

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 702**

21 Número de solicitud: 201631665

51 Int. Cl.:

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

23.12.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

25.06.2018

Fecha de concesión:

28.09.2018

45 Fecha de publicación de la concesión:

05.10.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.0%)
Edificio Emprendia - Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**GONZÁLEZ VILLA, Tomás;
FEIJOO SIOTA, Lucía;
RODRÍGUEZ RAMA, José Luis y
DE MIGUEL BOUZAS, Trinidad**

74 Agente/Representante:

CAMIÑA TATO, Montserrat

54 Título: **Cepa recombinante, método de producción de proteasas aspárticas de Galium verum y uso en la industria láctea.**

57 Resumen:

Cepa recombinante, método de producción de proteasas aspárticas de Galium verum y uso en la industria láctea. Construcción de una cepa recombinante que sobreexpresa proteasas aspárticas vegetales de la especie Galium verum usadas como coagulantes vegetales, procedimiento para su obtención y uso de estos coagulantes en la industria de los productos lácteos.

ES 2 673 702 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP 11/1986.

DESCRIPCIÓN

CEPA RECOMBINANTE, MÉTODO DE PRODUCCIÓN DE PROTEASAS ASPÁRTICAS DE *GALIUM VERUM* Y USO EN LA INDUSTRIA LÁCTEA.

5

SECTOR TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biología y de la biotecnología. Se refiere al uso de la tecnología del ADN recombinante para la producción de proteínas de uso industrial. Más particularmente, la presente invención se refiere a células o microorganismos que contienen polinucleótidos derivados de la especie vegetal *Galium verum*, que codifican proteasas aspárticas, y la producción de las proteasas aspárticas para su uso industrial.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La coagulación de la leche mediante enzimas es un paso básico en la manufactura de la mayoría de los quesos. La leche contiene principalmente dos tipos de proteínas: las caseínas, que precipitan durante el proceso de coagulación, y las proteínas del suero, que permanecen solubles; de la fracción proteica sólo las caseínas van a constituir el queso. Las caseínas constituyen aproximadamente el 80 % de las proteínas de la leche y existen de forma mayoritaria cuatro tipos: α 1-, α 2-, β - y κ - caseínas. Estas proteínas se encuentran formando parte de unas estructuras esféricas denominadas micelas, en cuya superficie se sitúan las κ -caseínas, que son las que confieren estabilidad a la estructura.

Todas las enzimas (cuajos y coagulantes) utilizadas industrialmente para la elaboración de quesos pertenecen al grupo de las proteasas aspárticas (PAs) (EC 3.4.23) e hidrolizan la k-caseína en el enlace Phe105-Met106.

El proceso de coagulación de la leche consta de dos fases, en la primera fase, las PAs hidrolizan la unión Phe105-Met106 de la k-caseína dividiendo la molécula proteica en dos: para-k-caseína hidrofóbica y una parte hidrofílica conocida como caseinmacropéptido; en la segunda fase se produce la coagulación de las micelas de las caseínas que fueron desestabilizadas por el ataque proteolítico.

El tipo de coagulante utilizado en la elaboración del queso tiene una gran influencia en las características organolépticas del producto final.

Los cuajos y coagulantes utilizados actualmente se pueden clasificar en cuatro tipos: cuajo animal (quimosina), microbiano PAs de *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* ó *Endothia parasitica*), quimosina producida por fermentación (FPC: fermentation produced chymosin) en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *kluveromyces lactis*) y hongos (*Aspergillus niger*) y coagulantes vegetales (Kumar et al. 2010). Estas PAs son producidas como precursores inactivos, las cuales son convertidas en enzimas activas por división autocatalítica de la parte N-terminal denominada propéptido.

Dentro de la categoría de coagulantes vegetales se encuentran extractos acuosos de flores de distintas especies del género *Cynara*, en cuyos pistilos se expresan un gran número de PAs. Las investigaciones básicas realizadas sobre estas PAs y las pertenecientes a otras especies vegetales, han revelado que la estructura primaria de la mayoría de las PAs de plantas que han sido caracterizadas es similar a la de mamíferos y microorganismos e incluye: un péptido señal en el extremo amino terminal, un propéptido implicado en la inactivación o en el correcto plegamiento, estabilidad y señalamiento celular y un fragmento conocido como plant-specific insert (PSI) localizado entre el extremo amino y carboxi terminal, que comprende aproximadamente 100 aminoácidos y mantiene su estructura gracias a tres puentes disulfuro. El PSI únicamente se ha identificado en plantas y es similar al precursor de saposinas de mamífero, su función biológica no ha sido totalmente establecida.

Las PAs de plantas son sintetizadas como precursores inactivos y se convierten en enzimas activas mediante un procesamiento que implica varios pasos proteolíticos. El procesamiento incluye la eliminación del péptido señal y del propéptido, dando lugar a una enzima heterodimérica o monomérica. Las PAs heterodiméricas están constituidas por una cadena pesada (HC) y una cadena ligera (LC) que permanecen unidas mediante interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno o puentes disulfuro, el procesamiento de estas PAs a su forma activa generalmente incluye la eliminación total o parcial del PSI. La eliminación del propéptido para que la enzima sea activa puede ser desencadenado por moléculas accesorias o requerir una bajada de pH (Simoès and Faro, 2004).

Antiguamente se utilizaban para la manufactura de quesos extractos de plantas que contenían diversas PAs, algunos siguen utilizándose hoy en día a nivel local como por ejemplo las bayas de la planta *Solanum dobium* o varias especies papilionoideae que han sido utilizadas para elaborar un queso tradicional en Sudán “Jibna beida” y otros productos lácteos en Angola (Kheir et al. 2011); el zumo extraído de *Calotropis procera* (manzana de sodoma) que es utilizado en regiones de Nigeria y Benin; en el sur de

China la raíz de jengibre se utiliza para producir una especie de “tofu” muy apreciado. Otras plantas que se han investigado como fuente de proteasas son: semillas de Balanites, Solanum, albizia, espárragos y frutas como kiwi y melón (Mazorra-Manzano et al.2013).

5 Muchos de los extractos vegetales que se han estudiado hasta ahora no son útiles en la elaboración de quesos ya que presentan una elevada actividad proteolítica en relación a su actividad coagulante, lo cual resulta en una hidrólisis del coágulo demasiado rápida, causando una reducción en la producción y/o quesos defectuosos debido a la amargura generada por los péptidos hidrofóbicos liberados en la
10 maduración. Otros inconvenientes que presenta el uso de los coagulantes vegetales son: el coste que supone la recolección y procesamiento del material vegetal y la estandarización de la fuerza coagulante entre lotes. Sin embargo otros como los extractos acuosos de las flores de *Cynara cardunculus*, *C. humilis* y *C. scolymus*, en cuyos pistilos se expresan un gran número de PAs (Sarmiento et al. 2009) han
15 mostrado ser buenos coagulantes de la leche y se utilizan hoy en día a nivel artesanal en varias zonas de España y Portugal para la manufactura de quesos de cabra y oveja tales como Casar de Cáceres, Torta del Casar, La Serena, Los Ibores, Serra da
estrela o Flor de Guía (Harboe et al., 2010).

El uso de estos coagulantes alternativos favorece la obtención de quesos diferentes a
20 los que habitualmente encontramos en el mercado, esto es debido a que la mayoría de PAs de plantas rompen las α -, β - y κ - caseínas, mientras que la quimosina animal utilizada normalmente para la producción de quesos únicamente rompe la kappa caseína. PAs de la especie *Cynara cardunculus* han sido expresadas en diferentes microorganismos y se han estudiado sus propiedades como coagulantes vegetales de
25 la leche: cyprosin B (Sampaio et al., 2008)) y cardosin B (Almeida et al. 2015). La producción de las PAs vegetales utilizando microorganismos permite su obtención en grandes cantidades, sin dependencia de la época de floración ni necesidad del almacenamiento del material vegetal y la posibilidad de estandarizar el coagulante obtenido, eliminando así los inconvenientes que presenta el uso de los extractos
30 obtenidos a partir de la planta.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN.

La especie vegetal *Galium verum*, cuyo nombre científico hace referencia a su capacidad coagulante (en griego gala, galaktos significa leche), también conocida
35 como “cuajaleches” contiene en su genoma al menos dos genes que codifican para

5 PAs las cuales han sido denominadas preprogaline A (GenBank: AFX73038.1) y preprogaline B (GenBank: AFX73039.1) (Feijoo-Siota et al. 2012). Estas proteasas aspárticas podrían ser utilizadas en la elaboración de productos lácteos, sobre todo quesos y en la maduración acelerada de los mismos debido al patrón de hidrólisis de las caseínas de la leche que presentan. Al igual que las proteasas de la especie *Cynara cardunculus* también se podrían utilizar en la elaboración de productos lácteos con péptidos bioactivos (Silva et al. 2006),

10 La presente invención se refiere a una cepa recombinante para la producción de PAs recombinantes de la especie *Galium verum* que han sido depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), con el número CECT 13141, método de producción y uso en la industria láctea. Esta cepa recombinante secreta la enzima al medio de cultivo donde se activa, debido a esto y a que la levadura utilizada como hospedador secreta pocas proteínas endógenas al medio de cultivo, el proceso para su obtención y purificación es sencillo. La proteasa aspártica recombinante aquí
15 descrita tiene actividad coagulante de la leche y su patrón de corte sobre las caseínas difiere de los coagulantes animales, microbianos o vegetales actualmente utilizados para la elaboración de productos lácteos. Según esto la proteasa aspártica podría producir quesos con características novedosas.

20 Por tanto, en un primer aspecto, la invención se relaciona con un vector que comprende un polinucleótido con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o en la SEQ ID NO:2, o una variante de las mismas que tiene un grado de identidad de al menos un 80% con respecto a dicha SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:2, o secuencias incluidas en las SEQ ID NO: 1 o en la SEQ ID NO:2 que codifican
25 fragmentos peptídicos de PAs de *Galium verum* que mantienen las propiedades de rotura de las α -, β - y κ - caseínas y que codifica un péptido con actividad proteasa aspártica de la especie vegetal *Galium verum*.

30 En esta memoria descriptiva se entiende por porcentaje de identidad de la secuencia nucleotídica el porcentaje de coincidencias de los mismos nucleótidos entre dos secuencias alineadas, a lo largo de toda la longitud de ambas secuencias.

35 En otro aspecto, la invención se relaciona con una célula o microorganismo que comprende dicho vector, o el péptido codificado por dicho vector, donde la célula o microorganismo hospedador es transfectado o transformado con el vector y cultivado en condiciones que promueven la expresión y recuperación del péptido.

En esta memoria descriptiva se entiende como condiciones que promueven la expresión y recuperación del péptido como aquellas condiciones de medio de cultivo, temperatura, pH y tiempo de incubación necesarias para que se pueda obtener la correcta expresión del polinucleótido obteniéndose la proteína en su forma activa o inactiva.

Por otro lado, la invención también se relaciona con una célula o microorganismo que ha integrado en su genoma el polinucleótido con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o en la SEQ ID NO:2, o una variante de las mismas que tiene un grado de identidad de al menos un 80% con respecto a dicha SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:2, o secuencias que codifican fragmentos peptídicos de proteasas aspárticas de *Galium verum* que mantienen las propiedades de rotura de las α -, β - y κ - caseínas y que codifica un péptido con actividad proteasa aspártica.

Por otro lado, la invención también se refiere a un método para producir PAs que consiste en el cultivo de la célula o microorganismo que contiene un vector o ha integrado en su genoma el polinucleótido con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o en la SEQ ID NO:2, o una variante de las mismas que tiene un grado de identidad de al menos un 80% con respecto a dicha SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO:2, o secuencias que codifican fragmentos peptídicos de PAs de *Galium verum* que mantienen las propiedades de rotura de las α -, β - y κ - caseínas y que codifica un péptido con actividad proteasa aspártica cuando se incuba en un medio de cultivo a un pH, temperatura y agitación que promueven la expresión y recuperación del péptido.

Por otro lado, la invención se refiere a un método para producir PAs en su forma inactiva mediante su obtención a partir del cultivo de la célula o microorganismo que contiene un vector o ha integrado en su genoma las secuencias de nucleótidos anteriormente mencionadas mediante su cultivo en un medio tamponado a pH básico. Estas PAs pueden ser activadas antes de su uso mediante su incubación a pH ácido.

Por otro lado, la invención también se refiere al uso del coagulante obtenido directamente a partir de una célula o microorganismo hospedadores transformados o transfectados con el vector o que hayan integrado el polinucleótido en su genoma, para la coagulación de la leche, de mezclas de leche de distinto origen animal o bebidas compuestas en parte por leche.

Por otro lado, la invención también se refiere al uso del coagulante obtenido directamente a partir de una célula o microorganismo hospedadores transformados o transfectados con el vector o que hayan integrado el polinucleótido en su genoma mezclado con otros coagulantes, para la coagulación de la leche, de mezclas de leche
5 de distinto origen animal o bebidas compuestas en parte por leche.

En esta memoria descriptiva se entiende como leche el producto obtenido a partir de las hembras de los mamíferos, en particular de mamíferos domésticos como vaca, cabra, oveja, camella, búfala, dromedaria, yegua, etc. La coagulación se puede llevar
10 a cabo en los tipos de leche aquí descritos o en cualquiera de sus mezclas.

Otra realización preferida de la presente invención comprende el uso del coagulante recombinante activo de *Galium verum* para la elaboración de productos lácteos, donde los productos lácteos pueden ser obtenidos a partir de cualquier tipo de leche, de sus
15 mezclas o de bebidas compuestas en parte por leche, más preferiblemente para la elaboración de queso.

En esta memoria descriptiva se entiende como coagulante recombinante activo a una proteasa aspártica de origen vegetal producida en un organismo hospedador transformado con el ADN que codifica para dicha proteasa y que tiene la capacidad de
20 producir la coagulación enzimática de la leche sin necesidad de un proceso de activación previo.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 **Figura 1. RACE PCR a partir del ADN complementario de *G.verum*.** Los productos fueron separados en un gel de agarosa al 1%. Línea 1: 5'RACE realizada con los oligonucleótidos (AP1/pMgv2r) y línea 2: 3'RACE (pMgv2f/AP1). La línea 3 corresponde al marcador de pesos moleculares.

30 **Figura 2. Representación esquemática de la proteína preprogaline B codificada por el gen *gv2AP*.** Péptido señal (SP); propéptido (Pro); dominio N-terminal con dos sitios catalíticos (DTG y DSG); plant specific insert (PSI) conteniendo dos dominios saposinas tipo B (Sap_B2 and Sap_B1) y dominio C-terminal; el símbolo de la horquilla indica un sitio de N-glicosilación; las líneas conectadas indican puentes disulfuro predichos (S-S). El triángulo indica la región de la proteína frente a la cual se
35 generó el anticuerpo PV13 utilizado en los Western Blot.

Figura 3. Vector de expresión pGAPZ α – gv2AP utilizado para la obtención de la cepa de *Pichia pastoris* productora de la progaline B (CECT13141). La construcción se realizó utilizando los sitios de restricción EcoRI y XbaI de manera que el péptido señal del gen gv2AP fuese sustituido por el factor α que porta el vector y bajo el control del promotor constitutivo pGAP y el terminador de la transcripción del gen AOX1 (AOX1TT). La construcción fue linealizada mediante la enzima de restricción BspHI e integrada en el genoma de *Pichia* mediante recombinación homóloga.

Figura 4. Análisis de la expresión de la progaline B recombinante en el sobrenadante de *P. pastoris* concentrado mediante precipitación con TCA. A/ SDS PAGE. Líneas 2-4: Sobrenadantes de la cepa recombinante productora de progaline B transcurridos 1 día, 2 días y 3 días de cultivo. Líneas 5-7: Sobrenadante de la cepa sin transformar (control negativo) transcurridos 1 día, 2 días y 3 días de cultivo. **B/ Western Blot.** El sobrenadante de un cultivo de 3 días se analizó utilizando tampón de carga con (línea 2) y sin (línea 3) β -mercaptoetanol mediante un anticuerpo (fig.2 PV13) generado contra un péptido de la cadena pesada de la progaline B. Las bandas de la progaline B se indican con flechas (HC:cadena pesada ; LC:cadena ligera; glic:glicosilada)

Figura 5. Análisis mediante Western Blot realizado al sobrenadante del medio de cultivo de la cepa recombinante. Progaline B antes (línea 2) y después (línea 1) de ser tratada con endoglicosidasa H. Las muestras fueron preparadas sin agente reductor (β -ME) en el tampón de carga. M: marcador biotinilado (Sigma B2787).

Figura 6. Curva de crecimiento (---) y actividad enzimática (---) del sobrenadante de la cepa de *P. pastoris* productora de progaline B (CECT13141). La cepa fue incubada en medio YPD a una temperatura de 28 °C y agitación de 230 rpm durante 195 h; en la gráfica también se indica la variación del pH del medio (...x...). Los datos presentados en la gráfica representan la media de tres medidas realizadas sobre tres matraces diferentes. El tiempo de incubación con FTC-k-caseína para determinar la actividad enzimática fue de 2 horas.

Figura 7. Análisis SDS-PAGE de la actividad proteolítica de la progaline B y coagulantes comerciales sobre κ -(A), α -(B) y β -(C) caseínas durante 2 horas a 35°C. Línea 1 marcador de pesos moleculares. En todas las figuras la línea 2 se corresponde con la hidrólisis de la caseína mediante la progaline B incubada con pepstatina, líneas 3-9 degradación de las caseínas con los siguientes coagulantes: (3)

progaline B, (4) quimosina de ternero, (5) quimosina bovina producida por fermentación, (6) cuajo de ternera, (7) cuajo bovino adulto, (8) coagulante microbiano, (9) quimosina de camello producida por fermentación. La línea 10 corresponde a la κ -, α - y β - caseínas incubadas 2 horas a 35°C sin ningún coagulante.

- 5 **Figura 8. Efecto de la temperatura y del pH sobre la actividad de la progaline B.**
Izquierda: la temperatura óptima de la progaline B semipurificada fue determinada utilizando como sustrato FTC-k-caseína en tampón 100 mM acetato sódico a pH 5.5 a temperaturas de incubación en el rango de 4 a 80 °C durante 1 hora. Derecha: el pH óptimo fue determinado utilizando azocaseína al 1% como sustrato disuelta en una
10 concentración 100 mM de tampones a pHs comprendidos en el rango (4.4-7) durante 2 horas a 37°C. La actividad relativa es expresada como un porcentaje de la mayor actividad en la temperatura (izq) o pH (drch) examinados.

Figura 9. Efecto de el pH del medio de cultivo en el procesamiento de la progaline B secretada por *Pichia pastoris* después de tres días de cultivo a 28°C.

- 15 **A/** Western blot de los sobrenadantes de la cepa recombinante cultivada en YPD, YPD tamponado a pH 7 (YPD7) e YPD tamponado a pH4 (YPD4). **B/** El pH de los sobrenadantes mostrados en A fue ajustado a pH 3.5 con HCl e incubados 4,30 horas a 37°C. Las muestras fueron preparadas en presencia (+) o ausencia (-) de agente reductor en el tampón de carga del SDS PAGE. **C/** Actividades de los sobrenadantes
20 de la cepa recombinante y la cepa sin transformar (control negativo) en YPD, YPD4 y YPD7 antes (C.1) y después (C.2) de la bajada de pH. El tiempo de incubación con FTC-k-caseína fue de 1,30 horas. Los valores mostrados son la actividad media con la desviación estándar obtenida a partir de tres medidas.

Figura 10. Efecto del pH sobre la activación de la progaline B recombinante. A/

- 25 La cepa de *P. pastoris* recombinante fue cultivada en YPD tamponado a pH7 (YPD7) durante 72 horas. El cultivo fue centrifugado, se añadió a alícuotas del sobrenadante (A/ línea 1) un volumen de tampón 0,2 M a diferentes pHs 3,5, 4,3, 4,6, 5,0, 5,8, 6,6 and 7 (líneas 2-8 respectivamente) y se incubaron a 28°C. Las muestras tomadas transcurridos 30, 150 y 270 minutos fueron analizadas mediante Western blot en
30 condiciones reductoras (A.1, A.2 and A.3 respectivamente). **B/** Actividad sobre k-caseína de los sobrenadantes incubados 270 minutos a diferentes pHs. El pH de todas las muestras fue ajustado a 5,5 mediante la adición de NaOH o HCl antes de añadir la FTC-k-caseína y el tiempo de incubación fue de 2,30 horas.

MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se ilustra adecuadamente mediante los siguientes ejemplos, los
5 cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

Ejemplo 1. Obtención de la secuencia génica que codifica para las proteasas aspárticas preprogaline A y preprogaline B de *Galium verum*

Para obtener la secuencia génica de las PAs a la que se refiere esta invención se
10 diseñaron dos oligonucleótidos, pAPF (sentido) y pAPR (antisentido), (tabla 1), en base a dos regiones conservadas de secuencias génicas depositadas en la base de datos Genbank, que codifican para proteasas aspárticas vegetales (Laloi et al. 2012). Éstos oligonucleótidos se utilizaron para realizar una RT-PCR, utilizando ARN total extraído de la planta en flor *Galium verum* (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen). La enzima
15 BioScript MMLV (Bioline) fue utilizada para sintetizar la primera hebra de ADN complementario siguiendo las recomendaciones del fabricante. La mezcla de la reacción de la RT-PCR (50µl) consistió en 4 µl de ADN complementario, 3,75 unidades de ADN polimerasa Accuzyme (Bioline), 1mM dNTPs, 10 pmol de cada primer (pAPF y pAPR) y el programa de amplificación constó de 30 ciclos a una temperatura de
20 hibridación de 46°C. Los productos de la amplificación fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa, obteniéndose una banda del tamaño esperado (aproximadamente 1 kb) que fue purificada (Gel band Purification kit; GE Healthcare) desde el gel y el ADN obtenido fue clonado en el vector pCR Blunt II TOPO utilizando el kit Zero Blunt TOPO PCR Cloning (Invitrogen). Se realizó la extracción de ADN
25 plasmídico desde varias colonias obtenidas en la transformación y se realizó la secuenciación empleando los oligonucleótidos universales SP6 y T7.

Así se obtuvieron dos secuencias parciales de proteasas aspárticas de *G. verum* a partir de las cuales se diseñaron los oligonucleótidos específicos pMgv1f/pMgv1r para
30 obtener la secuencia nucleotídica completa del gen que denominaremos gv1AP que codifica para la proteasa aspártica preprogaline A (código de acceso: AFX73038.1) y los oligonucleótidos pMgv2f/pMgv2r para obtener la secuencia del gen gv2AP que codifica para la proteasa aspártica preprogaline B (código de acceso: AFX73039.1). La secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos empleados figura en la tabla 1. Las reacciones RACE PCR se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones del kit
35 Marathon® cDNA Amplification (Clontech). La secuencia que codifica para el extremo

N-terminal (5'RACE PCR) se obtuvo utilizando la pareja de oligonucleótidos AP1/pMgv1r en el caso del gen gv1AP y AP1/ pMgv2r en el caso del gen gv2AP; el extremo C- terminal (3'RACE PCR) mediante la pareja de oligonucleótidos pMgv1f/ AP1 para el gen gv1AP y pMgv2f/ AP1 para el gen gv2AP. Las PCRs fueron desarrolladas sobre ADN de doble cadena en volúmenes de 50µL con la ADN polimerasa Accuzyme (Bioline) y el programa de amplificación (94°C, 30s)1x (94°C 5s, 72°C 3 min) 30x (72°C, 7min) 1x.

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos.

| <u>Descripción</u> | <u>Nombre del oligo</u> | <u>Secuencia (5-3')</u> |
|---------------------------|-------------------------|--|
| Degenerate sense primer | <u>pAPF</u> | GAYACNGGNAGYTCYAAYYTVTGG* |
| Degenerate reverse primer | <u>pAPR</u> | CCATMAANACRTCNCMMARRATCC* |
| Marathon AP1 Primer | AP1 | CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC |
| gv1AP (3'RACE) | pMgv1f | CAGGGGTTTTACCTGACAAGGTCTGCGC |
| gv1AP (5'RACE) | pMgv1r | GCCATCTGGCAAGCAGAACACATCGGTG |
| gv2AP (3'RACE) | pMgv2f | GTTCTGCTATTGCCGACTCTGGA ACTTC |
| gv2AP (5'RACE) | pMgv2r | TTGGCTCACAACACCAGTAGCTCCA |
| pGAPZαA sense | pGV2-EcoRI | <u>CCGAATTCT</u> CCGCAGCTTTGTTATCAGCATC TG |
| pGAPZαA reverse | pGV2-Xbal | GCTCTAGATCAAGCTGCTTCTGCGAATCCAA CCC |

10 *Y= C, T; R= A, G; V= A, G, C; M= A, C; N= A, C, G, T

Los fragmentos amplificados fueron clonados utilizando el kit Zero Blunt TOPO PCR Cloning (Invitrogen) y secuenciados. Las secuencias de ambos extremos se ensamblaron mediante el programa informático VectorNTI obteniéndose así la secuencia completa de dos genes gv1AP (Genbank: JQ434478.1) y gv2AP (Genbank: JQ434479.1) que codifican para las proteasas aspárticas preprogaline A y preprogaline B respectivamente. En la figura 2 se muestra una representación esquemática de la preprogaline B.

15

Ejemplo 2. Construcción del vector de expresión pGAPZ α -gv2AP.

Para la expresión de la preprogaline B sin el péptido señal (que denominaremos progaline B) en la levadura *Pichia pastoris* X-33(GRAS), se utilizó el vector integrativo pGAPZ α A (Invitrogen). Este vector contiene el promotor constitutivo pGAP, una
 5 secuencia que codifica para el péptido señal del factor α de *Saccharomyces cerevisiae* que permite la secreción extracelular del enzima, el terminador del gen AOX1 y el gen de resistencia a zeocina.

Para la construcción de pGAPZ α -gv2AP (fig.3) se diseñaron una pareja de oligonucleótidos pGV2-EcoRI/pGV2-XbaI (tabla 1) para amplificar el gen gv2AP sin el
 10 péptido señal del mismo e introducir las dianas de restricción adecuadas para su introducción en el vector pGAPZ α A con el fin de clonar el gen en pauta de lectura con el péptido señal (factor α) de *S. cerevisiae* que porta el vector. La reacción de PCR para amplificar el fragmento del gen fue llevada a cabo con 1,25 U PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (Takara) utilizando el tampón suministrado con la misma
 15 suplementado con 200 μ M de cada dNTP; 0,3 μ M oligonucleótidos (pGV2-EcoRI/pGV2-XbaI) y ADN complementario obtenido mediante el kit Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis (Roche) en un volumen final de 50 μ l siguiendo un programa de: 98°C 10s, 58°C 5s, 72°C 1,40 min durante 30 ciclos. El producto de PCR fue purificado desde un gel de agarosa 1% y se digirió con las enzimas de restricción
 20 EcoRI y XbaI. El vector pGAPZ α A se digirió con las mismas enzimas y los fragmentos se ligaron con enzima ligasa (Takara) toda la noche a 16°C. Se transformaron células de *E. coli* TOP10 competentes con la construcción obtenida y se seleccionaron utilizando el marcador de resistencia a la Zeocina que porta el vector. El vector pGAPZ α -gv2AP fue purificado desde *E. coli* mediante el kit Plamid Midiprep (Qiagen) y
 25 utilizado para la transformación de *P. pastoris*.

Ejemplo 3. Transformación de *Pichia pastoris* X-33 con pGAPZ α -gv2AP.

La transformación de la cepa *P. pastoris* X-33 se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del manual pGAPZ α A, B, and C (Invitrogen). Así, el vector pGAPZ α -
 30 gv2AP se linearizó con la enzima de restricción BspHI, tras lo cual se inactivó el enzima 20 min a 65°C y limpió el ADN mediante fenol cloroformo. Se obtuvieron 9 μ g de la construcción pGAPZ α -gv2AP lineales que se introdujeron en células de *Pichia pastoris* mediante electroporación: se utilizó un electroporador Gene Pulser® II (BioRad), la cubeta de electroporación fue de 0.2 cm (BioRad) y el pulso de 25 μ F, 200 Ω y 1.8 kv. Los fragmentos lineales se integraron en el genoma de *Pichia pastoris*
 35 mediante eventos de recombinación homóloga, esta integración puede producirse en

varias copias, como consecuencia se pueden obtener cepas que sintetizan el enzima de manera estable y en gran cantidad. Las colonias fueron seleccionadas en placas de YPDS (extracto de levadura 1%, peptona 2%, dextrosa, 1M sorbitol, 2% agar) suplementado con 100µg/ml de zeocina. La integración del cassette de expresión en el
5 genoma de *Pichia* fue confirmado mediante PCR utilizando como molde el ADN genómico extraído con el kit Epicenter MasterPure y con los oligonucleótidos pGAP (GTCCCTATTTCAATCAATTGAA) y 3'AOX1 (GCAAATGGCATTCTGACATCC).

Ejemplo 4. Análisis de la producción de progaline B mediante *P. pastoris* recombinante.

10 Se realizó un ensayo para determinar la capacidad para hidrolizar la kappa caseína de los clones que habían integrado en su genoma el cassette utilizando k-caseína etiquetada con isotiocianato de fluoresceína (FTC-κ-caseína) siguiendo el método de Ageitos et al. 2006. Los clones seleccionados se cultivaron en medio YPD a una temperatura de 28°C y agitación 230 rpm; la cepa sin transformar se cultivó en las
15 mismas condiciones para ser usada como control negativo. Los cultivos fueron centrifugados y los sobrenadantes almacenados a -70°C hasta que se midió su actividad kappa caseinolítica. La mezcla de reacción se realizó en un tubo eppendorf y contenía 10 µL de los sobrenadantes obtenidos a diferentes tiempos de cultivo, 4.2 µL de FTC-k-caseína y 50 µL de tampón 0.1M acetato sódico, pH 5.5. La incubación se
20 realizó a 37°C durante 2 horas en oscuridad. La reacción se detuvo añadiendo 120 µL de TCA 5% frío. Una vez detenida la reacción se mantuvo durante un mínimo de una hora a temperatura ambiente protegida de la luz. Los viales se centrifugaron a 4°C y 18000g durante 10 min y 50 µL del sobrenadante se mezclaron con 350 µL de 0.5 M Tris-HCl 500mM, pH 8.5 en una placa. La fluorescencia en un fluorímetro Perkin
25 Helmer Luminiscence Spectrometer LS50B con una λ de excitación de 490 nm y de emisión de 525 nm. La cepa que presentó una mayor actividad proteolítica de la k-caseína fue seleccionada y se cultivó en YPD a 28°C, 230 rpm. El sobrenadante de esta cepa fue analizado después de 72 horas de cultivo mediante SDS PAGE al 12% y Western Blot (fig.4). Como anticuerpo primario para realizar el Western Blot se utilizó
30 un anticuerpo policlonal producido en conejo frente a un péptido sintético de 13 aminoácidos (PSHFKGEHVYAKV) cuya secuencia se corresponde a los aminoácidos 243-255 de la preprogaline B (GenBank: AFX73039.1).

En el análisis mediante SDS PAGE del sobrenadante del cultivo de la cepa recombinante se observa que a partir del segundo día de cultivo aparece una banda
35 de 30,7 kDa que no aparece en el sobrenadante de la cepa sin transformar (fig.4A). En el Western Blot se observaban dos bandas de 51.2 kDa y 46 kDa cuando al

tampón de carga no se le añadía β -ME (fi. 4B línea 3), mientras que una única banda de 30.7 kDa aparecía cuando el tampón de carga contenía el agente reductor (fig. 4B línea 2). Esto confirma la estructura predicha por diferentes programas bioinformáticos y por homología con otras proteasas aspárticas de origen vegetal. La progaline B es secretada por la levadura *P. pastoris* al medio de cultivo y sufre un procesamiento proteolítico de manera que el propéptido y parte del PSI son eliminados dando lugar a una proteína formada por dos cadenas unidas mediante puentes disulfuro (bandas de 51.2 y 46 kDa) en la cual la cadena pesada (HC) quedaría unida a la cadena ligera (LC) mediante puentes disulfuro; la progaline B se secretaría en forma glicosilada (banda de 51,2 kDa) y no glicosilada (banda de 46 kDa) (comprobado mediante ensayo de deglicosilación cuyos resultados se muestran a continuación). Cuando añadimos β -ME al tampón de carga únicamente detectamos la cadena pesada (30,7 kDa), ya que se rompen los puentes disulfuro que unen ambas unidades y el anticuerpo utilizado (PV13) reconoce un péptido que se sitúa en la cadena pesada (figura 2).

La cepa productora de progaline B se ha depositado según el Tratado de Budapest en la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) con el número de registro CECT13141.

20 **Ejemplo 5. Deglicosilación con EndoH de la progaline B expresada en *Pichia pastoris*.**

La progaline B fue incubada con endoglicosidasa H para comprobar si las dos bandas observadas cuando se realizaba el Western Blot a muestras a las que no se le añadía β -ME eran debidas a la presencia de un sitio de N-glicosilación predicho al final de la región PSI (fig.5). La deglicosilación se realizó incubando 10 μ l del sobrenadante de la cepa recombinante crecida durante 3 días en medio YPD a 28°C y 230 rpm y concentrado 20 veces con 2 μ l de endoglicosidasa H (1U/mL) de *Streptomyces griseus* (Sigma) en 50mM tampón fostato pH5 en un volumen final de 50 μ l; como control negativo se utilizaron 2ml de agua milliQ en lugar de endoH. Después de incubar 4 horas a 37°C la reacción se detuvo añadiendo 10 μ l de tampón de carga de SDS-PAGE sin β -ME a 10 μ l de las muestras, la mezcla fue calentada a 95°C 7 minutos y se analizaron mediante Western Blot.

Mediante este ensayo se confirmó que la progaline B es secretada por *P. pastoris* en dos formas, una glicosilada y otra no glicosilada (fig.5. línea 2, bandas 51.2 y 46 kDa),

cuando la progaine B es tratada con endoH vemos como únicamente aparece una banda (la forma deglicosilada, fig.5, línea 1).

Ejemplo 6. Producción de progaine B a pequeña escala.

Se realizó un ensayo para determinar el tiempo de incubación para obtener la máxima cantidad de progaine B activa en el sobrenadante del medio de cultivo YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% dextrosa). Se utilizaron 100ml de medio en matraces de 500 ml con un inóculo inicial para que la DO600 fuese de 0,02 y las condiciones de cultivo fueron 28°C y 230 rpm. Se analizó el crecimiento mediante la medición de la absorbancia a 600 nm utilizando un espectrofotómetro modelo Beckman DU-640 (DO600); la actividad enzimática utilizando FTC- κ -caseína mediante el método de Ageitos et al., 2006 y la variación de pH en el medio de cultivo (fig. 6).

La actividad fue máxima transcurridas 70-92 horas de cultivo, en la fase estacionaria de crecimiento, luego la actividad decreció progresivamente. La actividad de los sobrenadantes de un cultivo procedente de la cepa sin transformar de *P. pastoris* (control negativo) fue próxima a cero en todas las muestras analizadas. El pH del medio de cultivo YPD cambiaba con el crecimiento de la levadura, inicialmente era de 6,4 y decrecía hasta un valor de 4,6 transcurridas 27 horas de incubación, luego se fue incrementando gradualmente hasta 7,58 después de 195 h de incubación.

Ejemplo 7. Hidrólisis de caseínas de leche bovina.

El patrón de degradación de las caseínas es un factor importante a la hora de evaluar un nuevo coagulante debido a que este patrón puede afectar al rendimiento, textura y a la evolución de la proteólisis durante la maduración del queso.

Para analizar el patrón de corte de las caseínas se utilizaron α -caseína, β -caseína y κ -caseína bovinas comerciales (Sigma-Aldrich) disueltas en 100 mM fosfato sódico pH 6 a una concentración final de 1 mg/ml y se incubaron independientemente con 20 μ l de cada uno de los siguientes coagulantes: progaine B semipurificada mediante DEAE-BioGel A, coagulante microbiano producido por *Rhizomucor miehei* Mucorzyme "L" (Biostar S.A.), quimosina de ternero (Sigma R4877) Chymax P (quimosina bovina) y Chymax M (quimosina de camello) producidas en *Aspergillus niger* var. *awamori*, (CHR Hansen), preparación de cuajo de ternera y cuajo bovino adulto (Calf and Bovine REMCAT Standards for rennet testing, CHR Hansen).

El volumen de los coagulantes utilizados en el ensayo fue calculado para que todos ellos tuviesen la misma fuerza. La fuerza (SU) se definió como el número de volúmenes de leche coagulados por volumen de coagulante en 40 minutos a 35°C.

SU= 2400V/tv, donde v es el volumen de coagulante (ml), V volumen de leche (ml) y t el tiempo de coagulación en segundos. La leche utilizada en el ensayo fue 10% leche desnatada en polvo Nestle Sveltesse suplementada con 10mM CaCl₂ a pH 6. El tiempo de coagulación se determinó visualmente. Así el volumen añadido de cada
 5 coagulante se calculó aplicando la fórmula $v = 0.120/SU$ y se añadió agua hasta un volumen final de 20 μ l.

Como control negativo se incubó la progaline B semipurificada en presencia de pepstatina A (inhibidor de proteasas aspárticas) a una concentración final 2 μ M durante 30 min a 37°C antes de añadir la α -, β - o κ - caseína; también se realizó un
 10 blanco con agua.

La reacción con las diferentes caseínas se llevó a cabo a 35°C durante 2 horas transcurridas las cuales la reacción se detuvo añadiendo a un volumen de muestra un volumen de tampón de carga (200 mM Tris-HCl, pH 6.8, 40% glicerol, 2% SDS, 0.04% Coomassie Blue G-250, 2% β -ME) y calentando a 95°C durante 7 minutos.

15 Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE 16.5% según el método de Laemmli pero utilizando como tampón de electroforesis Tris-Tricina (100mM Tris, 100mM Tricina, 0.1% SDS). Las proteínas fueron fijadas con una solución metanol/ácido acético/agua (4:1:5); teñidas con 0.025% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad) en 10% ácido acético y destañadas con 10% ácido acético.

20 La hidrólisis de las α -, β - y κ -caseínas bovinas mediante la progaline B y varios coagulantes comerciales se muestra en la figura 7. El patrón de corte de la progaline B sobre la κ -caseína presenta la misma especificidad que el resto de los coagulantes comerciales utilizados normalmente para la elaboración de quesos (fig.7A líneas 3-9). La digestión de la κ -caseína da lugar a la aparición de un producto de unos 13.5 kDa
 25 que se correspondería con el peso molecular esperado para la para- κ -caseína que resulta de la hidrólisis en el enlace Phe105-Met106 que desencadena el proceso de coagulación de la leche. Estas bandas no se observan en la κ -caseína a la que no se le ha añadido ningún coagulante (fig7A línea 10), ni a la que se ha incubado con progaline B tratada con pepstatina (fig7A línea 2).

30 La actividad proteolítica de la progaline B sobre la α - y β -caseínas es mayor que la de los coagulantes testados. Así podemos observar como cuando la progaline B se incubaba con α -caseína (fig.7B, línea 3) o β -caseína (fig.7C, línea 3) durante 2 horas el patrón de hidrólisis es mayor que el generado con el resto de coagulantes.

Este ensayo indica que la progaline B hidroliza la k-caseína igual que el resto de coagulantes utilizados hoy en día para la elaboración de quesos y que tiene una mayor actividad proteolítica sobre las α - y β -caseínas que estos.

Ejemplo 8. Temperatura y pH óptimos

- 5 Para determinar si la progaline B tenía unas características adecuadas para ser utilizada como coagulante de la leche para la elaboración de quesos se determinó su temperatura y pH óptimos.

La temperatura óptima fue determinada midiendo la actividad sobre FTC- κ -caseína según el método de Ageitos et al. 2006. Se utilizó progaline B semipurificada mediante
10 columna de DEAE Biogel A y como tampón 100 mM acetato sódico a pH 5.5. La temperatura en la que la progaline B presenta una mayor actividad sobre la k-caseína en estas condiciones fue de 50°C presentando entre 30°C y 35°C (temperaturas habituales en la elaboración del queso) el 50% y el 69% de actividad relativa respectivamente.

- 15 Para analizar el pH óptimo: 20 μ l de progaline B semipurificada fueron incubados con 480 μ l una solución de azocaseína (Sigma) al 1% utilizando una concentración 100 mM de tampones a diferentes pHs (4.4 - 7) durante 2 horas a 37°C: el tampón utilizado en el rango de pH 4.4 a 5.6 fue tampón acetato sódico y tampón fosfato sódico en el rango 6.0-7.0. El pH óptimo de la progaline B fue observado a pH 5, la actividad era
20 menor cuando el tampón era más alcalino, así a pH 7 únicamente se conservaba un 21.7% de la actividad. Los valores son similares a los obtenidos para proteasas aspárticas de la especie vegetal *Cynara cardunculus* utilizada para la elaboración de quesos (Sampaio et al., 2008; Almeida et al. 2015). La quimosina presenta una temperatura óptima de coagulación de la leche a pH 6.6 aprox. 45°C y un pH óptimo
25 entre 3.5-5.5 dependiendo del sustrato utilizado para el análisis.

Ejemplo 9. Coagulación de la leche usando progaline B recombinante.

El sobrenadante de un cultivo de 3 días de *P. pastoris* expresando la progaline B se concentró 50 veces y se añadieron 50 μ l a 1 ml de leche (12% (w/v) desnatada en
30 polvo (Nestle Sveltesse) suplementada con 10mM CaCl₂, pH 6 a 37 °C en tubos de cristal y se determinó el tiempo que transcurría hasta la aparición de los primeros flóculos. Como controles negativos se utilizaron: agua destilada, progaline B incubada con pepstatina A a una concentración 2 μ M a 37°C durante 30 minutos y el sobrenadante de una cepa de *P. pastoris* sin transformar obtenida en las mismas condiciones que la cepa transformada. El tiempo transcurrido hasta la aparición de los

primeros flóculos fue de 35 minutos. También se comprobó que la progaline B coagulaba la leche de vaca y oveja, siendo el coagulo más firme y requiriendo un menor tiempo de coagulación cuando se utilizaba la de origen ovino.

Ejemplo 10. Influencia del medio de cultivo para la producción de la progaline B en su forma activa o inactiva.

La cepa recombinante de *P. pastoris* se cultivó a 28°C y 230 rpm durante 3 días en medio YPD, medio YPD ajustado a pH7 mediante tampón fosfato sódico (nombrado YPD7) y en medio YPD ajustado a pH4 mediante tampón citrato (nombrado YPD4) a una concentración final 100 mM de cada uno de los tampones. La cepa sin transformar fue cultivada en las mismas condiciones para comprobar que la actividad proteolítica no era debida a posibles proteasas secretadas por *P. pastoris*.

El patrón de bandas en el Western blot de la progaline B cuando la cepa recombinante era cultivada en YPD4 (fig.9 A/, líneas 1 y 2) o YPD (fig. 9 A/ líneas 5 y 6) era el mismo, tanto en condiciones reductoras (+) como no reductoras (-) (descrito en el ejemplo 4). Cuando la cepa se cultivaba en YPD7 la progaline B presentaba un peso molecular de 56 kDa en condiciones reductoras (fig.9 A/ línea 3), la cual corresponde al peso molecular predicho para la forma de la enzima no procesada (con el propéptido y el PSI presentes). La diferencia en el peso molecular de la proteína en condiciones no reductoras (58 kDa, fig.9 A/, línea 4) podría ser debida a la forma adoptada por la misma cuando no se rompen los puentes disulfuro. La progaline B secretada en YPD e YPD4 muestra actividad proteolítica usando FTC-k-casein como sustrato, mientras que la producida en YPD7 es inactiva (fig.9 C1). La conversión de la progaline B secretada en YPD7 a su forma activa ocurre cuando se baja el pH del sobrenadante a pH 3.5 durante 4,30 horas a 37°C. Así, después de la incubación se detecta la banda de 30,7 kDa (fig.9 B/ línea 3) debido a la rotura del PSI y pérdida del propéptido (fig.9 B/ línea 4: en condiciones no reductoras HC y LC permanecen unidas por puentes disulfuro) (la pérdida del propéptido se deduce por el menor peso molecular de la banda correspondiente a la enzima recombinante y fue verificado mediante MALDI TOF en un ensayo no incluido en este documento). La bajada de pH activa la progaline B lo cual da lugar a que el sobrenadante muestre actividad proteolítica (122 ± 23 U) (fig9. C2).

Las actividades enzimáticas en YPD, YPD4 y YPD7 no son comparables debido al efecto del pH en el crecimiento celular. La activación de la progaline B cuando se cultiva en medio YPD sin tamponar se debe a la bajada de pH que se produce en el transcurso de la fermentación (fig. 6).

Este ensayo demuestra que la activación de la progaline B recombinante es dependiente de pH y que tamponando el medio de cultivo podemos producirla en su forma inactiva y activarla posteriormente mediante una bajada de pH.

5 **Ejemplo 11. pH de activación de la progaline B.**

El pH de activación de la progaline B cultivada en medio tamponado a pH7 (YPD7) se determinó incubando los sobrenadantes de un cultivo de la cepa recombinante con un volumen de tampón 0,2 M a diferentes pHs. Las muestras se incubaron a 28°C durante 30, 150 y 270 minutos, transcurridos los cuales se analizaron mediante Western Blot y se midió su actividad mediante el método de Ageitos et al. 2006 (fig. 10 A y fig. B respectivamente). Transcurridos 30 minutos de incubación en el rango de pH 3.5-5.0 se detectaba una banda correspondiente a la cadena pesada de la progaline B con el propéptido (37 kDa), mientras que en los sobrenadantes incubados a pH 6.6 y 7 se observaba únicamente la banda de 56 kDa correspondiente a la enzima sin procesar (fig. 10 A.1). Cuando el tiempo de incubación se incrementaba (150 minutos) se producía la rotura del propéptido detectándose la banda de 30.7 kDa correspondiente a la cadena pesada sin el propéptido. El procesamiento era total cuando el sobrenadante se incubaba a pH 3.5 (fig.10 A.2, línea 2); la conversión era más lenta cuando el sobrenadante se incubaba a pHs más alcalinos, así la banda de 30,7 kDa era más tenue a pH 4.6 -5 y no se detectaba a pH 5.8, 6.6 y 7 (fig.10 A.2). Transcurridos 270 minutos la activación de los sobrenadantes en el rango 4.3 – 5.8 da lugar a una activación parcial (la banda de 37 kDa sigue siendo visible), mientras que a pH 6,6 y 7 la progaline B no es activada (fig.10, A.3).

25 Como puede verse en la figura 10 B las muestras en las cuales la progaline B ha perdido el propéptido muestran actividad enzimática sobre la k-caseína (fig. 10 B) y esta es mayor en función de la pérdida del propéptido.

REIVINDICACIONES

- 1- Un vector que comprende un polinucleótido con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o en la SEQ ID NO: 2, o una variante de las mismas que tiene un grado de identidad de al menos un 80% con respecto a la SEQ ID NO: 1 o a la SEQ ID NO: 2 con actividad proteasa aspártica de la especie vegetal *Galium verum*.
- 2- Una célula o microorganismo que comprende un vector según la reivindicación 1.
- 3- Una célula o microorganismo que integrado en su genoma comprende un polinucleótido con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o en la SEQ ID NO: 2, o una variante de la misma que tiene un grado de identidad de al menos un 80% con respecto a dicha SEQ ID NO: 1, con actividad proteasa aspártica de la especie vegetal *Galium verum*.
- 4- Una célula o microorganismo según reivindicación 2 o 3 con la condición de que dicha célula es una levadura o una bacteria.
- 5- Una cepa de células según reivindicación 4 con la condición de que dicha célula es la levadura *Pichia pastoris* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de depósito CECT 13141.
- 6- Procedimiento de obtención del coagulante que comprende la producción por fermentación de las proteasas aspárticas de *Galium verum* en un medio de cultivo que comprende:
- a) una célula o microorganismo hospedador según reivindicaciones de la 2 a la 5,
 - b) centrifugación del medio de cultivo y separación de la parte líquida,
 - c) filtración de la parte líquida
 - d) uso directo de la misma o concentración mediante ultrafiltración, cromatografía, precipitación con sulfato de amonio o liofilización de la parte líquida.

- 7- Procedimiento de obtención del coagulante según reivindicación 6 donde el medio de cultivo es YPD.
- 5 8- Procedimiento de obtención del coagulante según reivindicación 6 y 7 donde la centrifugación del medio de cultivo y la separación de la parte líquida se lleva a cabo en un rango de 1.500 a 20.000g.
- 9- Procedimiento de obtención del coagulante según reivindicación 6 a 8 donde la temperatura de cultivo está comprendida entre 20 y 35 °C.
- 10- Procedimiento de obtención del coagulante según reivindicaciones de la 6 a la 9 en el cual la proteasa aspártica recombinante de *Galium verum* se produce en su forma inactiva en un medio a pH alcalino y se activa posteriormente mediante una bajada de pH.
- 10 11- Procedimiento de obtención del coagulante según reivindicación 10 con la condición de que el pH de cultivo está comprendido entre 7 y 14 y el pH de activación está comprendido entre 2 y 5.5
- 15 12- Una composición que comprende el uso de la proteasa aspártica obtenida a partir de una célula hospedadora según reivindicaciones de la 2 a la 5.
- 13- Composición según la reivindicación 12, que comprende, además, un aditivo apto para alimentación.
- 14- Elaboración de un producto alimenticio que comprende la proteasa aspártica obtenida mediante procedimiento según reivindicaciones 6 a la 11 o células o microorganismos según las reivindicaciones 2 a la 5.
- 20 15- Uso de la proteasa aspártica obtenida mediante procedimiento según reivindicaciones 6 a la 11 para la coagulación de la leche.
- 16- Uso de la proteasa aspártica según reivindicación 15 que no requiere una activación previa para la coagulación de la leche.
- 25 17- Uso de la proteasa aspártica obtenida mediante procedimiento según reivindicaciones 6 a la 11 para la elaboración de queso.
- 18- Uso de la proteasa aspártica obtenida mediante procedimiento según reivindicaciones 6 a la 11 para la maduración acelerada de los quesos.

19- Uso de la proteasa aspártica obtenida mediante procedimiento según reivindicaciones 6 a la 11 para la producción de productos lácteos enriquecidos en péptidos bioactivos

5

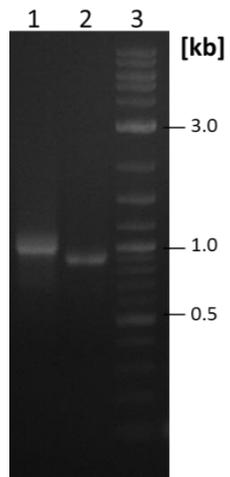


FIG.1

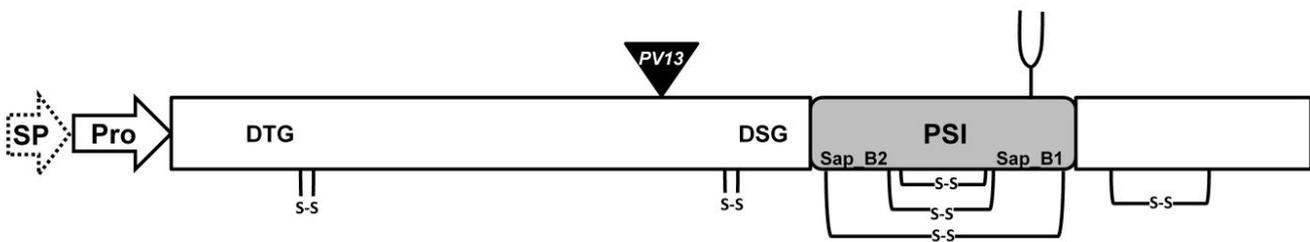


FIG.2

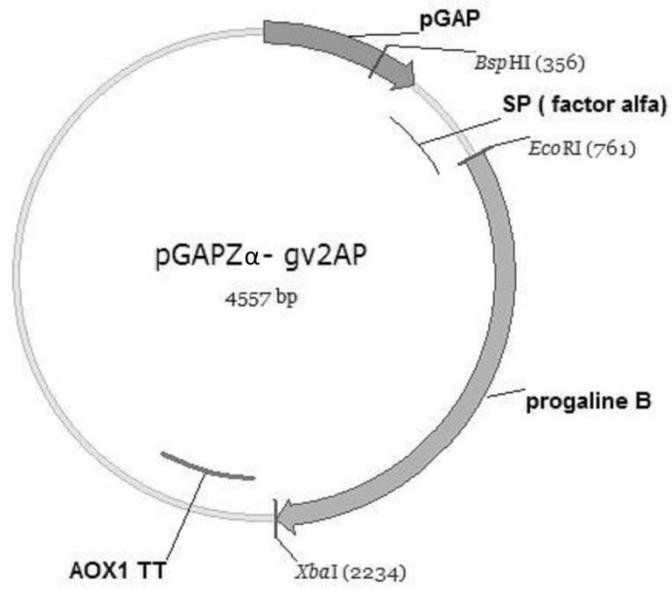


FIG.3

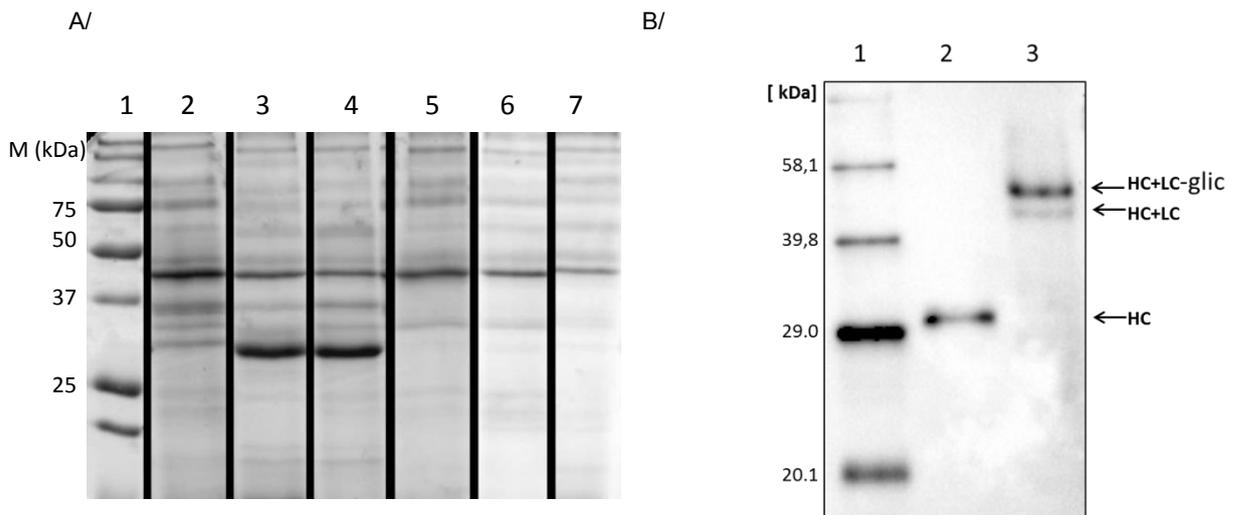


FIG.4

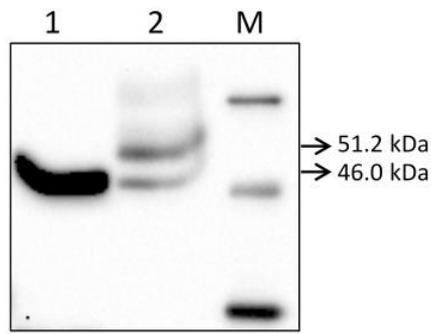


FIG.5

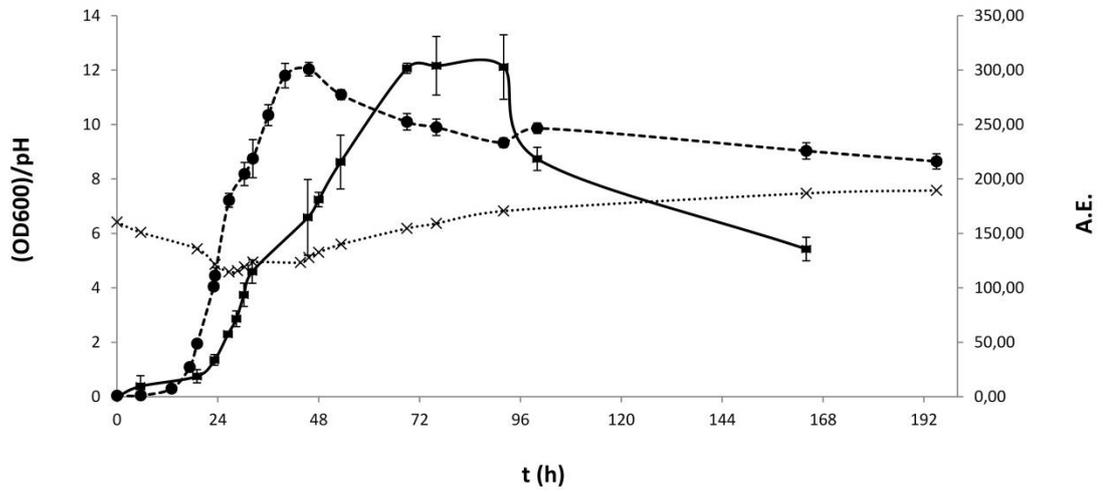


FIG.6

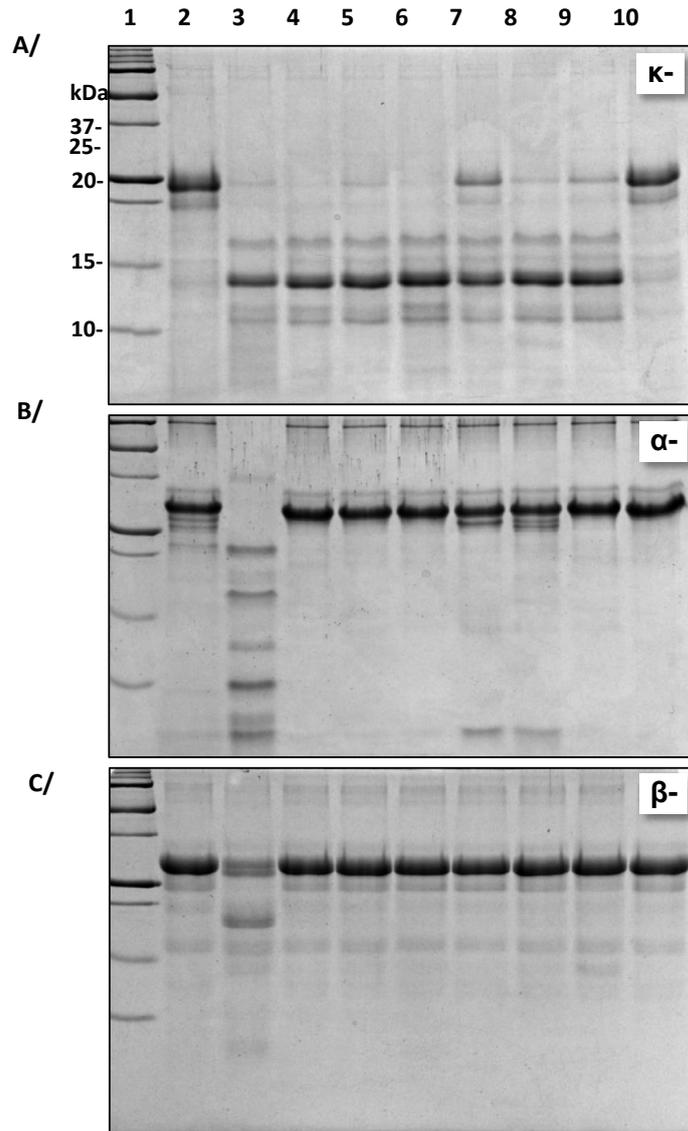


FIG.7

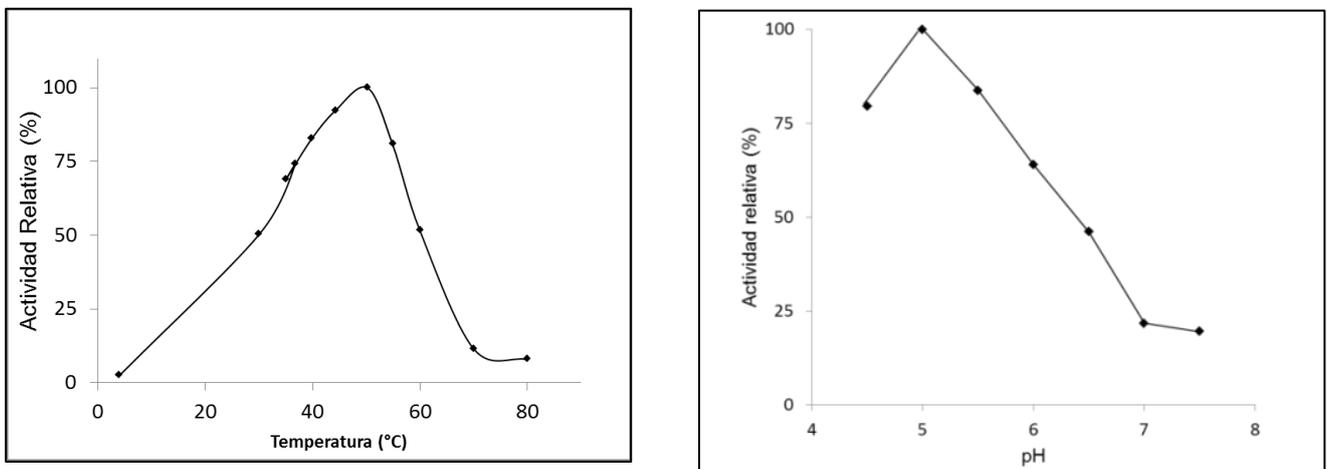
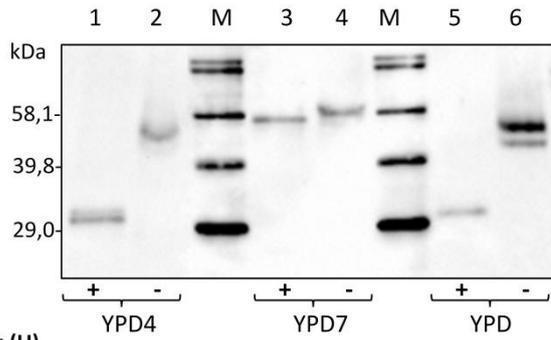


FIG.8

A/

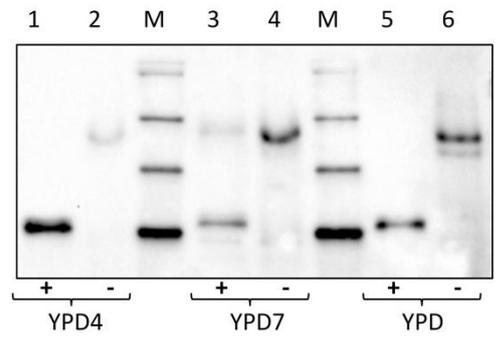


C.1/ Activity (U)

| | | | |
|--------------|----------|--------|---------|
| Recombinant: | 176 ± 14 | 21 ± 3 | 198 ± 6 |
| Wild type: | 2 ± 6 | 17 ± 5 | -1 ± 13 |

B/

↓pH to 3.5



C.2/

| | | | |
|--|----------|----------|----------|
| | 171 ± 10 | 122 ± 23 | 255 ± 23 |
| | 4 ± 9 | 1 ± 9 | -4 ± 13 |

FIG.9

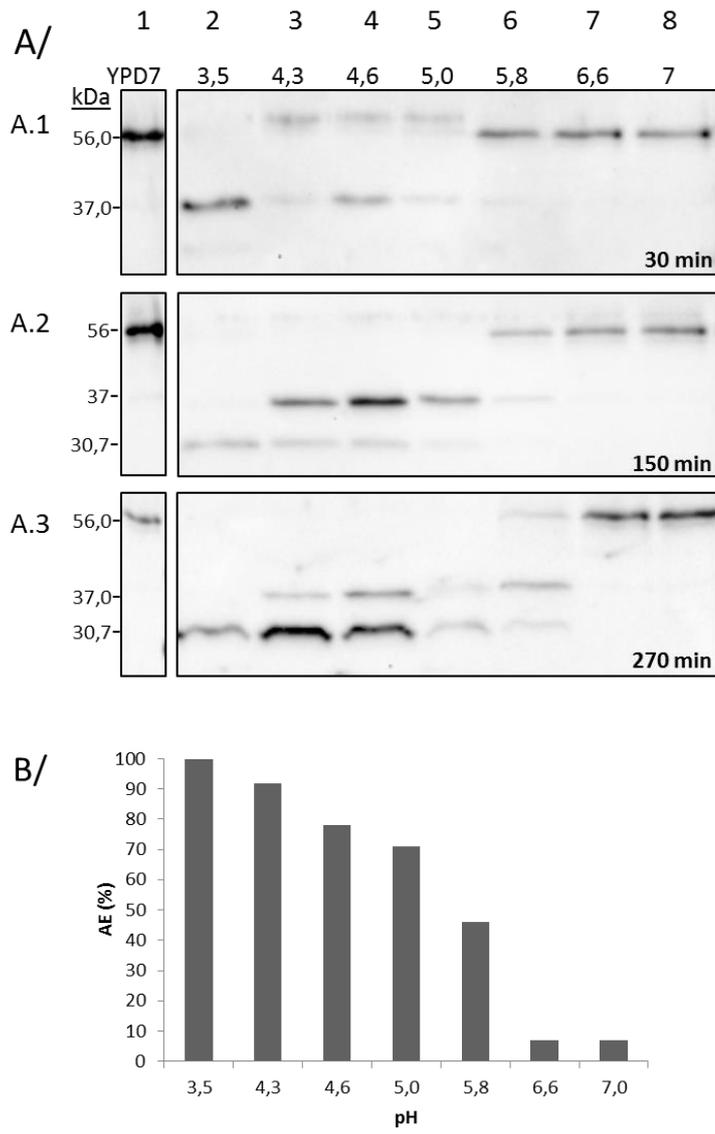


FIG.10

ES 2 673 702 B2

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Santiago de Compostela

<120> CEPA RECOMBINANTE, MÉTODO DE PRODUCCIÓN DE PROTEASAS
ASPÁRTICAS DE GALIUM VERUM Y USO EN LA INDUSTRIA LÁCTEA

<130> Preprogaline

<160> 2

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 1473

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> SOURCE

<222>1..1473

<223> SEQ ID NO:1

<400> 1

gaattctccg cagctttggt atcagcatct gaaactaagc tggtcagagt
ttcactgaag 60

aaagccaagt tggaccaagt taatcggctt gccggaagtg ttcctagggg
ttctgcaaga 120

attaatcgtc tttatggaaa tatggggctg tctgattctg acattattgc
tctgaagaac 180

tacatggatg cgcagtatta cggtgaaatt ggtattggta cgctgctca
gaagttcact 240

gtgatttttg aactggcag ttctaattctc tgggtgccat ctacaaagtg
ttacttctca 300

cctgcttggt atttccattc aaagtataat tccaagcatt caagtactta
caagaaaaat 360

ggaaaatctg ctgaaatcca ctatggaact ggatccatcg caggcttttt
cagccaagat 420

agtgttaaac ttggagatct tgttgtaaag gatcaggatt tcattgaggc
aaccagagag 480

cctggcatca catttgtggc tgccaagttt gatgggtcttc ttggactagg
atttcaagag 540

atttctgttg gaaagctgt tcctgtatgg tacaacatgg ttaaacaagg
tcttgttgca 600

ES 2 673 702 B2

gaacctgttt tttcattctg gtttaatcgc cacactgatg aggaacaagg
tgttgaactt 660

gtttttgggtg gggttgatcc gagccacttc aagggtgaac atgtatatgc
taaagtaact 720

aagaagggct actggcagtt tgatatgggt gatgtgctag tcgggtggtga
atcaacagga 780

ttctgtgcc acggttggtc tgctattgcc gactctggaa cttctctggt
ggcaggacca 840

acggctgtcg tggtgcaaat aaatcatgct attggagcta ctgggtgtgt
gagccaagaa 900

tgtaagtcgg tggtttctca gtatggtaaa accatactag atatgttggt
agccaagact 960

gagcccaaaa ctatctgtgc atctattgga ctgtgcttac ctaagggctc
tcgtgatgat 1020

gatatgatta tcgagagtgt ggtggaggag actgactcgg cgtctgatgg
tcttcgtaat 1080

gatgagatgt gctctgcatg tcaaatggca gttgtatgga tgcaaaatca
agtgagacaa 1140

aaccaaactg aagagaaaat cttggactat attaatcagc tctgtgaccg
actgcctagt 1200

ccaatgggag aatcagctgt tgactgtagt agccttgctt cactgccaaa
gatagctttc 1260

tctattggcg gtaaagcatt tgaactgtcc ccagaggagt atgtcctgaa
agttggtgaa 1320

ggagctgcag ctcaagtgc ttagtggattt acagcattag acgtggcacc
tcctctggga 1380

cctctctgga ttctgggtga tgtatttatg gggagctacc atacagtgtt
tgactatgga 1440

aatatgaggg ttggattcgc agaagcagct tga
1473

<210> 2
<211> 1446
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> SOURCE
<222>1..1446
<223> SEQ ID NO:2

ES 2 673 702 B2

<400> 2

gtgctgagaa taggtttgaa aaagaagtct ttagatcttc agggcgtaag
agctgctata 60

ttagctagat caagtaggcc acatggtaat tgtagaaaga gtttgaacag
ccaactgagt 120

agttccagtg gagatatatt acctttgaag aactaccttg atgcccaata
ttatggagac 180

atttctattg gttcacctcc tcagaacttc acagtcatat ttgacactgg
cagttccaat 240

ctttgggttc catcatcgaa atgctacttc tccattgcat gctggatcca
ccataagtac 300

aagggcagca agtcaagtac ctacaaaaag ataggaaagt cttgctcaat
tcgatatgga 360

tcaggctcaa tttctggctt ctccagtcaa gatagtgttg gagttggcga
cattgtagtc 420

aaaaatcagg tttttattga agcttcacga gaaggaagcc tgtcatttgt
attggctaag 480

tttgatggga tactcggctt tggattccag gagattgctg tggatgatat
ggtgccagtc 540

tggataata tggatcaatca aggtcttgtg aacgagaaag tattctcttt
ctggcttaac 600

cgtgatgagg atgctgaaga aggaggtgag cttgtattcg gtgggtgttga
tccaaagcat 660

ttcattgggc aacataactta tgttcctgta acccagaaag gatactggca
gtttgaatg 720

ggtgatgtaa tcgtcggagg cgcctcaaca ggtttctgtg aaggaggttg
taaggctatt 780

gtggactctg gaacatcatt gcttgctggc ccaaccacta tcgtgactga
aatcaaccac 840

gccattggtg gagaaggagt ggtaagcgtg gagtgcaagg aaattgtttc
agagtatgga 900

gacatgatat ggaatcttct tgtatcaggg gtttcacctg acaaggctctg
cgacaagct 960

ggtttatggt tattcgtgta agctcagtct gacagttaca tcaagtcggt
tgttgatgat 1020

gtggagaata aggacgggca ttctgttggt attacaccga tgtgttctgc
ttgccagatg 1080

ES 2 673 702 B2

gcagttgttt ggattcggaa ccagctgaaa cagaagaaca ccaaggacaa
agtgtttgaa 1140

tatgttaatc agctctgcga gagcattccg agcccatgg gtgaatctgt
agtcagctgc 1200

aacagcctat ccagcttgcc aaacatatca tttaccattg gagataaagt
tttcgagcta 1260

acccagaac agtatgttct taaaaccgga actgggatgg aaactatttg
catcagcgga 1320

ttcatggctt ttgacttacc tgccccacgc ggtcctctct ggattcttgg
cgacgtattc 1380

atgggggtat accacactgt gttcgattat ggcaacctcc agctaggatt
cgcaaggct 1440

gcttag
1446



- ②① N.º solicitud: 201631665
②② Fecha de presentación de la solicitud: 23.12.2016
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| A | WO 0075283 A1 (INSTITUTO DE CIENCIA APLICADA E TECHNOLOGIA (ICAT) [PT/PT]) 14/12/2000, todo el documento. | 1-19 |
| A | WO 2014148931 A2 (BIOCANT – ASSOCIAÇÃO DE TRANSFERÊNCIA DE TECHNOLOGIA [PT/PT]) 25/09/2014, página 3, línea 33 - página 4, línea 8; página 22, línea 4 – página 24, línea 26; reivindicaciones 18-32. | 1-19 |
| A | ES 2336171 A1 (UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA) 08/04/2010, página 2, línea 63 – página 3, línea 10; reivindicaciones 1-4. | 1-19 |
| A | Lucia Feijoo-Siota <i>et al.</i> Recent Patents on Microbial Proteases for the Dairy Industry. Recent Advances in DNA and Gene Sequences. 2014. Vol 8(1), pp: 44-55, todo el documento. | 1-19 |

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:

Fecha de realización del informe
06.09.2017

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N1/19 (2006.01)

C12N15/62 (2006.01)

C12N15/81 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE PATENTS, EBI.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 06.09.2017

Declaración

| | | |
|---|-----------------------|-----------|
| Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones 1-19 | SI |
| | Reivindicaciones | NO |
| Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986) | Reivindicaciones 1-19 | SI |
| | Reivindicaciones | NO |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|--|-------------------|
| D01 | WO 0075283 A1 | 14.12.2000 |
| D02 | WO 2014148931 A2 | 25.09.2014 |
| D03 | ES 2336171 A1 | 08.04.2010 |
| D04 | Lucia Feijoo-Siota <i>et al.</i> Recent Advances in DNA and Gene Sequences. 2014. Vol 8(1), pp: 44-55. | 2014 |

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención divulga un vector que comprende un polinucleótido definido por las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, proteasas aspárticas de la especie *Galium verum*; así como una célula o microorganismo que contiene dicho vector, preferentemente la levadura *Pichia pastoris* con número de depósito CECT 13141. Se refiere también su uso en un método de producción de coagulantes vegetales, mediante la fermentación de los microorganismos que contienen dichas proteasas y su empleo en la industria de productos lácteos (reivindicaciones 1-19).

El documento D01 divulga unas enzimas recombinantes producidas a partir de una levadura transformada con genes codificantes para proteasas aspárticas de origen vegetal, con actividad de coagulación de leche procedente de vacas, ovejas y cabras. Se refiere también al procedimiento de su obtención mediante cultivo de la levadura transformada en medio líquido (ver todo el documento).

El documento D02 divulga unas proteasas aspárticas, procedentes de plantas, que han sido modificadas; así como su procedimiento de obtención y su empleo para coagulación de la leche (ver página 3, línea 33 - página 4, línea 8; página 22, línea 4 - página 24, línea 26; reivindicaciones 18-32).

El documento D03 divulga el uso del cuajo, sin activación previa, obtenido a partir de una célula huésped que contiene un vector de expresión que comprende cualquiera de las secuencias que codifican las proteínas de búfalo seleccionadas del grupo: preproquimosina, proquimosina y quimosina para la coagulación de la leche y elaboración del queso mozzarella (ver página 2, línea 63 - página 3, línea 10; reivindicaciones 1-4).

El documento D04 divulga una revisión sobre las características de las peptidasas de origen microbiano utilizadas en la industria láctea, principalmente en la fabricación de quesos (ver todo el documento).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)**1.1. REIVINDICACIONES 1-19**

El documento D01 se considera el más cercano al estado de la técnica, ya que anticipa la obtención de proteasas aspárticas recombinantes de origen vegetal mediante fermentación en medio líquido de una levadura transformada con genes codificantes para estas enzimas que presentan actividad de coagulación de la leche.

La diferencia entre D01 y la presente invención radica en que las proteasas aspárticas recombinantes de origen vegetal son diferentes. Las enzimas de la invención se obtienen a partir de unas secuencias génicas que codifican para las proteasas preprogaline A y preprogaline B de la planta *Galium verum* clonadas en la levadura *Pichia pastoris*, lo que no ha sido encontrado en el estado de la técnica.

La obtención de proteasas distintas implica un efecto técnico diferente debido a que el tipo de coagulante utilizado en la industria láctea tiene una gran influencia en las características organolépticas del producto final, principalmente en la elaboración del queso. De este modo se considera que tanto la cepa recombinante como el método reivindicado en la presente invención para producción de proteínas aspárticas de uso industrial son nuevos y ofrecen una alternativa diferente a lo divulgado en el estado de la técnica.

En consecuencia, según lo divulgado en D01, las reivindicaciones 1-19 cumplen el requisito de novedad y actividad inventiva (**Art. 6.1 y Art. 8.1 LP11/1986**).

Los documentos D02 - D04 se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes en relación a la novedad y actividad inventiva del objeto de la invención.