

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 020**

51 Int. Cl.:

C12N 9/10

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.01.2009** **PCT/JP2009/000221**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.08.2009** **WO2009101762**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2009** **E 09711348 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016** **EP 2251421**

54 Título: **Transglutaminasa estabilizada y procedimiento para la producción de la misma**

30 Prioridad:

13.02.2008 JP 2008032252

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

09.06.2017

73 Titular/es:

**AMANO ENZYME INC. (100.0%)
2-7 Nishiki 1-chome, Naka-ku
Nagoya-shi, Aichi 460-8630, JP**

72 Inventor/es:

**OKADA, MASAMICHI;
KURONO, YOSHIAKI;
AMANO, HITOSHI y
YAMAGUCHI, SHOTARO**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 616 020 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Transglutaminasa estabilizada y procedimiento para la producción de la misma

5 CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se refiere a una transglutaminasa, y más particularmente a una transglutaminasa estabilizada que tiene una excelente estabilidad frente a la oxidación, estabilidad con la temperatura, y similares.

10 TÉCNICA ANTERIOR

[0002] Las transglutaminasas son enzimas que catalizan una reacción de transferencia de acilo de un grupo γ -carboxil amida de un residuo de glutamina en una cadena peptídica. La reacción conduce a la formación de la reticulación de ϵ -(γ -Gln)-Lys en la parte intramolecular o intermolecular de moléculas de proteína cuando un grupo ϵ -amino de un residuo de lisina en la proteína actúa como un receptor de acilo. Por lo tanto, dado que el uso de la acción de una transglutaminasa permite la mejora de la proteína o péptido, se utiliza una transglutaminasa de una enzima microbiana derivada del género *Streptomyces* en la unión de carne y en la fabricación de salchichas, tofu, pan, y fideos (véase el documento de patente 1).

[0003] La transglutaminasa es una enzima con tiol que tiene cisteína como un residuo de centro activo, y se convierte en una forma madura a través de una proforma en un procedimiento de fermentación. Por lo tanto, una transglutaminasa tiene poca estabilidad y requiere la adición de un estabilizador con el fin de suprimir la inactivación durante la fabricación o almacenamiento de productos.

[0004] Como procedimiento para mejorar la estabilidad de una transglutaminasa durante el almacenamiento, se ha propuesto la adición de un ácido orgánico, ácido inorgánico, polifenol, tiol y alcohol de azúcar (véase el documento de patente 1). Además, se ha desarrollado un procedimiento para mejorar la estabilidad mediante la adición de proteína (proteína de trigo, proteína de soja, y similares), o un hidrolizado parcial de proteína (véase el documento de patente 2). Además, se ha desarrollado una técnica de estabilización utilizando trehalosa (documento de patente 3).

[Documento de patente 1] Publicación de patente japonesa no examinada No. H4-207194

[Documento de patente 2] Patente No. 3651003

[Documento de patente 3] Publicación de patente japonesa no examinada No. 2004-305010

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[Problemas a resolver por la invención]

[0005] Aunque se han propuesto diversas técnicas de estabilización, las necesidades de estabilización de transglutaminasas todavía son altas. Tal como se ha mencionado anteriormente, las transglutaminasas han sido ampliamente utilizadas en los campos de alimentos. Por lo tanto, con el fin de evitar circunstancias inesperadas, es deseable que los componentes adicionales se añadan tan poco como sea posible.

[0006] Bajo el marco mencionado anteriormente, un objetivo de la presente invención es proporcionar una transglutaminasa que tiene una excelente estabilidad, un procedimiento para producir la misma y el uso de la misma.

[Medios para resolver el problema]

[0007] Bajo las circunstancias mencionadas anteriormente, los presentes inventores han investigado profundamente. Como resultado, los presentes inventores han encontrado que una forma intermedia de la transglutaminasa está presente en una solución de cultivo de una cepa productora de transglutaminasa y pudieron recuperar la forma intermedia. En el nuevo estudio, se ha aclarado que la forma intermedia recuperada tiene una estructura en la que el péptido pro-secuencia está unido a la transglutaminasa madura (TGasa madura). Por otra parte, como resultado de la evaluación de la estabilidad de la forma intermedia, se ha encontrado que la forma intermedia es más excelente que la TGasa madura con respecto a la estabilidad con el pH, estabilidad con la temperatura, estabilidad frente a la oxidación y estabilidad con el almacenamiento.

[0008] La presente invención se realizó basándose en los hallazgos mencionados anteriormente, y se relaciona con lo mencionado a continuación.

[1] Una transglutaminasa estabilizada, incluyendo el péptido pro-secuencia de la transglutaminasa y una transglutaminasa madura, en la que el péptido pro-secuencia de la transglutaminasa está unido a la transglutaminasa madura y la transglutaminasa estabilizada tiene una estabilidad superior a la transglutaminasa madura a la que no está unido el péptido pro-secuencia de la transglutaminasa, y la estabilidad es al menos una estabilidad seleccionada del grupo que consiste en la estabilidad con el pH, estabilidad con la temperatura, la estabilidad frente a la oxidación y la estabilidad con el almacenamiento.

[2] La transglutaminasa estabilizada descrita en [1], en la que la transglutaminasa madura deriva de un microorganismo.

[3] La transglutaminasa estabilizada descrita en [2], en la que el microorganismo es un microorganismo del género *Streptomyces*.

[4] La transglutaminasa estabilizada descrita en [2], en la que el microorganismo es *Streptomyces mobaraensis*.

[5] La transglutaminasa estabilizada descrita en [1], en la que la transglutaminasa madura incluye una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 6.

[6] La transglutaminasa estabilizada descrita en [1], en la que el péptido pro-secuencia deriva de un microorganismo.

[7] La transglutaminasa estabilizada descrita en [6], en la que el microorganismo es un microorganismo del género *Streptomyces*.

[8] La transglutaminasa estabilizada descrita en [6], en la que el microorganismo es *Streptomyces mobaraensis*.

[9] La transglutaminasa estabilizada descrita en [1], en la que el péptido pro-secuencia incluye cualquier secuencia de las siguientes (1) a (3):

(1) DNGAGEETKSYAETYRLTADDVANINALNESAPAA (SEQ ID NO: 1);

(2) DNGAGEETKSYAETYRLTADDVANINALNESAPAAS (SEQ ID NO: 2); y

(3) DNGAGEETKSYAETYRLTADDVANINALNESAPAASS (SEQ ID NO: 3).

[10] Un procedimiento para producir una transglutaminasa estabilizada, incluyendo el procedimiento las etapas de: cultivar un microorganismo capaz de producir la transglutaminasa en las condiciones en las que la transglutaminasa se puede producir; y

separar y recuperar una transglutaminasa madura a la que el péptido pro-secuencia está unido de una solución de cultivo.

[11] El procedimiento para producir una transglutaminasa estabilizada descrita en [10], en el que el microorganismo es un microorganismo del género *Streptomyces*.

[12] El procedimiento para producir transglutaminasa estabilizada descrita en [10], en el que el microorganismo es *Streptomyces mobaraensis*.

[BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS]

[0009]

La figura 1 es un gráfico que muestra la comparación de la estabilidad con el pH entre TGasa estabilizada (P-TGasa) y TGasa madura (M-TGasa), en el que la abscisa muestra el pH y la ordenada muestra la actividad restante (%).

La figura 2 es un gráfico que muestra la comparación de la estabilidad con la temperatura entre la TGasa estabilizada (P-TGasa) y TGasa madura (M-TGasa), en el que la abscisa muestra el tiempo de tratamiento (minutos) y la ordenada muestra la actividad restante (%).

La figura 3 es un gráfico que muestra la comparación de la estabilidad frente a la oxidación entre la TGasa estabilizada (P-TGasa) y TGasa madura (M-TGasa), en el que la abscisa muestra la concentración de peróxido de hidrógeno (%) y la ordenada muestra la actividad restante (%).

La figura 4 es un gráfico que muestra la comparación de la estabilidad con el almacenamiento entre la TGasa estabilizada (P-TGasa) y TGasa madura (M-TGasa), en el que la abscisa muestra el tiempo de almacenamiento (meses) y la ordenada muestra la actividad restante (%).

La figura 5 es un gráfico que muestra la comparación de la estabilidad con la temperatura entre la TGasa estabilizada (P-TGasa) y TGasa madura (M-TGasa), en el que la abscisa muestra el tiempo de tratamiento (min) y la ordenada muestra la actividad restante (%).

La figura 6 es un gráfico que muestra la comparación de la estabilidad frente a la oxidación entre la TGasa estabilizada (P-TGasa) y TGasa madura (M-TGasa), en el que la abscisa muestra la concentración de peróxido de hidrógeno (%) y la ordenada muestra la actividad restante (%).

La figura 7 es un gráfico que muestra la comparación de la estabilidad con la temperatura entre la TGasa estabilizada (P-TGasa) y TGasa madura (M-TGasa), en el que la abscisa muestra el tiempo de tratamiento (min) y la ordenada muestra la actividad restante (%).

[MEJOR MODO DE LLEVAR A CABO LA INVENCION]

(TGasa estabilizada)

[0010] Una transglutaminasa estabilizada (TGasa estabilizada) de la presente invención tiene una estructura en la que el péptido pro-secuencia de la transglutaminasa está unido a la TGasa madura estabilizada. Es decir, la transglutaminasa estabilizada se caracteriza porque el péptido pro-secuencia de la transglutaminasa y TGasa madura se incluyen como elementos esenciales, y estos elementos están unidos entre sí. Con las características, la TGasa estabilizada de la presente invención presenta una estabilidad superior a la de la TGasa madura. El término "estabilidad" utilizado en el presente documento pretende incluir la estabilidad con el pH, estabilidad con la temperatura, estabilidad frente a la oxidación y la estabilidad con el almacenamiento. Por lo tanto, la TGasa estabilizada de la presente invención es más excelente que la TGasa madura en términos de al menos una estabilidad seleccionada del grupo que consiste en la estabilidad con el pH, estabilidad con la temperatura, estabilidad frente a la oxidación y estabilidad con el almacenamiento. La TGasa estabilizada en una realización preferible es más excelente que la TGasa madura en la estabilidad con el pH, la estabilidad con la temperatura, la estabilidad frente a la oxidación y la estabilidad con el almacenamiento.

[0011] Por cierto, una transglutaminasa como proteína secretora es traducida como una pre-pro-transglutaminasa en la que están unidas una secuencia señal (pre-secuencia) y una pro-secuencia; a continuación, la secuencia señal se escinde para convertirse en pro-transglutaminasa; y posteriormente, el péptido pro-secuencia se escinde para transformarse en una transglutaminasa madura (TGasa madura). Como se muestra en los Ejemplos mencionados a continuación, los presentes inventores han descubierto la presencia de una forma intermedia que tiene una estructura en la que el péptido pro-secuencia escindido está unido a la transglutaminasa madura en la serie del procedimiento, y también se ha aclarado que la forma intermedia tiene una excelente estabilidad. La TGasa estabilizada de la presente invención se obtiene habitualmente como una forma intermedia generada en el procedimiento mencionado anteriormente. Sin embargo, un procedimiento de producción (un procedimiento de obtención) no está particularmente limitado, siempre que una forma intermedia tenga una estructura en la que el péptido pro-secuencia está unido a TGasa madura y tenga una estabilidad mejor más que la de la TGasa madura. Por lo tanto, la TGasa estabilizada producida mediante la preparación del péptido pro-secuencia y la TGasa madura por separado y la unión entre sí se incluye en la TGasa estabilizada de la presente invención, siempre que se observe una mejora de la estabilidad.

[0012] El "péptido pro-secuencia" en esta memoria descriptiva indica una parte o la totalidad del péptido que constituye una pro-secuencia (es decir, una secuencia proporcionada entre una pre-secuencia y una secuencia de la proteína madura). Tres tipos de péptido se muestran como ejemplos del péptido pro-secuencia.

[0013]

Péptido pro-secuencia ejemplo 1: péptido que consiste en la secuencia de DNGAGEETKSYAETYRLTADDVANINALNESAPAA (SEQ ID NO 1).
 Péptido pro-secuencia ejemplo 2: péptido que consiste en la secuencia de DNGAGEETKSYAETYRLTADDVANINALNESAPAAS (SEQ ID NO 2).
 Péptido pro-secuencia ejemplo 3: péptido que consiste en la secuencia de DNGAGEETKSYAETYRLTADDVANINALNESAPAASS (SEQ ID NO 3).

[0014] La derivación (origen) del péptido pro-secuencia no está particularmente limitada. Preferiblemente, el péptido pro-secuencia deriva de microorganismos. El "péptido pro-secuencia derivado de microorganismos" incluye el péptido pro-secuencia de transglutaminasa producida por un microorganismo de, por ejemplo, el género *Streptomyces* (véase, por ejemplo, la patente japonesa no examinada de No. de publicación S64-27471), y además, el péptido que incluye una secuencia de aminoácidos que es la misma que la del péptido pro-secuencia (es decir, una parte o toda una parte de la pro-secuencia de la transglutaminasa producida por microorganismos). Entre los ejemplos de las secuencias de aminoácidos de la pro-secuencia de longitud completa de la transglutaminasa producida por microorganismos se muestran la SEQ ID NO: 4 (*Streptomyces mobaraensis*) y la SEQ ID NO: 5 (*Streptomyces cinnameus*).

[0015] Además, la derivación (origen) de la TGasa madura como uno de los elementos de la TGasa estabilizada de la presente invención no está particularmente limitada. Por ejemplo, se pueden utilizar la TGasa madura producida por un microorganismo de, por ejemplo, el género *Streptomyces* (véase, por ejemplo, la patente japonesa no examinada de No. de publicación S64-27471), la TGasa madura producida por mamíferos (véase, por ejemplo, la patente japonesa examinada de No. de publicación H1-50382), TGasa madura recombinante (tipo de recombinación) obtenida mediante la utilización de la tecnología de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente japonesa no examinada de No. de publicación H5-199883 y 2004-97099), y similares. Preferiblemente, la TGasa madura deriva de microorganismos. Los ejemplos de "TGasa madura derivada de microorganismos" incluyen TGasa madura natural producida por microorganismos del género *Streptomyces* y similares (véase, por ejemplo, la patente japonesa no examinada de No. de publicación S64-27471), la TGasa madura recombinante obtenida mediante el cultivo de un transformante en el que se introduce un gen de la transglutaminasa producida por microorganismos. Entre los ejemplos de las secuencias de aminoácidos de la TGasa madura derivada de microorganismos se muestran la SEQ ID NO: 6 (*Streptomyces mobaraensis*) y la SEQ ID NO: 7 (*Streptomyces cinnameus*).

[0016] Preferiblemente, los microorganismos como orígenes del péptido pro-secuencia y/o la TGasa madura son microorganismos que pertenecen al género *Streptomyces*. Entre los ejemplos de microorganismos que pertenecen al género *Streptomyces* se incluyen *Streptomyces mobaraensis* (nombre antiguo: *Streptovercillium mobaraense*), cepa No. 140226 (véase la patente japonesa no examinada de No. de publicación 2005-73628), *Streptomyces lavendulae*, cepa No. 466 (véase la patente No. 2.849.773, documento de patente 1), *Streptomyces* sp., No.83 (véase la patente No. 2.849.773, documento de patente 1), y similares. Además, es posible utilizar cepas mutantes, tales como una cepa cuya productividad se mejora mediante el uso de procedimientos comunes, tales como la radiación ultravioleta y NTG (N-metil-N'-nitrosoguanidina), una cepa en la que la generación de la proteína contaminada, tal como la proteasa y amilasa, se reduce, y una cepa en la que las sustancias fisiológicamente activas, tales como antibióticos, se suprimen o se eliminan. Además, se pueden utilizar cepas genéticamente recombinantes.

[0017] Cuando se utiliza la tecnología de ADN recombinante (es decir, cuando se utiliza una cepa genéticamente recombinante), es posible obtener un TGasa estabilizada en la que el origen de péptido pro-secuencia y el origen de la TGasa madura son diferentes entre sí. Preferiblemente, sin embargo, el origen del péptido pro-secuencia y el origen de la TGasa madura son los mismos entre sí. La TGasa estabilizada en dicha forma se obtiene como una forma intermedia habitualmente mediante el cultivo de una cepa productora de transglutaminasa (una cepa que tiene originalmente una capacidad de producción o una cepa recombinante en la que se introduce un gen de la transglutaminasa). En lo sucesivo, se describe un ejemplo del procedimiento de producción de la TGasa estabilizada en dicha forma.

(Procedimiento de producción de la TGasa estabilizada)

[0018] En primer lugar, se prepara un microorganismo del género *Streptomyces* que tiene una capacidad de producción de transglutaminasa (por ejemplo, *Streptomyces mobaraensis*, cepa No. 140226) y se cultiva bajo las condiciones en las que una transglutaminasa se pueden producir. Las condiciones de cultivo no están particularmente limitadas, siempre y cuando se pueda producir una transglutaminasa. Los ejemplos específicos de la condición de cultivo se describen en los Ejemplos mencionados a continuación. Una persona experta en la materia puede cambiar apropiadamente las condiciones de cultivo.

[0019] Entre los ejemplos de un medio se incluyen materiales de medios utilizados habitualmente incluyendo una fuente de carbono, tal como almidón, sacarosa, lactosa, glicerol, y glucosa; una fuente de nitrógeno, tal como peptona, extractos de carne, extractos de levadura, licor de maíz fermentado, nitrato de amonio, cloruro de amonio, y sulfato de amonio; y una pequeña cantidad de sales de metal de, por ejemplo, fosfato de potasio monobásico, fosfato de potasio dibásico, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso y carbonato de calcio. Además, con el fin de suprimir la formación de espuma, se pueden añadir agentes antiespumantes si es necesario. La temperatura de cultivo está generalmente en el intervalo de 25°C a 35°C. Además, el cultivo puede llevarse a cabo mediante el uso de varios recipientes de fermentación. Generalmente, la agitación con aireación se lleva a cabo en dos a seis días. Dependiendo de los tipos de cepas y medios de fermentación que se utilizan, el cultivo no se lleva a cabo necesariamente en estas condiciones. Por ejemplo, cuando se lleva a cabo la alimentación de materiales del medio, o está contenido un material del medio con alta concentración, por lo general, el tiempo de cultivo puede aumentar aún más. Además, se controla el pH del medio, si es necesario.

[0020] Después de completar el cultivo, se extrae un cuerpo celular y similares de una mezcla de fermentación mediante filtración o centrifugación. Como filtración, se prefiere la filtración de presurización con tierra de diatomeas añadida. Además, es preferible que la filtración se lleve a cabo a una temperatura no superior a la temperatura ambiente. El filtrado obtenido, es decir, una solución de enzima en bruto de la transglutaminasa se enfría si es necesario. Cabe indicar aquí que tal como se describe en Eur. J. Biochem., 257, 570-576 (1998), se conoce que la transglutaminasa se produce como un precursor. Por lo tanto, con el fin de convertir la transglutaminasa en la TGasa estabilizada, puede tratarse una mezcla de fermentación mediante la adición de una enzima, tal como proteasa y peptidasa, durante un cierto período de tiempo. Además, algunas transglutaminasas son conocidas por estar presentes como una enzima de oxidación sin tener una actividad enzimática. Por lo tanto, también es deseable que dichas transglutaminasas se conviertan en una enzima activa mediante la adición de una enzima, tal como cisteína y glutatión, o sustancias que las contengan. Dichas operaciones de activación no se llevan a cabo necesariamente solamente en el procedimiento de purificación, sino preferiblemente se llevan a cabo en la etapa temprana de purificación.

[0021] La solución de enzima en bruto se concentra si es necesario. El procedimiento de concentración no está particularmente limitado, pero se prefiere la ultrafiltración capaz de llevar a cabo la concentración y la purificación simultáneamente. En general, la solución de enzima en bruto se puede concentrar hasta aproximadamente de 10 veces a 100 veces. El grado de concentración no está particularmente limitado, siempre y cuando la solución se concentre hasta una concentración tal que el siguiente procedimiento puede llevarse a cabo. Como membrana de ultrafiltración, teniendo en cuenta el peso molecular de la TGasa (aproximadamente 38.000), se prefiere una membrana de ultrafiltración que tiene un tamaño de poro medio con un peso molecular de corte de 13.000. Por ejemplo, se usa preferiblemente ACP-13000 (Asahi Kasei Corporation). Sin embargo, incluso si se utiliza una membrana que tiene un tamaño de poro medio con un peso molecular de corte de 50.000, apenas se escapa una enzima. Por lo tanto, mediante la selección de membranas, según sea necesario, el grado de purificación puede aumentarse. Aunque se pueden generar precipitados durante la desalinización y la concentración, dichos precipitados se pueden disolver mediante la adición de una solución tampón o una solución de sal apropiados. Además, la temperatura en el momento de la concentración no está particularmente limitada, pero la temperatura está preferiblemente en el intervalo de 10°C a 30°C. A medida que la temperatura es más alta, la concentración puede llevarse a cabo de manera más eficiente. Por el contrario, se puede producir la inactivación.

[0022] La solución concentrada incluye la TGasa estabilizada diana (TGasa madura a la que está unida el péptido pro-secuencia) y la TGasa madura. A continuación, la TGasa estabilizada diana se recupera de la solución concentrada. En lo sucesivo, se describe un ejemplo de la recuperación de la TGasa estabilizada. En primer lugar, con el fin de extraer la proteína contaminada, y similares, la solución concentrada se purifica parcialmente mediante pretratamiento usando etanol, polietilenglicol, y similares. Los precipitados recuperados mediante el pretratamiento

se disuelven en una solución tampón apropiada y, a continuación, la solución se somete a diálisis. Después de la diálisis, se lleva a cabo la precipitación salina mediante la adición de sales, tales como sulfato de amonio y cloruro de sodio. De este modo, precipita la TGasa madura. Después de recuperar el sobrenadante, la TGasa estabilizada en el sobrenadante se separa y se purifica mediante el uso de precipitación salina, cromatografía en columna, centrifugación, y similares. Si es necesario, se lleva a cabo una desalinización, concentración, o similares.

(Preparación de enzima que contiene TGasa estabilizada)

[0023] Puede producirse una preparación de enzima mediante el uso de TGasa estabilizada. La forma de la preparación de enzima no está particularmente limitada. Entre los ejemplos de la forma se incluyen polvo, gránulo, líquido, cápsula y similares. La presente solicitud describe una preparación enzimática que contiene TGasa estabilizada como componente activo esencial. Los otros componentes se añaden de forma arbitraria. Entre los ejemplos de componentes que pueden estar contenidos en la preparación de enzima se incluyen excipiente de alimentos, diversas proteínas, diversos productos de degradación de proteínas, diversos extractos, diversas sales, diversos antioxidantes, cisteína, glutatión, glutamato sódico, inosinato de sodio, guanilato de sodio, calcio calcinado shell y dióxido de silicio. Cabe indicar aquí que los ejemplos del excipiente de alimentos incluyen dextrina, dextrina ramificada, ciclodextrina, glucosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, maltitol, manitol, sorbitol, polisacárido, almidón (almidón de patata, almidón de maíz y similares), dextrina indigestible, resinas, agentes emulsionantes (éster de ácido graso de sacarosa, lecitina y similares), pectina, y grasas y aceites. Entre los ejemplos de la proteína se incluyen la proteína de soja, proteína de trigo, proteína de maíz, proteína de la leche, proteínas de origen animal y similares. Entre los ejemplos de los extractos se incluyen extractos de carne, extractos de plantas, extractos de levadura y similares. Entre los ejemplos de las sales se incluyen sal de cloruro, fosfato, polifosfato, pirofosfato, citrato, lactato, carbonato y similares. Entre los ejemplos del antioxidante se incluyen L-ascorbato, hidrogenosulfito de sodio y similares.

[Ejemplo]

1. Purificación de la TGasa estabilizada

[0024] Se utilizó un medio que incluía 2% de almidón soluble, 5% de sacarosa, 2% de polipeptona, 0,2% extracto de levadura, 0,1% de sulfato de magnesio, 0,2% de fosfato de potasio dibásico y 0,05% Adecanol. Se cultivó *Streptomyces mobaraensis*, cepa No.140226, como cepa productora de transglutaminasa (véase la patente japonesa no examinada de No. de publicación 2005-73628) mediante agitación a 30°C durante dos días para obtener 4000 ml de solución de enzima en bruto. A menos que se indique específicamente, % significa % en peso (esto es cierto para cada Ejemplo que se menciona a continuación).

[0025] A continuación, la solución de enzima en bruto se sometió a desalinización y concentración utilizando una membrana de ultrafiltración (ACP1010, Asahi Kasei Corporation) para obtener 200 ml de solución concentrada. Se añadió solución tampón de McIlvaine (pH 6,0) y se mezcló a la solución concentrada de modo que la concentración final se convirtió en 1/10, seguido del fraccionamiento con etanol frío al 50%. Los precipitados recuperados se disolvieron en solución tampón de McIlvaine a una concentración 1/10 (pH 6,0) que contenía cloruro de sodio 0,1 M y, a continuación, la solución se sometió a diálisis. A continuación, se añadió cloruro de sodio al dializado hasta que se consiguió la concentración de una solución saturada, se dejó reposar a una temperatura baja durante tres días y, a continuación, se recuperó el sobrenadante. Los precipitados fueron cristales de TGasa madura (M-TGasa). Cuando los precipitados se sometieron a recristalización con una solución salina saturada, se obtuvo la enzima M-TGasa purificada. La actividad específica de la enzima M-TGasa purificada (u/Abs 280 nm) fue de 19,1. Cabe indicar aquí que la secuencia de aminoácidos de la M-TGasa se muestra en SEQ ID NO: 6.

[0026] Por otra parte, se añadió sulfato de amonio al sobrenadante recuperado hasta que se alcanzó la concentración de una solución saturada, y se recuperaron los precipitados. Los precipitados recuperados se disolvieron en solución de tampón fosfato 20 mM (KPB; pH 7,2), y a continuación se dializaron frente a la misma solución tampón. A continuación, se añadió sulfato de amonio al dializado de modo que se obtuvo sulfato de amonio 1,7 M, que se sometió a Fenil-Sepharose 6 Fast Flow equilibrada con solución de tampón fosfato 20 mM (KPB; pH 7,2) que contenía sulfato de amonio 1,7 M, se lavó con sulfato de amonio 1,7 M y se eluyó con sulfato de amonio 1,0 M. De este modo, la TGasa estabilizada diana (P-TGasa) se eluyó en la fracción eluida. La actividad específica de la P-TGasa obtenida de este modo (u/Abs 280 nm) fue de 7,9. Los patrones de elución de la filtración en gel (Sephacryl S-100) se comparó entre el caso en el que se añadió SDS (dodecil sulfato de sodio) y el caso en el que no se añadió SDS. El resultado de la comparación mostró que la P-TGasa tenía una estructura en la que el péptido pro-secuencia estaba unido a TGasa madura.

[0027] La actividad de la transglutaminasa se midió de acuerdo con el procedimiento descrito en la patente japonesa no examinada de No. de publicación S64-27471. Es decir, la reacción se lleva a cabo mediante el uso de benciloxicarbonil-L-glutaminil-glicina e hidroxilamina como un sustrato en ausencia de Ca^{2+} , se forma ácido hidroxámico generado en un complejo de hierro bajo la coexistencia de ácido tricloroacético. Posteriormente, se mide la absorbancia a 525 nm, se obtiene una cantidad de ácido hidroxámico a partir de una curva de calibración y se calcula la actividad de la transglutaminasa. En lo sucesivo, se describe en detalle del procedimiento de medición.

En primer lugar, se preparan los siguientes reactivos A y B.

Reactivo A: solución tampón ácido Tris-HCl 0,2 M (pH 6,0), hidroxilamina 0,1 M, glutatión reducido 0,01 M, benciloxycarbonil-L-glutaminil-glicina 0,03 M

Reactivo B: solución de mezcla 1:1:1 de ácido clorhídrico 3 N, ácido tricloroacético al 12%, FeCl₃ 3-6H₂O (disuelto en HCl 0,1 N).

[0028] Se añade el reactivo A (0,5 ml) a 0,05 ml de solución de enzima, y se mezcla. La mezcla se hace reaccionar a 37°C durante 10 minutos. Se añade el reactivo B a la reacción con el fin de detener la reacción y formar un complejo de Fe. Por lo tanto, se mide la absorbancia a 525 nm. Se prepara un control mediante la misma reacción mediante el uso de una solución de enzima inactivada por calor y se mide la absorbancia del control. Se calcula la diferencia de absorbancia entre la solución de enzima y el control. Además, en lugar de la solución de enzima, se utiliza ácido L-glutámico-ácido γ -monohidroxámico a fin de formar una curva de calibración, y la cantidad del ácido hidroxámico generado a partir de la diferencia de absorbancia. La actividad enzimática para la generación de 1 μ mol de ácido hidroxámico durante un minuto se define como una unidad. A menos que se indique lo contrario, la actividad de la transglutaminasa se mide mediante el mismo procedimiento de medición en los siguientes ensayos.

2. Purificación del péptido pro-secuencia

[0029] Se añadió carbonato de sodio (5,0 mg) y se disolvió en 1,8 ml de solución de P-TGasa obtenida en el punto anterior "1", y se mezclaron a la misma 0,2 ml de una solución al 10% (p/v) de SDS (dodecil sulfato de sodio), y la mezcla se trató a 37°C durante 30 minutos. La solución de tratamiento (2,0 ml) se sometió a Sephacryl S-100 (volumen de la columna: 160 ml) equilibrada con KPB 20 mM (pH 7,2) que contenía SDS al 0,1%. La absorbancia a 280 nm se controló para recuperar picos hallados alrededor de los 123 ml de la cantidad de fase móvil. La solución recuperada se concentró por centrifugación usando Amicon Ultra (Ultracel-5K) a 4°C. La solución concentrada obtenida (muestra) se sometió a análisis de la secuencia de aminoácidos N-terminal y espectrometría de masas. A partir del resultado del análisis de secuencia de aminoácidos N-terminal, estaba claro que el extremo N terminal del péptido fue DNGAGEETKS. Por otra parte, como resultado de la espectrometría de masas, se observaron cinco picos, m/z (1) 3623,938, (2) 3640,903, (3) 3710,780, (4) 3727,845, y (5) 3813,735. Se pensó que el (1) y (3) eran productos de desamidación de (2) y (4). A partir de los resultados del análisis de la secuencia de aminoácidos N-terminal y la espectrometría de masas, se identificaron que las secuencias de aminoácidos de los otros tres picos eran:

(1) DNGAGEETKSYAETYRLTADDVANINALNESAPAA (SEQ ID NO: 1),
(2) DNGAGEETKSYAETYRLTADDVANINALNESAPAAS (SEQ ID NO: 2), y
(3) DNGAGEETKSYAETYRLTADDVANINALNESAPAASS (SEQ ID NO: 3).

[0030] Cabe indicar aquí que estas secuencias corresponden a una parte de la longitud total del péptido pro-secuencia (SEQ ID NO: 4).

3. Prueba de estabilidad 1 de P-TGasa

[0031] Se llevó a cabo la comparación de la estabilidad con el pH entre P-TGasa y M-TGasa. Cada diluyente de enzima se preparó usando una solución tampón de ácido cítrico-HCl con respecto a pH de 2 a 4 y solución tampón universal (Britton-Robinson) con respecto a pH de 4 a 11. Cada diluyente de enzima se trató a 50°C durante una hora, seguido por la medición de la actividad de transglutaminasa. Como resultado, la P-TGasa mostró un 93% de actividad restante incluso a pH 4, mientras que la actividad restante de M-TGasa bajo la misma condición fue del 2% (Figura 1). Por lo tanto, la P-TGasa mostró una alta estabilidad en la condición ácida.

[0032] Por otra parte, se llevó a cabo la comparación de la estabilidad con la temperatura entre P-TGasa y M-TGasa. Cada diluyente de enzima se preparó con solución tampón Tris-HCl 0,2 M (pH 6,0) y se trató térmicamente a cada temperatura, seguido de la medición de la actividad de transglutaminasa. Como resultado, la actividad restante en el tratamiento a 50°C durante 80 minutos fue del 33% en M-TGasa y del 64% en P-TGasa (Figura 2). De este modo, la P-TGasa mostró una mayor estabilidad térmica que la M-TGasa.

4. Prueba de estabilidad 2 de P-TGasa

[0033] Con el fin de evaluar la estabilidad a la oxidación en una solución (resistencia a la inactivación por oxidación), se llevó a cabo una prueba de inhibición (frente al peróxido de hidrógeno). Se diluyó apropiadamente peróxido de hidrógeno acuoso (reactivo, 30% (p/v)) con una solución tampón Tris-HCl 0,2 (pH 6,0), se añadió a una solución de enzima y se trató a 37°C durante 30 minutos. A continuación, se midieron las actividades de transglutaminasa. Cuando la concentración del tratamiento fue del 0,03% (p/v), la actividad restante fue del 3% para M-TGasa y del 54% para P-TGasa (Figura 3). De este modo, la P-TGasa mostró una alta estabilidad frente a la oxidación en una solución.

5. Prueba de estabilidad 3 de P-TGasa

[0034] Se evaluó la estabilidad en forma de polvo. P-TGasa y M-TGasa se liofilizaron en polvo. Al polvo de M-TGasa, se mezcló dextrina, de manera que la actividad de transglutaminasa por peso era la misma que la del polvo de P-TGasa. La temperatura de almacenamiento fue de 44°C. La actividad restante después de dos meses fue del 79% para M-TGasa, y por otra parte, del 85% para P-TGasa (Figura 4). De este modo, en el caso de un estado de polvo, la P-TGasa mostró una alta estabilidad.

6. Purificación de P-TGasa (cepa No.466 de *Streptomyces lavendulae*)

[0035] Se utilizó un medio que incluía 2% de almidón soluble, 5% de sacarosa, 2% de polipeptona, 0,2% extracto de levadura, 0,1% de sulfato de magnesio, 0,2% de fosfato de potasio dibásico, y 0,05% de Adecanol. Se cultivó la cepa No. 466 de *Streptomyces lavendulae* como una cepa productora de transglutaminasa (véase la Patente No. 2.849.773, la patente japonesa no examinada de No. de publicación H4-207194) por agitación a 30°C durante tres días para obtener 1500 ml de solución de enzima en bruto.

[0036] A continuación, la solución de enzima en bruto se concentró utilizando una membrana de ultrafiltración (ACP1010, Asahi Kasei Corporation) y se obtuvieron 300 ml de solución concentrada. La solución concentrada se precipitó con 80% de solución saturada de sulfato de amonio, se recuperaron los precipitados. Los precipitados recuperados se disolvieron en solución de tampón de fosfato 20 mM (KPB; pH 7,2), y se dializaron adicionalmente frente a la misma solución tampón. Las materias insolubles se extrajeron de la muestra dializada y el sobrenadante se sometió de manera similar a Blue-Sepharose 6 Fast Flow equilibrada con solución de tampón fosfato 20 mM (KPB; pH 7,2). La fracción de lavado en la solución tampón se recuperó y se dializó frente a solución de tampón fosfato 20 mM (KPB; pH 6,8) que contenía sulfato de amonio 1,7 M. Las muestras dializadas se sometieron de manera similar a Fenil-Sepharose 6 Fast Flow equilibrada con solución de tampón de fosfato 20 mM (KPB; pH 6,8) que contenía sulfato de amonio 1,7 M. La muestra se lavó con la misma solución tampón y se eluyó usando un gradiente de concentración lineal de 1,7 - 0 M de sulfato de amonio. La P-TGasa se eluyó a la concentración de sulfato de amonio alrededor de 1,0 M. Además, la M-TGasa se eluyó a una concentración de sulfato de amonio alrededor de 0,8 M.

7. Prueba de estabilidad 1 de P-TGasa (cepa No.466 de *Streptomyces lavendulae*)

[0037] Se llevó a cabo la comparación de la estabilidad con la temperatura entre P-TGasa y M-TGasa. Cada diluyente de enzima se preparó con una solución de tampón Tris-HCl 0,2 M (pH 6,0) y se trató térmicamente a cada temperatura. A continuación, se midió cada actividad de transglutaminasa. Como resultado, cuando se lleva a cabo el tratamiento a 50°C durante 20 minutos, la actividad restante fue del 12% para M-TGasa y, por otra parte, del 29% para P-TGasa (Figura 5). De este modo, la P-TGasa derivada de la cepa No. 466 de *Streptomyces lavendulae* mostró una mayor estabilidad térmica que la de M-TGasa derivada de la misma cepa.

8. Prueba de estabilidad 2 de P-TGasa (cepa No.466 de *Streptomyces lavendulae*)

[0038] Con el fin de evaluar la estabilidad a la oxidación en una solución (resistencia a la inactivación por oxidación), se llevó a cabo una prueba de inhibición (frente a peróxido de hidrógeno). Se diluyó apropiadamente peróxido de hidrógeno acuoso (reactivo, 30% (p/v)) con una solución tampón Tris-HCl 0,2 (pH 6,0) y la solución diluida se añadió a una solución de enzima y se trató a 37°C durante 15 minutos. A continuación, se midieron las actividades de transglutaminasa. Cuando la concentración del tratamiento fue del 0,06% (p/v), la actividad restante fue del 35% para M-TGasa y del 62% para P-TGasa (Figura 6). De este modo, la P-TGasa derivada de la cepa No. 466 de *Streptomyces lavendulae* mostró una alta estabilidad frente a la oxidación en una solución.

9. Preparación de pro-transglutaminasa

[0039] Se utilizó un medio que incluía 2% de almidón soluble, 5% de sacarosa, 2% de polipeptona, 0,2% extractos de levadura, 0,1% de sulfato de magnesio, 0,2% de fosfato de potasio dibásico, y 0,05% de Adecanol. Se cultivó la cepa No. 140226 de *Streptomyces mobaraensis* como una cepa productora de transglutaminasa (véase la patente japonesa no examinada de No. de publicación 2005-73628) por agitación a 30°C durante dos días para obtener 1500 ml de solución de enzima en bruto. A continuación, la solución de enzima en bruto se concentró utilizando una membrana de ultrafiltración (ACP1010, Asahi Kasei Corporation) para obtener 150 ml de solución concentrada. La solución concentrada se purificó de acuerdo con el procedimiento basado en la información del documento (Eur. J. Biochem., 257, 570-576 (1998)) y se obtuvo de este modo la pro-transglutaminasa.

10. Preparación de P-TGasa (conversión de pro-transglutaminasa mediante el tratamiento con proteasas)

[0040] Se sometió a diálisis una solución de pro-transglutaminasa frente a solución tampón Hepes 50 mM (pH 7,4) que contenía cloruro de sodio 150 mM para obtener la muestra de diálisis (Abs. 280 nm = 1,8). Se añadió dispasa II (Roche) a la muestra de diálisis, de manera que la concentración final de la solución tratada fue de 0,08 u/ml y se trató a 30°C durante 60 minutos. De este modo, se preparó la P-TGasa. La reacción se detuvo mediante la dilución de la solución de reacción con una solución tampón Tris-HCl 0,2 M (pH 6,0) que contenía EDTA 5 mM a la concentración de trabajo descrita en el siguiente punto "11." Por otra parte, similar a P-TGasa, como la M-TGasa que se utilizará en el siguiente punto "11", se utilizó una muestra que había sido tratada con dispasa II.

11. Prueba de estabilidad de P-TGasa (producto tratado con proteasa)

[0041] Se llevó a cabo la comparación de la estabilidad con la temperatura entre P-TGasa y M-TGasa. Cada diluyente de enzima se preparó con solución tampón Tris-HCl 0,2 M (pH 6,0) y se trató térmicamente a cada temperatura. Se midió la actividad de cada transglutaminasa. Como resultado, cuando el tratamiento se llevó a cabo a 50°C durante 60 minutos, la actividad restante fue del 41% para M-TGasa y, por otra parte, del 76% para P-TGasa (Figura 7). De este modo, la P-TGasa obtenida mediante el tratamiento con proteasa también mostró una mayor estabilidad térmica que la de M-TGasa. En consecuencia, se pensó que la P-TGasa del punto anterior "10" obtenido por tratamiento con proteasa era la misma sustancia que P-TGasa en el punto anterior "1"

[Aplicabilidad industrial]

[0042] Una transglutaminasa estabilizada de la presente invención tiene una estabilidad con el pH, estabilidad con la temperatura, y similares más excelentes, en comparación con una transglutaminasa madura. La transglutaminasa estabilizada de la presente invención se puede utilizar en la unión de carne, y en la fabricación de salchichas, tofu, pan y fideos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AMANO ENZYME INC.
OKADA, Masamichi
KURONO, Yoshiaki
AMANO, Hitoshi
YAMAGUCHI, Shotaro

<120> TRANSGLUTAMINASA ESTABLE Y PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE LA MISMA

<130> P07111P

<150> JP P2008-32252
<151> 2008-02-13

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 35
<212> PRT
<213> Streptomyces mobaraensis

<400> 1

Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg
1 5 10 15

Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala
20 25 30

Pro Ala Ala
35

<210> 2
<211> 36
<212> PRT
<213> Streptomyces mobaraensis

<400> 2

Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg
1 5 10 15

ES 2 616 020 T3

Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala
 20 25 30

5 Pro Ala Ala Ser
 35

10 <210> 3
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Streptomyces mobaraensis
 <400> 3

15 Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg
 1 5 10 15

20 Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala
 20 25 30

25 Pro Ala Ala Ser Ser
 35

30 <210> 4
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Streptomyces mobaraensis
 <400> 4

35 Asp Asn Gly Ala Gly Glu Glu Thr Lys Ser Tyr Ala Glu Thr Tyr Arg
 1 5 10 15

40 Leu Thr Ala Asp Asp Val Ala Asn Ile Asn Ala Leu Asn Glu Ser Ala
 20 25 30

45 Pro Ala Ala Ser Ser Ala Gly Pro Ser Phe Arg Ala Pro
 35 40 45

50 <210> 5
 <211> 54
 <212> PRT
 <213> Streptomyces cinnamoneus
 <400> 5

55 Gly Asp Gly Glu Glu Lys Gly Ser Tyr Ala Glu Thr His Gly Leu Thr
 1 5 10 15

60 Ala Asp Asp Val Glu Ser Ile Asn Ala Leu Asn Glu Arg Ala Leu Thr
 20 25 30

65 Leu Gly Gln Pro Gly Lys Pro Pro Lys Glu Leu Pro Pro Ser Ala Ser
 35 40 45

Ala Pro Ser Arg Ala Pro
 50

ES 2 616 020 T3

<210> 6
 <211> 331
 <212> PRT
 5 <213> Streptomyces mobaraensis
 <400> 6
 10 Asp Ser Asp Asp Arg Val Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met
 1 5 10 15
 15 Pro Asp Pro Tyr Arg Pro Ser Tyr Gly Arg Ala Glu Thr Val Val Asn
 20 20 25 30
 20 Asn Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Arg
 35 40 45
 25 Lys Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Trp Leu Ser Tyr Gly Cys
 50 55 60
 30 Val Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Gln Tyr Pro Thr Asn Arg Leu
 65 70 75 80
 35 Ala Phe Ala Ser Phe Asp Glu Asp Arg Phe Lys Asn Glu Leu Lys Asn
 85 90 95
 40 Gly Arg Pro Arg Ser Gly Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Val
 100 105 110
 45 Ala Lys Glu Ser Phe Asp Glu Glu Lys Gly Phe Gln Arg Ala Arg Glu
 115 120 125
 50 Val Ala Ser Val Met Asn Arg Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Ser
 130 135 140
 55 Ala Tyr Leu Asp Asn Leu Lys Lys Glu Leu Ala Asn Gly Asn Asp Ala
 145 150 155 160
 60 Leu Arg Asn Glu Asp Ala Arg Ser Pro Phe Tyr Ser Ala Leu Arg Asn
 165 170 175
 65 Thr Pro Ser Phe Lys Glu Arg Asn Gly Gly Asn His Asp Pro Ser Arg
 180 185 190
 70 Met Lys Ala Val Ile Tyr Ser Lys His Phe Trp Ser Gly Gln Asp Arg
 195 200 205
 75 Ser Ser Ser Ala Asp Lys Arg Lys Tyr Gly Asp Pro Asp Ala Phe Arg
 210 215 220
 80 Pro Ala Pro Gly Thr Gly Leu Val Asp Met Ser Arg Asp Arg Asn Ile
 225 230 235 240

ES 2 616 020 T3

Pro Arg Ser Pro Thr Ser Pro Gly Glu Gly Phe Val Asn Phe Asp Tyr
245 250 255

5 Gly Trp Phe Gly Ala Gln Thr Glu Ala Asp Ala Asp Lys Thr Val Trp
260 265 270

10 Thr His Gly Asn His Tyr His Ala Pro Asn Gly Ser Leu Gly Ala Met
275 280 285

15 His Val Tyr Glu Ser Lys Phe Arg Asn Trp Ser Glu Gly Tyr Ser Asp
290 295 300

20 Phe Asp Arg Gly Ala Tyr Val Ile Thr Phe Ile Pro Lys Ser Trp Asn
305 310 315 320

25 Thr Ala Pro Asp Lys Val Lys Gln Gly Trp Pro
325 330

30 <210> 7
<211> 330
<212> PRT
<213> Streptomyces cinnamoneus

35 Ser Asp Asp Arg Glu Thr Pro Pro Ala Glu Pro Leu Asp Arg Met Pro
1 5 10 15

40 Glu Ala Tyr Arg Ala Tyr Gly Gly Arg Ala Thr Thr Val Val Asn Asn
20 25 30

45 Tyr Ile Arg Lys Trp Gln Gln Val Tyr Ser His Arg Asp Gly Lys Lys
35 40 45

50 Gln Gln Met Thr Glu Glu Gln Arg Glu Lys Leu Ser Tyr Gly Cys Val
50 55 60

55 Gly Val Thr Trp Val Asn Ser Gly Pro Tyr Pro Thr Asn Arg Leu Ala
65 70 75 80

60 Phe Ala Ser Phe Asp Glu Asn Lys Tyr Lys Asn Asp Leu Lys Asn Thr
85 90 95

65 Ser Pro Arg Pro Asp Glu Thr Arg Ala Glu Phe Glu Gly Arg Ile Ala
100 105 110

70 Lys Gly Ser Phe Asp Glu Gly Lys Gly Phe Lys Arg Ala Arg Asp Val
115 120 125

75 Ala Ser Val Met Asn Lys Ala Leu Glu Asn Ala His Asp Glu Gly Thr
130 135 140

80 Tyr Ile Asn Asn Leu Lys Thr Glu Leu Thr Asn Asn Asn Asp Ala Leu

ES 2 616 020 T3

	145		150		155		160									
5	Leu	Arg	Glu	Asp	Ser 165	Arg	Ser	Asn	Phe	Tyr 170	Ser	Ala	Leu	Arg	Asn 175	Thr
10	Pro	Ser	Phe	Lys 180	Glu	Arg	Asp	Gly	Gly 185	Asn	Tyr	Asp	Pro	Ser 190	Lys	Met
15	Lys	Ala	Val 195	Ile	Tyr	Ser	Lys	His 200	Phe	Trp	Ser	Gly	Gln 205	Asp	Gln	Arg
20	Gly	Ser 210	Ser	Asp	Lys	Arg	Lys 215	Tyr	Gly	Asp	Pro	Glu 220	Ala	Phe	Arg	Pro
25	Asp 225	Gln	Gly	Thr	Gly	Leu 230	Val	Asp	Met	Ser	Lys 235	Asp	Arg	Ser	Ile	Pro 240
30	Arg	Ser	Pro	Ala	Lys 245	Pro	Gly	Glu	Gly	Trp 250	Val	Asn	Phe	Asp	Tyr 255	Gly
35	Trp	Phe	Gly	Ala 260	Gln	Thr	Glu	Ala	Asp 265	Ala	Asp	Lys	Thr	Thr 270	Trp	Thr
40	His	Gly	Asp 275	His	Tyr	His	Ala	Pro 280	Asn	Ser	Asp	Leu	Gly 285	Pro	Met	His
45	Val 290	His	Glu	Ser	Lys	Phe	Arg 295	Lys	Trp	Ser	Ala	Gly 300	Tyr	Ala	Asp	Phe
50	Asp 305	Arg	Gly	Ala	Tyr	Val 310	Ile	Thr	Phe	Ile	Pro 315	Lys	Ser	Trp	Asn	Thr 320
55	Ala	Pro	Ala	Lys	Val 325	Glu	Gln	Gly	Trp	Pro 330						

REIVINDICACIONES

1. Transglutaminasa estabilizada, que comprende un péptido pro-secuencia de la transglutaminasa y una transglutaminasa madura, en la que el péptido pro-secuencia de la transglutaminasa está unido a la transglutaminasa madura y la transglutaminasa estabilizada tiene una estabilidad superior a la transglutaminasa madura a la que no está unido el péptido pro-secuencia, y la estabilidad es al menos una estabilidad seleccionada del grupo que consiste en la estabilidad con el pH, estabilidad con la temperatura, la estabilidad frente a la oxidación y la estabilidad con el almacenamiento.
2. Transglutaminasa estabilizada, según la reivindicación 1, en la que la transglutaminasa madura deriva de un microorganismo.
3. Transglutaminasa estabilizada, según la reivindicación 2, en la que el microorganismo es un microorganismo del género *Streptomyces*.
4. Transglutaminasa estabilizada, según la reivindicación 2, en la que el microorganismo es *Streptomyces mobaraensis*.
5. Transglutaminasa estabilizada, según la reivindicación 1, en la que la transglutaminasa madura incluye una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 6.
6. Transglutaminasa estabilizada, según la reivindicación 1, en la que el péptido pro-secuencia deriva de un microorganismo.
7. Transglutaminasa estabilizada, según la reivindicación 6, en la que el microorganismo es un microorganismo del género *Streptomyces*.
8. Transglutaminasa estabilizada, según la reivindicación 6, en la que el microorganismo es *Streptomyces mobaraensis*.
9. Transglutaminasa estabilizada, según la reivindicación 1, en la que el péptido pro-secuencia incluye cualquier secuencia de las siguientes (1) a (3):
(1) DNGAGEETKSYAETYRLTADDVANINALNESAPAA (SEQ ID NO: 1);
(2) DNGAGEETKSYAETYRLTADDVANINALNESAPAAS (SEQ ID NO: 2); y
(3) DNGAGEETKSYAETYRLTADDVANINALNESAPAASS (SEQ ID NO: 3).
10. Procedimiento para producir una transglutaminasa estabilizada, comprendiendo el procedimiento las etapas de: cultivar un microorganismo capaz de producir transglutaminasa en las condiciones en las que la transglutaminasa se puede producir; y separar y recuperar una transglutaminasa madura a la que el péptido pro-secuencia está unido de una solución de cultivo.
11. Procedimiento para producir una transglutaminasa estabilizada, según la reivindicación 10, en el que el microorganismo es un microorganismo del género *Streptomyces*.
12. Procedimiento para producir una transglutaminasa estabilizada, según la reivindicación 10, en el que el microorganismo es *Streptomyces mobaraensis*.
13. Utilización de la transglutaminasa estabilizada, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la unión de carne, la fabricación de salchichas, tofu, pan o fideos.

Figura 1

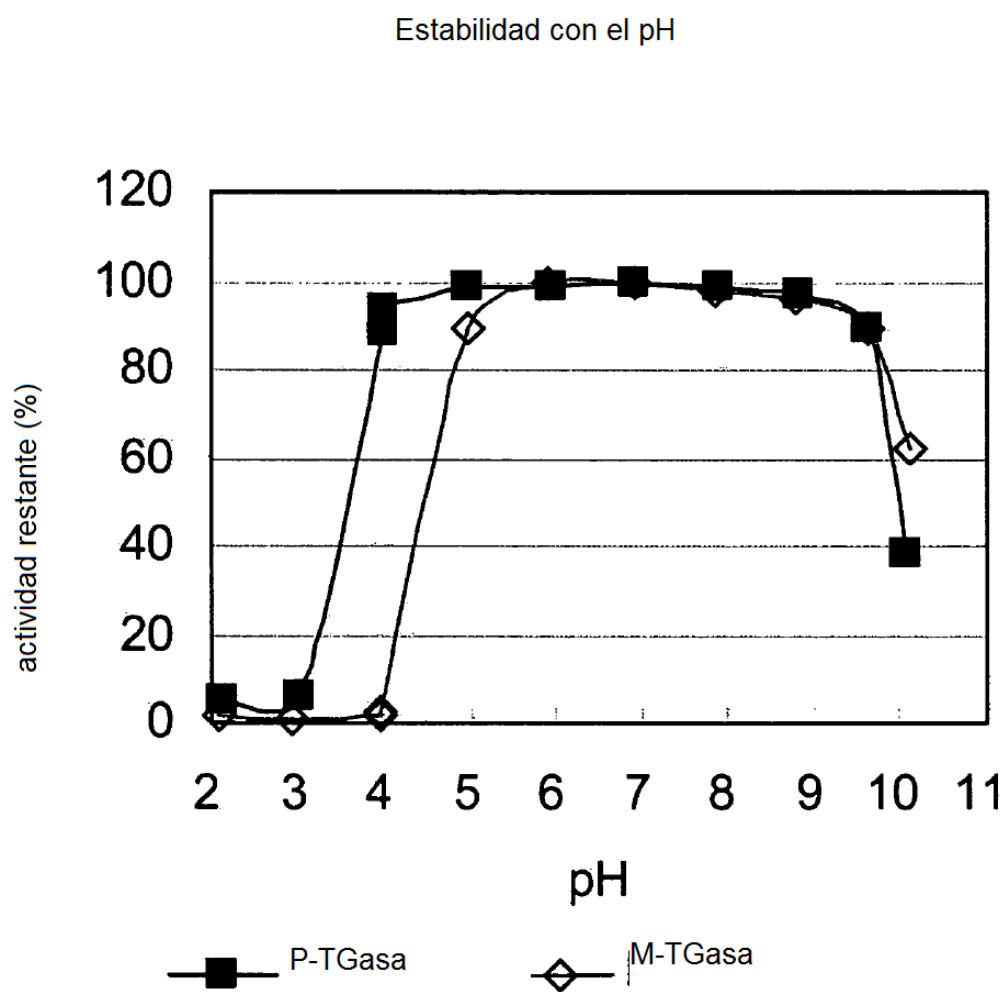


Figura 2

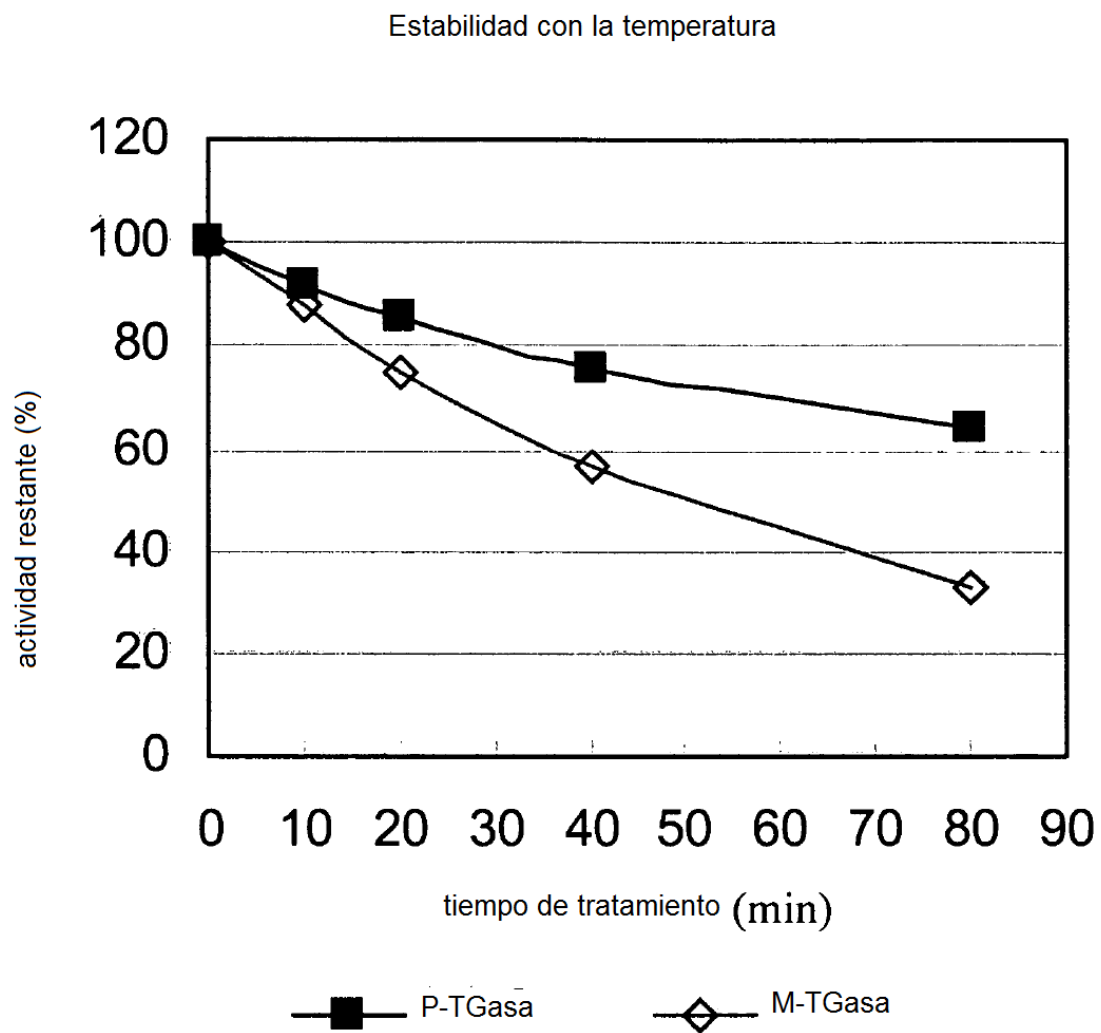


Figura 3

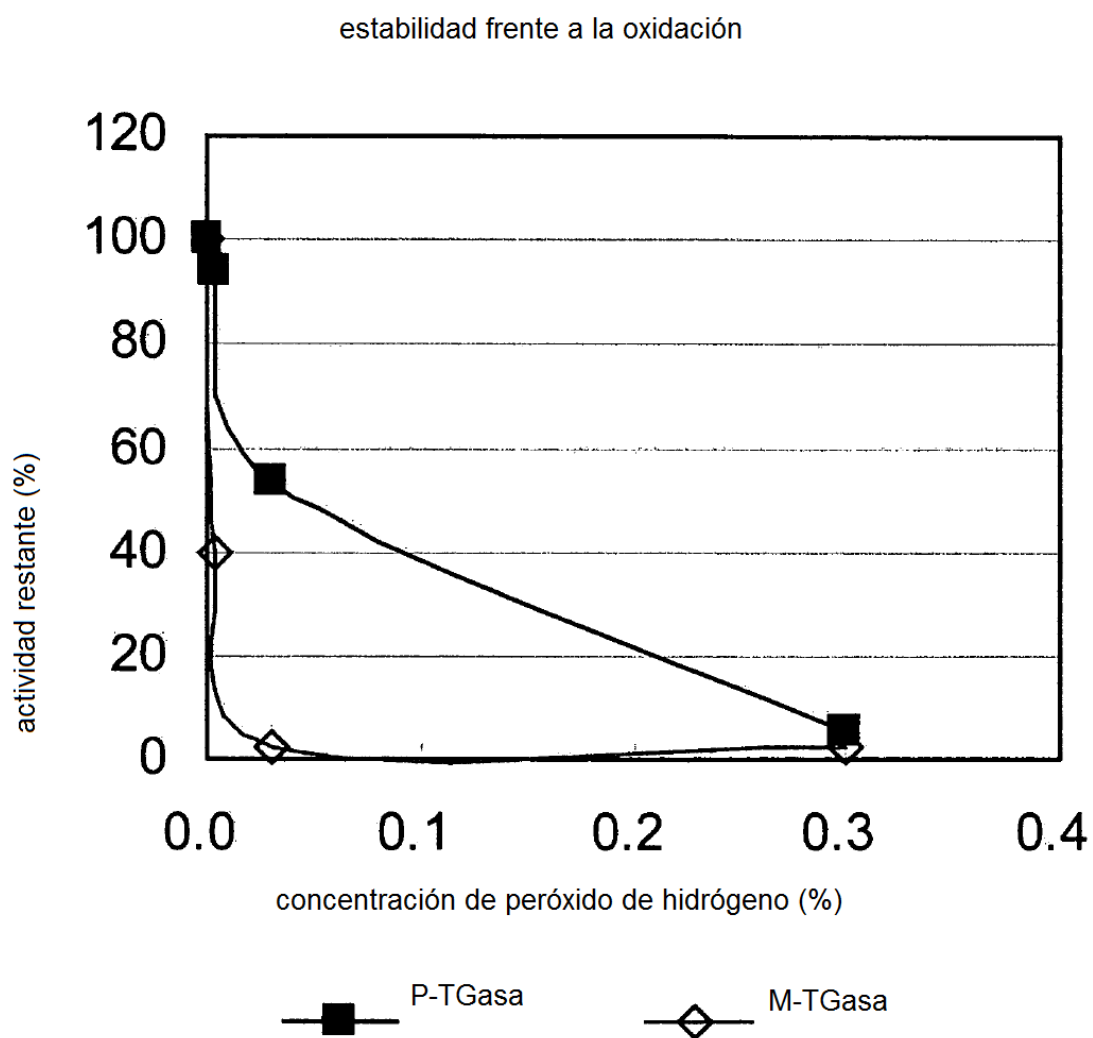


Figura 4

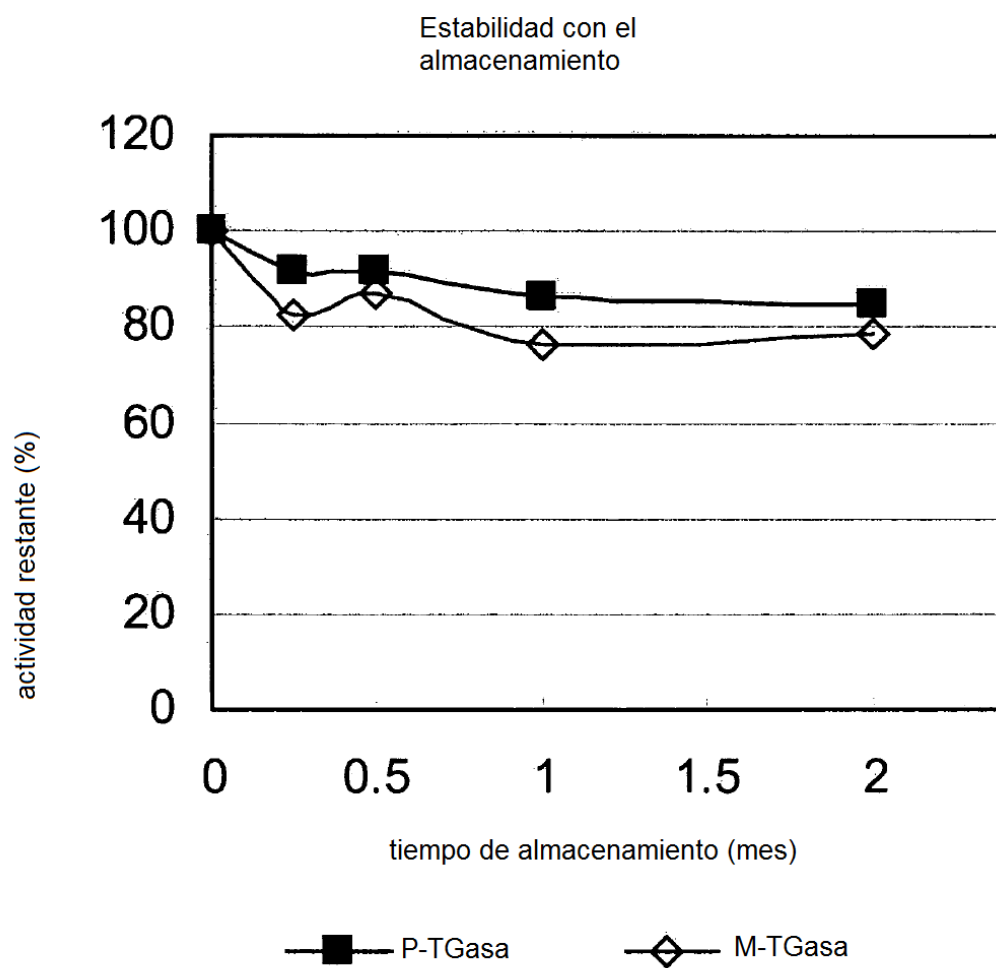


Figura 5

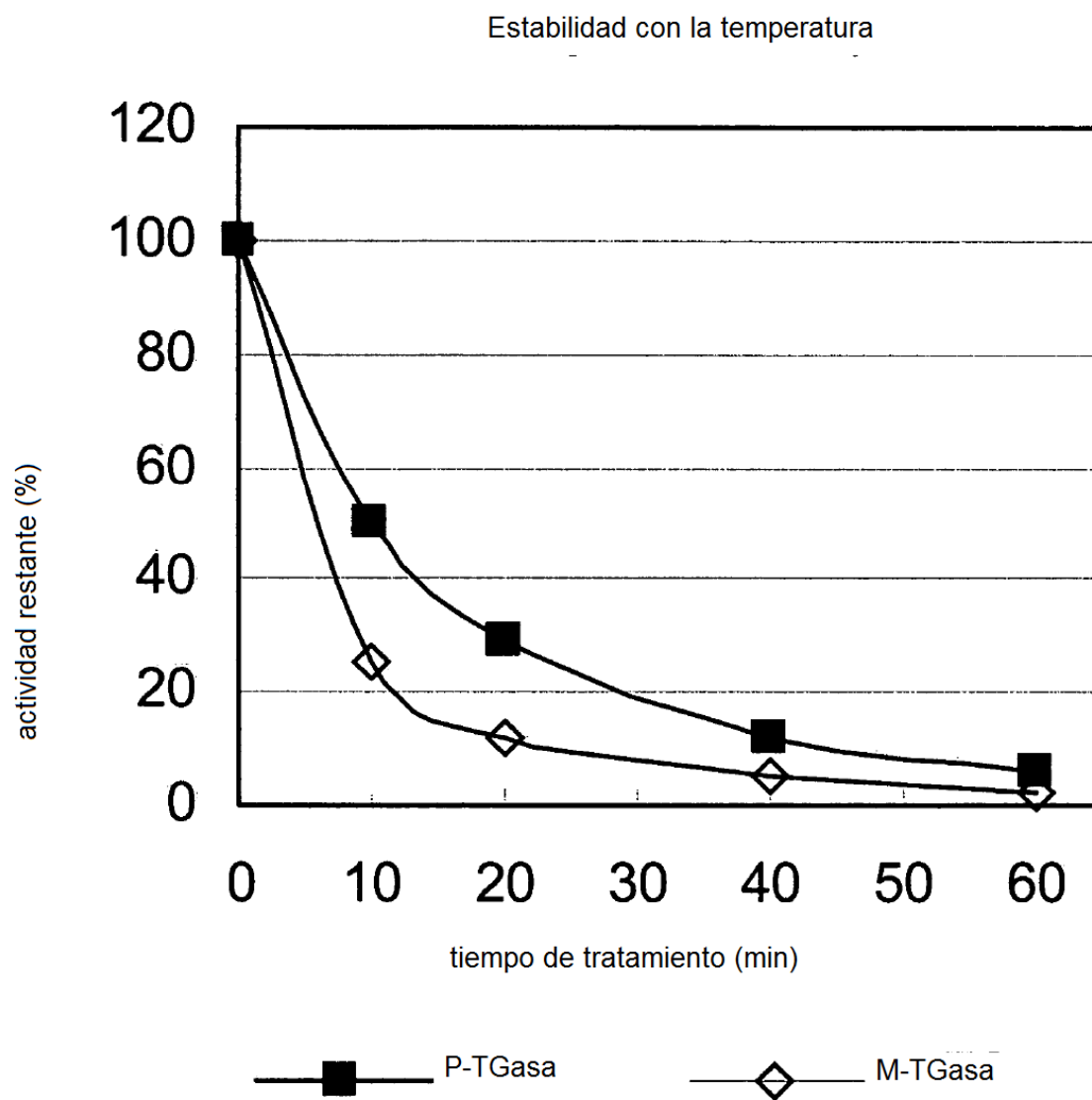


Figura 6

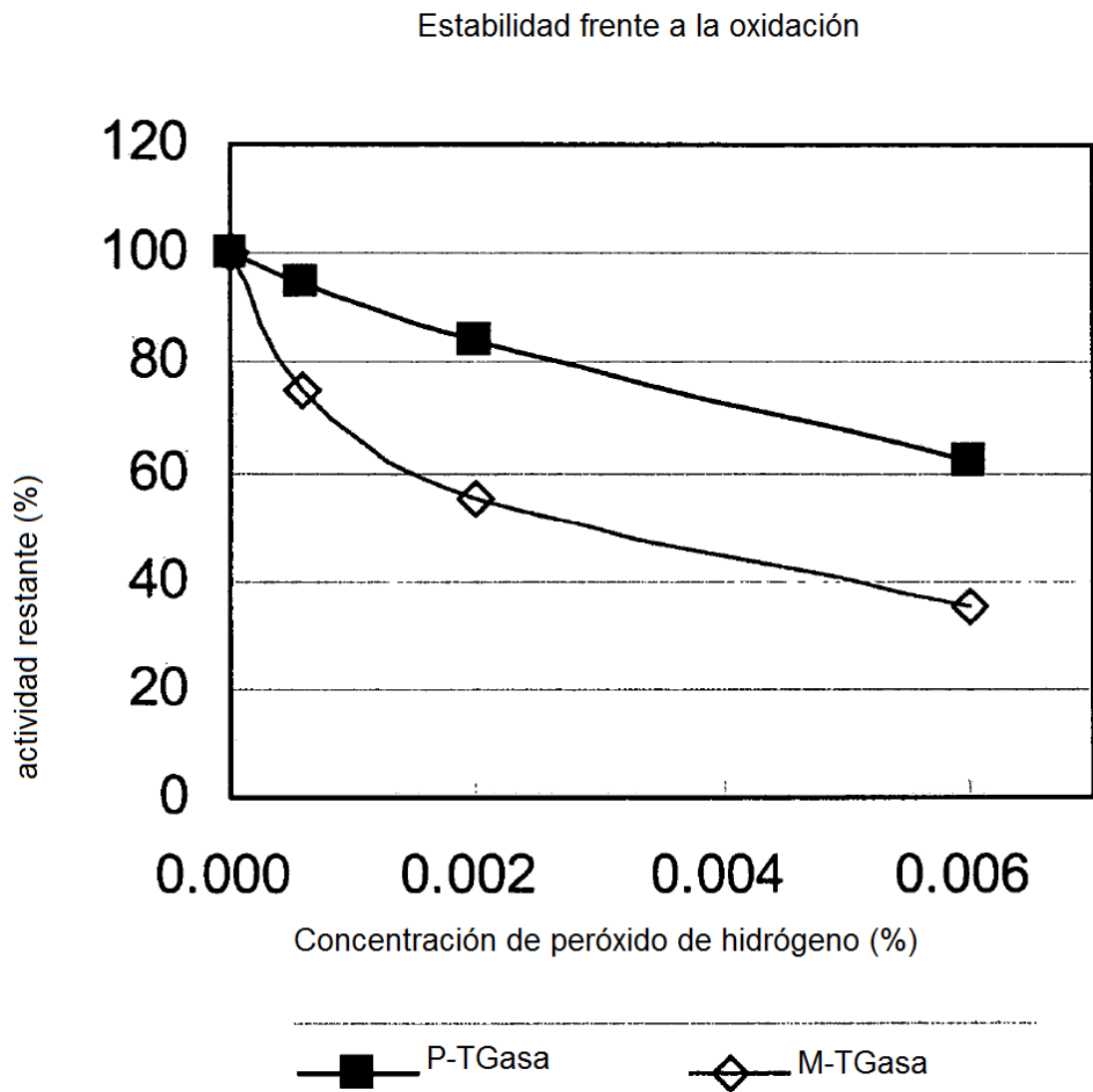


Figura 7

