** porque comprende una serie de subcultivos a partir de la cepa salvaje Ma 2.39 de *Haloferax gibbonsii*, en placas de medio sólido, con doble capa de la cepa indicadora, incubándolos a unos 37°C durante varios días.

10

3. Nueva halocina, denominada halocina H7, producida por la cepa de la reivindicación 1, **caracterizada** por ser una proteína termorresistente con un peso molecular de  $30.500 \pm 500$ , con la consiguiente secuencia N-terminal:

15

N-Alanina-Aspártico-Glutámico-Asparagina -Glicina-Valina-Glicina-Aspártico-Glicina-Isoleucina-Glicina-Lisina-Aspártico-Fenilalanina -Aspártico-Fenilalanina-Triptófano -Leucina-Aspártico-Prolina.

20

4. Procedimiento de obtención de la nueva halocina de la reivindicación 3, **caracterizado** porque comprende cultivar en un medio adecuado la cepa SPH7 de la reivindicación 1, con aireación a unos 37°C, separar las células y someter el caldo resultante a técnicas de ultrafiltración y purificación de proteínas.

25

30

35

40

45

50

55

60



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>: C12N 1/20, C07K 14/215, C12P 21/02

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MESEGUER, I. et al. "Mode of actions of halocins H4 and H6: are they effective against the adaptation to high salt environments?." NATO ASI SER A (NALSDJ). (Gen. Appl. Aspects, Halophilic Microorg.). Vol. 201, 1991, páginas 157-164 * Todo el documento *	1-4
A	MARINA TORREBLANCA et al. "Halocin H6 a bacteriocin from Haloferax gibbonsii." JOURNAL OF GENERAL MICROBIOLOGY, Vol. 135, 1989, páginas 2655-2661 * Todo el documento *	1-4

**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 n.º:

**Fecha de realización del informe**  
13.12.96

**Examinador**  
M. Novoa Sanjurjo

**Página**  
1/1