

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 952**

51 Int. Cl.:

C12N 9/52 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

A61K 38/05 (2006.01)

A23K 20/147 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2009 PCT/EP2009/057382**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2009 WO2009150252**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2009 E 09761813 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017 EP 2283128**

54 Título: **Procedimiento de preparación de dipéptidos a partir de cianoficina empleando la CGPASA de Pseudomonas alcaligenes DIP1 CPHEAL aislada**

30 Prioridad:

13.06.2008 EP 08158205

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

27.06.2017

73 Titular/es:

**WESTFÄLISCHE WILHELMS-UNIVERSITÄT
MÜNSTER (100.0%)
Schlossplatz 2
48149 Münster, DE**

72 Inventor/es:

**SALLAM, AHMED y
STEINBÜCHEL, ALEXANDER**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 619 952 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

Procedimiento de preparación de dipéptidos a partir de cianoficina empleando la CGPASA de *Pseudomonas alcaligenes* DIP1 CPHEAL aislada

- 5 La presente invención se refiere a un proceso para la producción enzimática de una composición de dipéptido a partir de cianoficina (CGP) o de una preparación de polímero de tipo CGP por degradación de la preparación de polímero con una CGPasa y una CGPasa particularmente adaptada para dicho proceso.

Antecedentes de la invención

- 10 Se conocen tres poli(aminoácidos) diferentes de origen natural: poli(ϵ -L-lisina) (ϵ -PL), poli(γ -ácido glutámico) (γ -PGA) y cianoficina (CGP). Los poli(aminoácidos) están presentes en muchos entornos y satisfacen diferentes funciones para la producción de organismos ((Obst, M. y col., Biomacromolecules 5:1166-1176 (2004)). Por ejemplo, cianoficina (multi-L-arginil-poli-[L-ácido aspártico]), conocida también como proteína grana cianoficina (CGP por sus siglas en inglés), que fue descubierta en una cianobacteria hace más de 100 años (Borzi, A., Malpighia 1:28-74 (1887)) proporciona al organismo nitrógeno, carbono y energía. Contiene cinco átomos de nitrógeno en cada bloque de construcción y, por tanto, representa una reserva de nitrógeno intracelular ideal (Mackerras, A. H. y col., J. Gen. Microbiol. 136:2057-2065 (1990)). La biocompatibilidad y completa biodegradabilidad de los poliaminoácidos los convierten en candidatos ideales para muchas aplicaciones en la vida humana en los campos de biomedicina, agricultura, agroquímica, higiene personal y farmacia (Obst, M. y col., Biomacromolecules, 5:1166-1176 (2004)).

- 20 Se han promovido diversas especies de cianobacterias, incluyendo el alga verde azul *Espirulina* como fuentes de nutrición para seres humanos y animales (Kihlberg, R., A. Rev. Microbiol. 26:427-466 (1972)). La propia CGP se descubrió en 1887 en una cianobacteria. La mayoría de los géneros de cianobacterias albergan un gen cianoficina sintetasa funcional (*cphA*) y sintetizan CGP (Mackerras, A. H. y col., J. Gen. Microbiol. 136:2057-2065 (1990)). También se han identificado en bacterias heterotróficas genes que codifican CphA (Krehenbrink, M. y col., Arch. Microbiol. 177:371-380 (2002); Füser, G. y col., Macromol. Biosci. 7:278-296 (2007)). El polímero ramificado aparece en el citoplasma como gránulos carentes de membrana intracelular insolubles (Allen, M. M. y col., J. Bacteriol. 154:1480-1484 (1983)). Consiste en cantidades equimolares de arginina y aspartato dispuestas en forma de cadena principal de poli(ácido aspártico) (PAA), enlazándose las fracciones arginina con grupo β -carboxilo de cada ácido aspártico mediante su grupo α -amino (Simon, R. D. y col., Biochim. Biophys. Acta 420:165-176 (1976)). Para una producción a gran escala, se clonaron heterológamente genes *cphA* cianobacterianos en *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Ralstonia eutropha* y *Pseudomonas putida*. CGP de bacterias recombinantes contiene una pequeña cantidad de lisina (Voss, I. y col., Metabol. Eng. 8:66-78 (2006)). CGP está muy extendido en diferentes hábitats naturales y se degrada mediante CGPasas intracelulares o extracelulares (CpHB, CphE, respectivamente). Se han encontrado bacterias que procesan CphE en diferentes hábitats. Se han aislado y caracterizado CphEPA y CphEBm de *P. anguliseptica* BI y *B. megaterium* BAC19, respectivamente (Obst, M. y col., J. Biol. Chem. 277:25096-25105 (2002); Obst, M. y col., Biomacromolecules 5:153-161 (2004)). La degradación de CGP tiene lugar también en hábitats anaeróbicos mediante bacterias anaeróbicas estrictas o facultativas, tales como *Sedimentibacter hongkongensis* KI o *P. alcaligenes* DIP1, respectivamente (Obst, M. y col., Appl. Environ. Microbiol. 71:3642-3652 (2005); Sallam, A. y col., presentado para publicación (2008)). Todas las CGPasas conocidas produjeron β -dipéptidos hidrosolubles de CGP que después se transportan a las células para su posterior catabolización (Sallam, A. y col., presentado para publicación (2008)).

- 40 La digestión y transporte de proteínas es esencial para la vida. En los rumiantes, por ejemplo, la mayor parte de la proteína de la dieta es degradada por la flora del rumen en aminoácidos y péptidos. Los aminoácidos se incorporan en la proteína microbiana o pasan a la siguiente parte del tracto digestivo o son absorbidos directamente a través de la pared del rumen a la sangre. (Faix, S. y col., Acta Vet. Brno. 70:243-246 (2001)). No obstante, los tri- y dipéptidos se utilizan con mayor eficiencia que los aminoácidos libres, tienen un mayor valor nutritivo, se absorben mejor [hasta un 185% más que los aminoácidos (Adibi, S. A., J. Clin. Invest. 50:2266-2275 (1971)) y retienen más nitrógeno que la proteína intacta contribuyendo a potenciar la ganancia de peso (Dock, D. B. y col., Biocell 28:143-150 (2004)). Los estudios de absorción en pacientes que presentan una deficiencia genética en el transporte de ciertos aminoácidos presentaron una absorción normal de estos aminoácidos si se administraban como dipéptidos. Este hecho indicó la presencia de sistemas de transporte para dipéptidos especializados y efectivos (Adibi, S. A., Gastroenterology 113:332-340 (1997)). Por consiguiente, frecuentemente se aplican dietas de proteína hidrolizada como aditivos de alimentación para la recuperación en casos de malnutrición (Dock, D. B. y col., Biocell 28:143-150 (2004)).

- 55 El aminoácido semi-esencial arginina desempeña varias funciones fundamentales en la fisiología celular y, por tanto, se aplica en regímenes terapéuticos para muchos trastornos cardiovasculares, genitourinarios, gastrointestinales o inmunes. (Véase para revisión Appleton, J., Altern. Med. Rev. 7:512-522 (2002)). El aminoácido esencial lisina es conocido como aditivo alimentario para seres humanos y animales, tiene actividad antiviral contra el virus *Herpes simplex*, y mejora la absorción del calcio en el intestino delgado y, por tanto, actúa contra la osteoporosis (Cynober, L. A., Metabolic and therapeutic aspects of amino acids in clinical nutrition. 2ª ed. CRC Press LLC, Boca Raton, EE.U.U. (2003)). El aminoácido no esencial aspartato sirve, entre otras cosas, como precursor de L-arginina para el metabolismo de la energía (Voet, D. y col., Biochemistry. 3ª ed. John Wiley and Sons Inc., Nueva York (2004) y se usa en liberación de fármaco para cationes y otros aminoácidos (Cynober, L. A., Metabolic and therapeutic aspects

of amino acids in clinical nutrition. 2ª ed. CRC Press LLC, Boca Raton, EE.UU. (2003)). Dado que los aminoácidos tienen una biodisponibilidad más alta en la forma dipéptido, se ha aprobado clínicamente su administración como dipéptidos y están disponibles como productos comerciales (Duruy, A. y col., Vie. Med. Int. 9:1589 (1965); Duruy, A., Med. Int. 1:203 (1966); Sellier, J., Rev. Med. Toulouse 5:879 (1979); De-Aloysio, D. y col., Acta Eur. Fertil. 13:133-167 (1982); Rohdewald, P., Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. 40:158-168 (2002); Lamm, S. y col., Eur. Bull. Drug Res. 11:29-37 (2003)).

Hasta el momento, no se conocen aplicaciones directas para CGP por sí misma. Los estudios anteriores sobre CGP giraron en torno a CGP como una fuente potencial de PAA biodegradable (Mooibroek, H. y col., Appl. Microbiol. Biotechnol. 77:257-267 (2007)). Éste tiene muchas aplicaciones potenciales (Obst, M. y col., Biomacromolecules 5:1166-1176 (2004)) como componente en membranas de diálisis, piel artificial e implantes ortopédicos o como vehículo de fármaco. PAA podría sustituir también poliácridatos no biodegradables para los que se han descrito muchas aplicaciones técnicas. Este es el primer estudio sobre biodegradación de CGP mediante la flora intestinal de mamíferos, aves y peces y, en consecuencia, sobre las aplicaciones potenciales de CGP y sus dipéptidos como aditivos nutricionales y/o terapéuticos.

Se investigaron varias muestras de flora intestinal de mamíferos, aves y peces para determinar la degradación de cianoficina. Todas las muestras consiguieron una degradación de CGP anaeróbica completa durante periodos de incubación de 12-48 h a 37 °C. Se encontraron bacterias degradadoras de CGP en todas las muestras y que estaban muy concentradas en la flora del ciego de conejos y ovejas y la flora del tracto digestivo de carpas. Se aisló un total de 62 cultivos axénicos y se degradó la CGP aeróbicamente, en 46 de ellos se degradó la CGP también anaeróbicamente durante periodos de incubación comprendidos entre 24 h y 7 días. El análisis de HPLC puso de manifiesto que todos los aislados degradaron la CGP en sus dipéptidos constituyentes. Ocho cepas fueron identificadas por secuenciación ADNr 16S y se afiliaron a los géneros *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Micromonospora*. Se pudo encontrar CGP en tres productos comerciales diferentes de *Spirulina platensis* que contenían de 0,06 a 0,15% (p/p) de CGP. Se ha descubierto ahora que CGP se puede degradar extracelularmente, así como la primera evidencia sobre la biodegradabilidad de CGP en el tracto digestivo y, en consecuencia, la potencial aplicación de CGP y sus péptidos en nutrición y terapia como fuentes altamente biodisponibles para arginina, lisina, aspartato y posiblemente otros aminoácidos.

CGP se acumula en cianobacterias durante la transición desde la fase de crecimiento exponencial a la estacionaria (Mackerras, A. H. y col., J. Gen. Microbiol. 136:2057-2065 (1990); Sherman, D. M. y col., J. Phycol. 36:932-941 (2000)). La mayoría de los géneros de cianobacterias albergan un gen cianoficina sintetasa funcional (*cphA*) que sintetiza CGP (Simon, R. D. 1987. Inclusion bodies in the cyanobacteria: cyanophycin, polyphosphate, polyhedral bodies, pp. 199-225. In P. Fay and C. van Baalen (ed.), The Cyanobacteria, Elsevier, Amsterdam, Países Bajos; Allen, M. M. y col., Methods Enzymol. 167:207-213 (1988); Mackerras, A. H. y col., J. Gen. Microbiol. 136:2057-2065 (1990); Liotenberg, S. y col., Microbiology 142:611-622 (1996); Wingard, L. L. y col., Appl. Environ. Microbiol. 68:1772-1777 (2002)). También se han identificado genes *cphA* en bacterias heterotróficas (Krehenbrink, M. y col., Arch. Microbiol. 177:371-380 (2002); Ziegler, K. y col., Naturforsch. 57c:522-529 (2002)). El polímero aparece en el citoplasma como gránulos sin membrana y es insoluble a un pH neutro, así como en concentración iónica fisiológica (Allen, M. M. y col., J. Bacteriol. 141:687-693 (1980)). CGP se acumula en condiciones restrictivas incluyendo baja temperatura, baja intensidad luminosa, limitación de fósforo o azufre (Stephan y col., Z. Naturforsch. 55:927-942 (2000)). En las cianobacterias, la masa molecular de las hebras de polímero oscila entre 25 y 100 kDa (Simon, R. D., Biochim. Biophys. Acta 422:407-418 (1976)), mientras que las de las cepas recombinantes presentan un intervalo más bajo (25 a 30kDa) y polidispersidad. Asimismo, se ha descubierto que el polímero de cepas recombinantes contenía lisina como aminoácido adicional constituyente (Ziegler, K. y col., Eur. J. Biochem. 254:154-159 (1998); Aboulmagd, E. y col., Biomacromolecules 2:1338-1342 (2001)). CGP funciona como reserva temporal de nitrógeno, energía y posiblemente carbono (Li, H. y col., Arch. Microbiol. 176:9-18 (2001); Elbahloul, Y. y col., Appl. Environ. Microbiol. 71:7759-7767 (2005)). Dado que CGP contiene cinco átomos de nitrógeno en cada bloque de construcción, satisface los criterios de la reserva de nitrógeno intracelular perfecta (Simon, R. D. 1987. Inclusion bodies in the cyanobacteria: cyanophycin, polyphosphate, polyhedral bodies, pp. 199-225. In P. Fay and C. van Baalen (ed.), The Cyanobacteria, Elsevier, Amsterdam, Países Bajos).

La degradación intracelular de CGP está catalizada por cianoficinasas muy específicas (CphB) que aparecen en el citoplasma y tiene lugar a través de un mecanismo de α -escisión que tiene como resultado la formación de β -dipéptidos (Richter, R. y col., Eur. J. Biochem. 263:163-169 (1999)). CGP representa un valioso sustrato también para bacterias que no son capaces de acumular CGP (Obst, M. y col., Appl. Environ. Microbiol. 71:3642-3652 (2005); Sallam, A., y A. Steinbuchel. 2007a). *Clostridium sulfatireducens* sp. nov., es una nueva bacteria mesófila, proteolítica, aislada de un sedimento de agua estancada, capaz de reducir tiosulfato, azufre y sulfato transitorio; se demostró que muchas de estas bacterias poseían cianoficinasas extracelulares que degradan CGP en sus dipéptidos utilizables, que se pueden transportar a la célula y utilizar posteriormente (Sallam, A., and A. Steinbüchel, Anaerobic and aerobic degradation of cyanophycin by the denitrifying bacterium *Pseudomonas alcaligenes* strain DIP1-Role of other three co-isolates in the mixed bacterial consortium, Appl. Environ. Microbiol. 74(11):3434-3443 (2008)). Se aislaron y caracterizaron varios ejemplos de estas enzimas, como por ejemplo CphEPa de la bacteria Gram-negativa de la cepa BI *Pseudomonas anguilliseptica*. Esta enzima extracelular presentó, de forma similar a CphB, un mecanismo de α -escisión para la degradación de CGP (Obst, M. y col., J. Biol. Chem. 277:25096-25105 (2002)).

Se descubrió también que las bacterias gram-positivas excretan CGPasas cuando se aisló CphEBm extracelular de cepa BAC19 de *Bacillus megaterium* (Obst, M. y col., *Biomacromolecules* 5:153-161 (2004)), se identificaron tanto CphEpa como CphEBm como hidrolasas de tipo serina. Los estudios recientes han puesto de manifiesto que la degradación de CGP extracelular puede catalizarse también mediante CGPasas de bacterias anaerobias tanto estrictas como facultativas, como la cepa KI de *Sedimentibacter hongkongensis* (Obst, M. y col., *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3642-3652 (2005)) y la cepa DIP1 de *Pseudomonas alcaligenes* (Sallam, A., y A. Steinbüchel, *Appl. Environ. Microbiol.* 74(11):3434-3443 (2008)), respectivamente. Todas las CGPasas investigadas produjeron dipéptidos β -Asp-Arg como productos de escisión, sin embargo, adicionalmente, se detectaron tetrapéptidos (Asp-Arg)₂ en caso de CphEBm (Obst, M. y col., *Biomacromolecules* 5:153-161 (2004)).

No ha sido sino recientemente que se han conocido aplicaciones prácticas para la propia CGP o para sus péptidos. En contraste, se han establecido aplicaciones importantes desde el punto de vista económico para el poli(ácido aspártico) (PAA), que es un elemento estructural (cadena principal de polímero) de CGP, como sustituto para poliacrilatos no biodegradables (Schwamborn, M., *Polym. Degrad. Stab.* 59:39-45 (1998)). PAA también se puede emplear en muchos campos, entre los que se incluyen las industrias del papel, la pintura y el petróleo (revisado por Joentgen, W. y col. 2003. Polyaspartic acids. pp. 175-199. In: S.R. Fahnestock and A. Steinbüchel (ed.), *Biopolymers*, vol 7. Wiley, Weinheim). Se han descrito también aplicaciones biomédicas para PAA (Leopold, C. S. y col., *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 4:397-406 (1995); Yokoyama, M. y col., *Cancer Res.* 6:1693-1700 (1990)). Tan solo recientemente, se han puesto de manifiesto las aplicaciones biomédicas para dipéptidos de CGP y posiblemente para la propia CGP; dichas aplicaciones dependen en primer lugar de lo sorprendentemente extendidas que están las bacterias degradadoras de CGP en las numerosas floras de mamíferos, aves y peces investigadas; esto indicó que CGP es probablemente degradable dentro de los correspondientes tractos digestivos. Por otra parte, la elevada biodisponibilidad de aminoácidos si se administran en la forma dipéptido o tripéptido es una teoría muy conocida y se aplica eficientemente en varios campos terapéuticos. Por lo tanto, CGP y/o sus β -dipéptidos se pueden considerar como potenciales aditivos alimentarios y/o terapéuticos naturales para un futuro cercano (Sallam, A. y A. Steinbüchel, 2007c. Potential of cyanophycin and its β -dipeptides as possible additives in therapy, food and feed Industries).

La producción y aislamiento eficiente de CGP en cantidades semi-técnicas no se ha establecido sino a lo largo de los últimos años. Se han aplicado varias cepas bacterianas de *E. coli*, *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas putida* y cepa ADP1 de *Acinetobacter baylyi*, presentando ésta última el máximo rendimiento de CGP de aproximadamente 46% (p/p) (Obst, M. y col., pp. 167-194. In J. M. Shively (ed.), *Inclusions in Prokaryotes*, vol. 1. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (2006)). No obstante, los sustratos y las condiciones de cultivo requeridos también son factores cruciales a la hora de elegir un productor de CGP económicamente apropiado.

Se ha descubierto ahora que se pueden preparar dipéptidos de CGP puros en un proceso a gran escala y económico que arranca de una biomasa que contiene CGP y que termina con dipéptidos de CGP puros. Ya que la cepa DIP1 de *P. alcaligenes* pudo presentar una alta productividad de enzima con requerimientos de crecimiento simples, se descubrió que esta cepa era ideal para dicho proceso técnico.

Cianoficina contiene cinco átomos de nitrógeno en cada bloque de construcción y por lo tanto cumple exactamente los criterios para una reserva de nitrógeno intracelular dinámica perfecta (Simon, R. D. 19877. Inclusion bodies in the cyanobacteria: cyanophycin, polyphosphate, polyhedral bodies, pp. 199-225. In P. Fay and C. van Baalen (ed.), *The Cyanobacteria*, Elsevier, Amsterdam, Países Bajos); su cantidad fluctúa según las necesidades de las células (Carr, N. G. 1988. Nitrogen reserves and dynamic reservoirs in cyanobacteria, p. 13-21. In L. J. Rogers and J. R. Gallon (ed.), *Biochemistry of the algae and cyanobacteria*, Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, Clarendon, Oxford.). El polímero se acumula en la cyanobacteria cuando disminuye la síntesis de la proteína o bien de manera natural durante la transición desde la fase de crecimiento exponencial a la estacionaria (Simon, R. D., *Arch. Microbiol.* 92:115-122 (1973a)) o bien por adición de inhibidores de la biosíntesis de proteína (p.ej. cloroanfenicol) (Ingram, L. O. y col., *Arch. Microbiol.* 81:1-12 (1972); Simon, R. D., *J. Bacteriol.* 114:1213-1216 (1973b)) y desaparece el polímero cuando se restablece el crecimiento equilibrado (Mackerras, A. H. y col., *J. Gen. Microbiol.* 136:2057-2065 (1990)). La acumulación de CGP también es promovida por la limitación de fósforo (Stephan y col., *Z. Naturforsch.* 55:927-942 (2000)), la limitación de azufre (Arino, X. y col., *Arch. Microbiol.* 163:447-453 (1995)), la baja temperatura, la baja intensidad luminosa o una combinación de estos factores (Obst, M. y col., *Biomacromolecules* 5:1166-1176 (2004)).

Se han desarrollado diferentes procedimientos para determinar y cuantificar CGP purificada o su contenido de células. Se ha cuantificado colorimétricamente el contenido en arginina de CGP en polímero hidrolizado o no hidrolizado con reactivo Sakaguchi (Simon, R. D., *J. Bacteriol.* 114:1213-1216 (1973b)). Se pudieron determinar los constituyentes de aminoácido de la cianoficina purificada por HPLC (Aboulmagd, E. y col., *Arch. Microbiol.* 174:297-306 (2000)). Para una determinación rápida y sensible de cianoficina, se desarrolló un método basado en resonancia magnética nuclear ¹H (RMN) (Erickson, N. A. y col., *Biochim. Biophys. Acta.* 1536:5-9 (2001)).

La degradación de CGP (intra- o extracelular) conduce principalmente a la liberación de sus dipéptidos utilizables; éstos se dividen a continuación intracelularmente en sus aminoácidos constituyentes para ocuparse en el metabolismo de la célula. La degradación intracelular de cianoficina está catalizada por cianoficinasas (CphB). La primera cianoficinasas fue descrita en heteroquistes y células vegetativas de *Anabaena cylindrica* por Gupta, M. y

col., J. Gen. Microbiol. 125:17-23 (1981). La enzima es una exopeptidasa específica de cianoficina, de tipo serina, monomérica de 29.4 kDa; su producto de degradación principal fue dipéptidos aspartato - arginina a través de un mecanismo de α -escisión (Richter, R. y col., Eur. J. Biochem. 263:163-169 (1999)). En los últimos años, se han aislado bacterias aerobias y anaerobias capaces de degradar cianoficina mediante cianoficinasas extracelulares (CphE) (Obst, M. y col., J. Biol. Chem. 277:25096-25105 (2002)); Obst, M. y col., Biomacromolecules 5:153-161 (2004); Obst, M. y col., Appl. Environ. Microbiol. 71:3642-3652 (2005); Sallam, A., and A. Steinbüchel, Appl. Environ. Microbiol. 74(11):3434-3443 (2008)). De manera similar a CphB, las CGPasas extracelulares anteriormente caracterizadas, CphEPA y CphEBm, de la cepa B1 de *Pseudomonas anguilliseptica* y la cepa BAC19 de *Bacillus megaterium*, respectivamente, fueron identificadas como enzimas específicas de cianoficina, de tipo serina, y produjeron dipéptidos de CGP como productos de degradación, si bien se detectaron adicionalmente tetrapéptidos (Asp-Arg)₂ en el caso de CphEBm. Los estudios de marcado de CphEPA mostraron que la enzima hidroliza CGP en el término carboxilo y libera sucesivamente dipéptidos β -Asp-Arg desde el extremo de la cadena del polímero degradado (véase para revisión Obst, M. y col., Biomacromolecules 5:1166-1176 (2004)). Además, recientemente se ha aplicado una tercera cianoficinasas extracelular (CphEal) de *Pseudomonas alcaligenes* DIP1 en bruto para la producción técnica de dipéptidos de CGP (Sallam, A., y A. Steinbüchel. 2008b. Biotechnological process for the technical production of β -dipéptidos from cyanophycin. En preparación).

Tan solo durante los últimos años se ha establecido la producción y el aislamiento eficiente de CGP en cantidades semi-técnicas. Se han aplicado diversas cepas bacterianas de *Escherichia coli*, *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas putida* y *Acinetobacter baylyi* (Obst, M. y col., Biomacromolecules 5:1166-1176 (2004)). No obstante, la relevancia biotecnológica de CGP se ha basado teóricamente en ser una fuente de poli(ácido aspártico) que tiene un alto potencial para aplicaciones industriales [p.ej. para el tratamiento de aguas; en las industrias del papel y el cuero; como agente de dispersión (Roweton, S. y col., J. Environ. Polym. Degrad. 5:175-181 (1997); Mooibroek, H. y col., Appl. Microbiol. Biotechnol. 77:257-267 (2007)) o como sustituto biodegradable de poliácido (Schwamborn, M., Polym. Degrad. Stab. 59:39-45 (1998))]. PAA también tiene aplicaciones biomédicas potenciales como componente de membranas de diálisis, piel artificial, implantes ortopédicos y como vehículo de fármaco (Leopold, C. S. y col., J. Pharmacokinet. Biopharm. 4:397-406 (1995)).

Tal como se ha expuesto antes, se han puesto de manifiesto aplicaciones biomédicas para los dipéptidos de CGP y posiblemente para la propia CGP, indicándose que, probablemente, CGP es degradable dentro de los tractos digestivos de mamíferos y peces; esto supone que el polímero y sus dipéptidos serán potenciales aditivos naturales alimentarios y/o terapéuticos para un futuro próximo. Por consiguiente, recientemente, se ha construido un proceso a gran escala para la producción de dipéptidos de CGP utilizando CphEal en bruto de cepa DIP1 de *P. alcaligenes*. Este proceso original comprendió tres fases; Fase I: extracción y purificación a gran escala de CGP; Fase II: producción a gran escala de polvo de CphEal en bruto; Fase III: degradación de CGP en sus dipéptidos, y se estableció tal como se ha descrito antes en el presente documento. Ahora, se ha descubierto que las últimas dos fases del proceso original se pueden optimizar en gran medida para futuras aplicaciones. Además, CphEal se purificó técnicamente del polvo en bruto y se pusieron de manifiesto características bioquímicas del mismo.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona por lo tanto

- (1) un proceso para la producción enzimática de una composición de β -dipéptido a partir de una preparación de cianoficina (CGP) o un polímero de tipo CGP consistiendo las estructuras peptídicas esencialmente en una o más unidades de β -dipéptido compuestas de dos aminoácidos seleccionados de ácido aspártico, arginina, lisina, ácido glutámico, citrulina, ornitina y canavanina, proceso que comprende la degradación de la preparación de CGP o polímero de tipo CGP con una CGPasa de *Pseudomonas alcaligenes* en β -dipéptidos, en el que la CGPasa tiene un peso molecular de aproximadamente 45 kDa, una temperatura óptima de aproximadamente 50 °C y un intervalo óptimo de pH de 7 a 8,5 y degrada CGP en β -Asp-Arg;
- (2) un modo de preferencia del proceso (1) anterior en el que la CGPasa es la CGPasa de *P. alcaligenes* DIP1 CphEal que ha sido depositada en la DSMZ como DSM 21533; y
- (3) una CGPasa tal como se ha definido antes en (2).

Breve descripción de las Figuras

Fig. 1: Árbol de unión de vecinos basado en secuencias de ADNr 16S que presentan las relaciones filogenéticas estimadas entre las bacterias degradadoras de CGP, tanto aisladas previamente como durante el presente estudio. Durante el estudio fueron aisladas las cepas en negrita. Las cepas subrayadas habían sido investigadas anteriormente para determinar su degradación de CGP (Obst, M. y col., J. Biol.Chem. 277:25096-25105 (2002); Obst, M. y col., Biomacromolecules 5:153-161 (2004); Obst, M. y col., Appl. Environ. Microbiol. 71:3642-3652 (2005); Sallam, A. y col., Presentado para publicación (2008)). Se utilizó *E. coli* K12 como grupo externo. Los números de acceso se dan entre paréntesis. Los valores de bootstrap se presentan como porcentajes de 100 replicados. Barra, 2% divergencia de secuencia.

Fig. 2: Halos de degradación causados por la CGPasa extracelular desde la cepa DIP1 de *P. alcaligenes* en placa de agar con recubrimiento superpuesto de CGP; CphE: el polvo en bruto antes de la fase de degradación (Fase III), CphE R: el polvo recuperado después de la fase de degradación.

Fig. 3: Crecimiento de cepa DIP1 de *P. alcaligenes* sobre diferentes sustratos. Se aplicaron cultivos en matraces Klett de 100 ml con deflectores; cada matraz contenía 10 ml de medio SM y 1 g l-1 del sustrato de ensayo. Se llevaron a cabo los experimentos por duplicado que fueron inoculados desde un precultivo desarrollado en las mismas condiciones de ensayo. Se controló el crecimiento por el aumento de OD578nm tras un período de incubación de 24 h a 30 °C.

Fig. 4: Los períodos de incubación requeridos para completar la degradación de diferentes concentraciones de CGP (10-50 g/l) en virtud del efecto catalítico de diferentes concentraciones de CphE en bruto (1-10 g/l). Se incubaron los tubos de reacción a 30 °C en un rotador de tubos a una velocidad de rotación de 3 rpm. La concentración de CGP más alta ensayada (50 g/l) se pudo degradar en 10 h en presencia de 2 g/l de polvo de CphE en bruto.

Fig. 5: Fermentación discontinua de *P. alcaligenes* DIP1 en un reactor de tanque agitado Biostat D650 que contiene 420 l de medio SM con g/l de citrato sódico e inoculado con 4% (vol/vol) de precultivo. Se desarrolló el precultivo en matraces con deflectores de 2 l que contenían 1 l del mismo medio y se incubaron durante 12 h a 30 °C. Los parámetros de fermentación y las condiciones de cultivo en el reactor Biostat D650 fueron: un pH de 6,9 a 7,5; temperatura de 30 °C y aireación a 0,2 vvm. Se estableció la pO2 a un mínimo de 40% y se ajustó automáticamente por agitación que, sino, se mantuvo a 100 rpm. La flecha indica el tiempo de inducción. * Densidad óptica a 600 nm (OD600), (♦). * pH, (1). * Velocidad agitador (rpm), (▲). * pO2 (% de saturación) (-). * Flujo de aire (l min⁻¹), (•)

Fig. 6: Un Sistema continuo para la cosecha, concentración y desalación de proteínas en un sobrenadante de fermentación de cepa DIP1 de *P. alcaligenes* (Fase II). Para la cosecha, se utilizó una centrifuga continua CEPA Z41 para separar las células, se recogió el sobrenadante en un tanque de 100 l central. Para la concentración, se conectó al tanque central una unidad de flujo cruzado con un cartucho de 30 kDa; se volvió a bombear el material retenido concentrado hacia el tanque al tiempo que se descartó directamente el filtrado. Se ajustó la velocidad de flujo del flujo cruzado para mantener solamente 50 l en el tanque. Se desalaron los 5 l concentrados finales con 5 volúmenes de lecho de H2O, se congelaron a -30 °C y se liofilizaron.

Fig. 7: Placas de CCF para el control de calidad de los dipéptidos de CGP producidos I: Aminoácidos habituales y muestras de dipéptido directo tomadas según los sistemas de filtración probados; 1: Cartucho de flujo cruzado COP 30 kDa. 2: membrana de filtro (COP 10 kDa). 3: membrana de filtro (COP 5 kDa). 4: membrana de filtro (COP 1 kDa). 5: membrana de filtro (COP 0,5 kDa). 6: dipéptidos de CGP (carga final tras el flujo cruzado y la liofilización) II: Aminoácidos habituales y muestras hidrolizadas de: a: dipéptidos de CGP (carga final tras el flujo cruzado y la liofilización). b: dipéptidos Asp-Arg. c: dipéptidos Asp-Lys (b, c; Sigma Aldrich, Deisenhofen, Alemania) solamente se indicó un punto para todas las muestras directas (I) al tiempo que las muestras hidrolizadas presentaron los puntos típicos para los aminoácidos habituales aspartato, arginina y lisina (II).

Fig. 8: Fermentación discontinua de *E. coli* DH1 (pMa/c5-914::cphAPCC6803) en un reactor de tanque agitado Biostat D650 que contenía 400 l de 7% (vol/vol) de medio de protamilasa con 100 mg de 1-1 ampicilina. Se preparó el precultivo (4%, vol/vol) en matraces de 2 l que contenían 1 l del mismo medio que el de la fermentación y se incubaron durante 20 h a 30 °C. Los parámetros de fermentación y las condiciones de cultivo en el reactor Biostat D650 fueron pH 7,5, aireación a 0,17 vvm, se mantuvo constante la pO2 a 20% y se ajustó automáticamente por agitación. Se dejó en marcha la fermentación durante 15 h, las primeras 6 h a 30 °C después a 37 °C para inducir la expresión de CGP-sintetasa. Turbiedad (DO850) (♦), pO2 (% de saturación) (▼), aireación (l/min) (▲), agitación (rpm) (•), temperatura (°C) (■).

Fig. 9: Micrografía de contraste de fase de células de *E. coli* DH1 (pMA/c5.914::cphAPCCSSOS) a la 15ª h de fermentación en reactor Biostat D650 en medio protamilasa al 7% (vol/vol). Aparecen granos de CGP como acumulaciones que reflejan la luz en las células. Barra, 10 µm.

Fig. 10: SDS-PAGE de las etapas de purificación de CphEal de cepa DIP1 de *P. alcaligenes* a través de la unión específica en CGP. Gel A: SDS-PAGE manchado por el método de tinción con nitrato de plata; M: masa molecular proteínas normales, C: control de CphEal en bruto, S1: mezcla de sobrenadante inmediatamente después del mezclado de CGP y CphEal en bruto, S2: muestra de sobrenadante tras 6 min de tiempo de unión, S2': lo mismo que S1 tras después de concentrarlo 10 veces, W1, W2: muestras de sobrenadante después de las dos etapas de lavado. Gel B: SDS-PAGE con un triple volumen del CphEal purificada como en A y manchada más tiempo con nitrato de plata. Se pueden observar otras bandas de proteína de baja concentración además de CphEal a 45 kDa.

Descripción detallada de la invención

En el proceso del aspecto (1) de la invención, la composición de dipéptido puede consistir en un solo dipéptido o en una mezcla de dipéptidos. No obstante, preferentemente los dipéptidos comprenden restos de aminoácido seleccionados de aspartato, arginina, lisina y otros restos de aminoácido presentes en el polímero de tipo CGP. En particular, más preferentemente los dipéptidos se seleccionen de β-aspartato-arginina and β-aspartato-lisina.

Una "CGP" y un "polímero de tipo CGP" de acuerdo con la invención es una estructura peptídica que consiste esencialmente en una o más unidades de dipéptido, preferentemente, dichas unidades de dipéptido se componen de dos de los siguientes restos de aminoácido: ácido aspártico, arginina, lisina, ácido glutámico, citrulina, ornitina, canavanina y similares.

Para la degradación, se puede utilizar una gran variedad de CGPasas conocidas en la especialidad (véase Tablas 2 y 4). De acuerdo con la invención, la CGPasa es una CGPasa de *P. alcaligenes*, siendo particularmente en particular

más preferente una cepa DIP1 de *P. alcaligenes*. De acuerdo con el aspecto (2) de la invención la CGPasa (i) tiene un peso molecular de 45 kDa, una temperatura óptima de 50 °C y un intervalo de pH óptimo de 7-8,5 y degrada CGP en β -Asp-Arg; y/o (ii) es la CGPasa CphEal de *P. alcaligenes* DIP1 que ha sido depositada en la DSMZ como DSM 21533, o es un mutante, derivado o fragmento de la misma capaz de escindir CGP o polímeros de tipo CGP en dipéptidos. Los mutantes, derivados o fragmentos de la CGPasa nativa mencionados incluyen fragmentos (que tienen al menos 50 restos de aminoácido consecutivos de la secuencia nativa, preferentemente N- y/o productos de truncamiento C-terminal, en los que se han eliminado hasta 50, hasta 30 o hasta 190 restos de aminoácido terminales), derivados (en particular, productos de fusión con proteínas y péptidos funcionales, tales como péptidos de secreción, secuencias líder, etc., y productos de reacción con fracciones químicas como PEG, alcoholes, aminas, etc.), y mutantes (en particular, mutantes de adición, sustitución, inversión y delección, que tienen al menos un 80%, preferentemente al menos un 90%, siendo lo más preferente al menos un 95% de identidad de secuencia con la enzima nativa sobre la base de los aminoácidos o en los que se añaden, sustituyen invierten y/o suprimen de 1 a 20, preferentemente de 1 a 10, restos de aminoácido consecutivos o separados; para la sustitución, es particularmente preferente una sustitución conservadora de mutantes), siempre y cuando, sin embargo, dichas CGPasas modificadas tengan la actividad enzimática de la CGPasa nativa.

El proceso de los aspectos (1) y (2) de la invención comprende además la preparación de CGP o la preparación de polímero de tipo CGP por cultivo de una línea celular productora procariota o eucariota. La línea celular productora puede ser cualquier línea celular capaz de producir la CGP o polímero de tipo CGP. Preferentemente, la línea celular productora se selecciona de *Escherichia coli*, *Ralstonia eutropha*, *Acinetobacter baylyi*, *Corynebacterium glutamicum*, *Pseudomonas putida*, cepas de levadura y biomasa vegetal. En particular, preferentemente, las líneas celulares productoras sean *Ralstonia eutropha* H16-PHB-4- Δ eda (pBBR1MCS-2::cphA6308/edaH16) y *E. coli* DH1 (pMa/c5-914::cphAPCC6803).

Este proceso puede comprender además las etapas de aislamiento, purificación y/o modificación química del producto CGP obtenido por cultivo de la línea celular productora. Dichos aislamiento, purificación y separación o modificación química se pueden llevar a efecto a través de los procedimientos bien establecidos en la técnica.

No obstante, preferentemente para el proceso de los aspectos (1) y (2), se somete directamente a degradación con la CGPasa el producto de CGP obtenido por cultivo de la línea celular productora, es decir, sin aislamiento ni purificación.

En otro modo de realización preferente, el proceso de los aspectos (1) y (2) comprende además la purificación o separación del producto de degradación y/o la modificación química del producto de degradación. También en este caso, la purificación, separación o modificación química se pueden llevar a efecto a través de los procedimientos bien establecidos en la técnica.

El aspecto (3) de la invención se refiere a una CGPasa que es la CGPasa CphEal de *P. alcaligenes* DIP1 que ha sido depositada en la DSMZ como DSM 21533.

El dipéptido, o mezcla de dipéptidos, obtenido según el procedimiento de (1) y (2) antes expuesto es adecuado como composición farmacéutica, medicamento, suplemento alimentario o de forraje. Dicha composición farmacéutica, medicamento, suplemento alimentario o de forraje puede contener además vehículos, aglutinantes, etc. farmacéutica o dietéticamente aceptables. Asimismo, puede contener compuestos activos adicionales para el correspondiente propósito farmacéutico.

La composición farmacéutica es particularmente adecuada para terapia nutricional. Naturalmente, el tipo de terapia nutricional depende de los aminoácidos presentes en la composición/medicamento tal como se pone de manifiesto a partir de lo siguiente:

Los recientes avances en terapia nutricional de pacientes críticamente enfermos ha dado lugar a que se comprenda perfectamente la necesidad de ciertos aminoácidos para mantener la homeostasis de las proteínas del tejido durante la enfermedad (Witte, M. B. and Barbul A., Wound Rep. Reg. 11:419-423 (2003)). Anteriormente, se habían clasificado los aminoácidos en no esenciales (prescindibles) y esenciales (indispensables). Sin embargo, con una mejor comprensión de la fisiología *in vivo* en la que participan los aminoácidos, se propuso una clasificación alternativa que redefinió la necesidad de ciertos aminoácidos como condicionalmente indispensables (Laidlaw, S. A. and Kopple, J. D., Am. J. Clin. Nutr. 46:593-605 (1987)). Esto hizo que el uso de dichos aminoácidos, en solitario o como parte de un régimen nutricional completo, fuera atractivo para mejorar el resultado nutricional, la respuesta inmune y la recuperación de tejido. En la sección que se presenta a continuación, se explican los hallazgos relacionados con la fisiología y el mecanismo de acción de los tres aminoácidos que constituyen también la CGP. Dichos aminoácidos son: el aminoácido no esencial L-Aspartato, el semi-esencial L-Arginina y el esencial L-Lisina. Se pone un énfasis especial en la arginina, dados sus numerosos efectos fisiológicos. L-Aspartato: L-Aspartato no esencial tiene una masa molecular 133,10 g/mol y es un aminoácido dicarboxílico. La mayor parte del L-Aspartato se puede encontrar en proteínas, si bien también se encuentran pequeñas cantidades del mismo en la forma libre en los fluidos corporales y en las plantas (Barrett, G. C. y Elmore D. T. Amino Acids and Peptides. Cambridge University Press, Cambridge, UK (1998)). L-Aspartato es un constituyente del biopolímero natural CGP y el edulcorante sintético Aspartamo. El

- ácido aspártico es ligeramente hidrosoluble y más hidrosoluble en la forma sal. El aspartato de la dieta se absorbe desde el intestino delgado por transporte activo para entrar en la circulación portal y después es transportado al hígado, donde gran parte es metabolizado en proteínas, purinas, pirimidinas (Barrett, G.C. y Elmore D. T. Amino Acids and Peptides. Cambridge University Press, Cambridge, RU (1998)). L-Aspartato puede servir asimismo como fuente de energía en el ciclo del ácido cítrico y, por tanto, se supone que es eficiente contra la fatiga (véase más adelante: Asp-Arg). El aspartato se utiliza en la liberación de fármaco para cationes como Mg^{2+} , K^{+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , o para otros aminoácidos para aumentar su biodisponibilidad (Cynober, L. A. Metabolic and therapeutic aspects of amino acids in clinical nutrition. 2ª ed. CRC Press LLC, Boca Raton, EE.UU. (2003)).
- L-Arginina: L-Arginina es un aminoácido fuertemente básico con un peso molecular de 174,2 g/mol y se encuentra en la mayoría de las proteínas. Contiene cuatro átomos de nitrógeno por molécula y, por lo tanto, es el vehículo de nitrógeno más abundante en los seres humanos y animales (Appleton, J., Altern. Med. Rev. 7:512-522 (2002)). La arginina es esencial para los peces (Ahmed, I. y Khan, M. A., Aquacult. Nutr. 10:217-225 (2004)), mientras que en los mamíferos se considera como semi-esencial, ya que se puede compensar por consumo nutricional o por síntesis *de novo* (endógena). En el hígado, la mayor parte de la arginina endógena se deriva de citrulina, un subproducto del metabolismo de glutamina en el intestino y o el hígado. Sin embargo, dado que la biosíntesis de arginina no aumenta para compensar el agotamiento o el suministro inadecuado, el consumo dietético (aproximadamente 5-6 g/día para un ser humano medio, (Witte, M. B. and Barbul. A., Wound Rep. Reg. 11:419-423 (2003)) sigue siendo el determinante principal de los niveles de arginina en plasma.
- Aproximadamente un 50% de la arginina ingerida se utiliza directamente en el intestino delgado, mientras que el resto se libera a la circulación portal. En general, aproximadamente la mitad de la arginina ingerida se convierte rápidamente en ornitina, principalmente mediante la enzima arginasa (Modolell, M. y col., Eur. J. Immunol. 25:1101-1104 (1995); Witte, M. B. and Barbul. A., Wound Rep. Reg. 11:419-423 (2003)). A su vez, la ornitina se puede metabolizar en glutamato y prolina, o a través de la enzima ornitina decarboxilasa en poliaminas (Boutard, V. y col., J. Immunol. 155:2077-2084 (1995)). El resto de la arginina es procesada por una a cuatro enzimas distintas: óxido nítrico sintasa (para convertirse en óxido nítrico), arginina: glicina amidinotransferasa (para convertirse en creatina), arginina decarboxilasa (para convertirse en agmatina) o arginil-ARNt sintetasa (para convertirse en arginil-ARNt, un precursor para síntesis de proteína) (Vodovotz, Y. y col., J. Exp. Med. 178:605-613 (1993)).
- La arginina tiene efectos significativos sobre las funciones endocrinas en seres humanos y animales, en particular, en las funciones secretoras adrenal y pituitaria. No obstante, poco se sabe del mecanismo exacto según el cual la arginina ejerce estos efectos. La arginina es un precursor biológico de óxido nítrico (NO), una molécula mensajera endógena que participa en diversos efectos fisiológicos dependientes de endotelio del sistema cardiovascular (Witte, M. B. y Barbul. A., Wound Rep. Reg. 11:419-423 (2003)). Por tanto, se cree que muchos de los efectos clínicos de arginina están mediados por sus efectos sobre el factor relajante derivado del endotelio. La NO-sintasa tiene dos variantes (Rohdewald, P. y Ferrari V., Solicitud de patente EE.UU.2004137081 (2004): (cNOS) constitutiva con sus isoformas, eNOS (en el revestimiento endotelial vascular) y nNOS (en neuronas), y la variante inducible (iNOS) que se encuentra en los macrófagos, los glóbulos blancos, los fibroblastos, las células endoteliales y los queratinocitos. La función de NO puede diferir dependiendo de su fuente celular; NO de fibroblasto apoya la síntesis de colágeno, mientras que NO endotelial afecta a la angiogénesis, y NO de macrófago es citostático para bacterias (Rohdewald, P. y Ferrari V., Solicitud de patente EE.UU. 2004137081 (2004)). Por otra parte, la arginasa comparte y compite por el sustrato natural de NOS, en concreto L-Arginina. L-hidroxiarginina y nitrilo, el producto intermedio y el producto final de la ruta de NO, respectivamente, son ambos fuertes inhibidores de arginasa (Hrabak, A. y col., FEBS Lett. 390:203-206 (1996)). En cambio, urea, el producto final de la actividad de arginasa, inhibe la formación de NO y los procesos que dependen de NO (Witte, M. B. y Barbul. A., Wound Rep. Reg. 11:419-423 (2003)).
- La arginina en enfermedades cardiovasculares: Se ha demostrado en numerosos ensayos clínicos que la arginina es beneficiosa si se administra a pacientes con enfermedades cardiovasculares (revisado por Appleton, J., Altern. Med. Rev. 7:512-522 (2002)). Por ejemplo, un suplemento de arginina oral mejoró de forma espectacular la tolerancia y la capacidad de ejercicio en pacientes con angina de pecho (Bednarz, B. y col., Int. J. Cardiol. 75:205-210 (2000)), y mejoró significativamente su flujo sanguíneo, la distensibilidad arterial y la función renal en caso de insuficiencia cardíaca congestiva (CHF) (Watanabe, G. H. y col., J. Hypertens.18:229-234 (2000)). Los estudios realizados con animales han señalado efectos antiaterogénicos de la arginina como suplemento, entre los que se incluyen una mejor vasodilatación, inhibición de la formación de placa, menor espesamiento de la túnica íntima de la aorta y normalización de la agregación de plaquetas en adultos humanos hipercolesterolémicos (Nakaki, T. y Kato R., Jpn J. Pharmacol. 66:167-171 (1994)). Por otra parte, la provisión temprana de arginina mejoró la hipertensión, previno la insuficiencia renal en ratas y seres humanos (Sanders, P.W., Am. J. Kidney Dis. 28:775-782 (1996)), y mejoró la respuesta en pacientes hipertensos a medicamentos como enalapril (Pezza, V. y col., Am. J. Hypertens. 11:1267-1270 (1998)). Adicionalmente, la arginina mejoró significativamente los síntomas de claudicación intermitente (Böger, R. H. y col., J. Am. Coll. Cardiol. 32:1336-1344 (1998)), y de preeclampsia (Roberts, J. M., Am. J. Kidney Dis. 33:992-997 (1999)).
- Arginina en la secreción de hormona del crecimiento (GH) y el rendimiento atlético: la hormona del crecimiento es la responsable de potenciar el crecimiento muscular, quemar grasas y mantener el sistema inmune, no obstante, su secreción empieza a deteriorarse en el cuerpo humano a la edad de treinta años (revisado por Dean, W. y Pryor, K., Growth hormone: amino acids as GH secretagogues, revisión de la bibliografía. Vit. Res. News; disponible en

www.vrp.com (2001)). Aunque no se comprende bien el mecanismo, se sabe que la arginina potencia la secreción de GH. Asimismo, los profesionales clínicos se valen de una prueba de rutina de infusión de arginina para determinar la capacidad de respuesta de la glándula pituitaria para liberar GH en seres humanos (Penny, R. y col., J. Clin. Endocrinol. 29:1499-1501 (1969)). La infusión intravenosa (IV) de una baja dosis de arginina ha sido asociada con un aumento del 52% de la arginina en suero y un significativo aumento de los niveles de GH en suero. Por otra parte, se ha señalado que la arginina oral, en contraposición con la arginina IV, es un medio ineficaz para potenciar la secreción de GH (Marcell, T. J. y col., J. Gerontol. 54:395-399 (1999)), al mismo tiempo que se ha señalado que dosis altas de aspartato de arginina por vía oral actúan como secretagogo de la hormona del crecimiento únicamente por la noche (Besset, A. y col., Acta Endocrinol. 99:18-23 (1982)). En los peces, la arginina es un aminoácido esencial, de modo que la arginina dietaria es esencial para el óptimo crecimiento y una utilización eficiente del forraje, y su deficiencia causa un menor índice de crecimiento, una menor respuesta inmune y una mayor mortalidad (Ahmed, I. and Khan, M. A., Aquacult. Nutr. 10:217-225 (2004)).

La arginina en heridas, quemaduras, traumatismos críticos y demencia senil: dado que la arginina está íntimamente relacionada con la señalización celular, a través de la producción de óxido nítrico, y con la proliferación celular, a través de su metabolismo en ornitina y otras poliaminas, numerosos estudios han demostrado que su suplementación es esencial para la cicatrización. Dicho efecto no depende de la ruta de administración y se supone que está asociado con las rutas de síntesis de colágeno, NO, ornitina y poliaminas (Witte, M. B. and Barbul. A., Wound Rep. Reg. 11:419-423 (2003)).

La síntesis de colágeno es esencial para la formación de cicatrices, que es la base de la mayor parte de las cicatrizaciones en mamíferos. Las ratas alimentadas con una dieta sin arginina presentaron una cicatrización de la herida deficiente, mientras que los seres humanos y animales alimentados con una dieta enriquecida con arginina, presentaron una mejor deposición de colágeno y fuerza de rotura de la herida (Barbul, A. y col., Surgery 108:331-336 (1990)). Se supone que el efecto de arginina en la síntesis de colágeno está mediado en parte por la síntesis de NO ya que los inhibidores iNOS disminuyeron la deposición de colágeno y retrasaron la cicatrización de heridas incisionales, y en cambio se encontraron niveles más altos de metabolitos de NO en los fluidos de la herida tras la suplementación con arginina (Murrell, G. A. C. y col., Inflamm. Res. 46:19-27 (1997); Schäffer, M. R. y col., Eur. J. Surg. 165:262-267 (1999)). Se ha señalado incluso que los efectos de NO en la cicatrización de heridas están mediados sistemáticamente (Witte, M. B. and Barbul. A., Wound Rep. Reg. 11:419-423 (2003)) ya que: 1) la nutrición sin arginina inhibe la síntesis de NO inducida en distintos órganos, no solamente en el sitio de la herida; 2) NO media el edema inducido por inflamación e inhibe la infiltración celular en granulomas; 3) el efecto de NO en la cicatrización de heridas no solamente está mediado por iNOS, ya que ratones eNOS noqueados también presentaron una cicatrización deficiente; y 4) los inhibidores iNOS tienen una alta letalidad en altas concentraciones. Además, si bien la contracción de la herida contribuye en gran medida al cierre de heridas abiertas, el cierre de las heridas de escisión se retrasa por la inhibición de iNOS (Stallmeyer, B. y col., J. Invest. Dermatol. 113:1090-1098 (1999)) y los ratones iNOS noqueados presentaron un cierre retardado de heridas de escisión que se puede invertir por transfección con iNOS-ADNc (Yamasaki, K. y col., J. Clin. Invest. 101:967-971 (1998)). Todos estos datos llevan a pensar que el metabolismo de arginina vía NOS es esencial para los efectos positivos de arginina en la cicatrización (Shi, H. P. y col., Surgery 128:374-378 (2000)).

La inducción o sobreexpresión de arginasa, que representa la primera etapa en la biosíntesis de poliamina, mejora la proliferación celular endotelial (Wei, L. H. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9260-9264 (2001); Witte, M. B. y Barbul. A., Wound Rep. Reg. 11:419-423 (2003)). Se sabe también que la arginina potencia la cicatrización de heridas al estimular las respuestas de linfocitos T de huésped y heridas, lo que aumenta entonces las respuestas fibroblásticas (Barbul, A. y col., Surgery 108:331-336 (1990)). En los seres humanos sanos, la arginina potencia la actividad mitogénica de los linfocitos de la sangre periférica y reduce en gran medida el deterioro postraumático en la blastogénesis de los linfocitos (Daly, J. M. y col., Ann. Surg. 208:512-23 (1988)). Se ha demostrado que la arginina es crucial para la diferenciación de linfocitos de la médula ósea. Dado que los linfocitos T son esenciales para una cicatrización normal de la herida, los ratones y ratas con empobrecimiento en linfocitos T presentan una cicatrización de las heridas significativamente deficiente. Otros estudios han demostrado que los efectos beneficiosos de arginina como suplemento en la cicatrización de heridas son similares a los efectos de la administración de GH a animales heridos o niños con quemaduras (Jorgensen, P. H y Andreassen, T. T., Acta Chir. Scand. 154:623-626 (1988); Herndon, D. N. y col., Ann. Surg. 212:424-9 (1990)), hecho debido a la muy conocida alta actividad de secretagogo de la arginina en la pituitaria y las glándulas pancreáticas. Esto fue confirmado por los ensayos realizados en animales hipofisectomizados, en los que la arginina no afectó a la cicatrización de la herida (Wei, L. H. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9260-9264 (2001); Witte, M. B. and Barbul. A., Wound Rep. Reg. 11:419-423 (2003)).

Seifter, E. y col., Surgery 84:224-230 (1978) han demostrado que la arginina resulta esencial en situaciones postraumáticas: las ratas con una deficiencia en arginina sometidas a un traumatismo menor presentaron significativamente una mayor pérdida de peso y mortalidad. Las lesiones por quemadura también aumentaron significativamente la oxidación de arginina y la fluctuación de sus reservas. La frecuentemente utilizada nutrición parenteral total (TPN por sus siglas en inglés) aumenta la conversión de arginina en ornitina y aumenta proporcionalmente la oxidación irreversible de arginina. La elevada oxidación de arginina emparejada con una síntesis *de novo* limitada hicieron que la arginina fuera condicionalmente esencial en varios pacientes quemados que recibieron TPN (Yu, Y. M. y col., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 280:E509-E517 (2001)). Otros estudios diversos demostraron que la arginina reduce el período de estancia hospitalaria, las infecciones adquiridas y las alteraciones

inmunes entre los pacientes con quemaduras y traumatismos (Appleton, J., *Altern. Med. Rev.* 7:512-522 (2002)), y la peroxidación de lípidos en pacientes ancianos con demencia senil (Ohtsuka, Y. y Nakaya J., *Am. J. Med.* 1:108-439 (2000)). Estas numerosas observaciones emparejadas con su uso relativamente seguro han hecho que el uso de arginina sea muy atractivo para el cuidado de pacientes con traumatismos, quemaduras o gravemente enfermos (Witte, M. B. y Barbul. A., *Wound Rep. Reg.* 11:419-423 (2003)).

Arginina en inmunomodulación y cáncer: la arginina es un potente inmunomodulador y se ha demostrado que tiene efectos beneficiosos en afecciones catabólicas, como sepsis y estrés postoperatorio (Evoy, D. y col. *Nutrition* 14:611-617 (1998); Appleton, J., *Altern. Med. Rev.* 7:512-522 (2002)). La arginina también puede ser beneficiosa en individuos con VIH/SIDA. La combinación de glutamina, arginina y HMB (hidroximetilbutirato) previno la pérdida de masa corporal magra en individuos con SIDA (Swanson, B., *Nutrition* 18:688-690 (2002)). Los ensayos con animales y seres humanos han demostrado que dosis grandes de arginina pueden interferir en la inducción de tumor y que la suplementación a corto plazo con grandes dosis de arginina ayuda a mantener las funciones inmunes durante quimioterapia (Appleton, J., *Altern. Med. Rev.* 7:512-522 (2002)). Arginina en diabetes y resistencia a la insulina: se ha observado un menor nivel de arginina en plasma y alteraciones de la relajación dependiente de endotelio en seres humanos y animales con diabetes melitus (DM). Se ha supuesto como una probable razón de esto la deficiencia de NO endotelial. Por lo tanto, se ha señalado la suplementación de arginina para mejorar dichas afecciones; la arginina IV redujo la presión arterial y la agregación de plaquetas en pacientes con DM tipo 1 (Giugliano, D. y col., *Am. J. Physiol.* 273:E606-E612 (1997)), mientras que dosis bajas de arginina IV mejoraron la sensibilidad a la insulina en pacientes DM tipo 2 y obesos, así como en sujetos sanos (Wascher, T. C. y col., *Eur. J. Clin. Invest.* 27:690-695 (1997)). La arginina también puede contrarrestar la peroxidación de lípidos y reducir en virtud de ello las complicaciones de DM microangiopáticas a largo plazo. Asimismo, los ensayos doble ciego demostraron que la suplementación de arginina oral mejoraba significativamente la sensibilidad a la insulina periférica y hepática en pacientes con DM tipo 2 (Appleton, J., *Altern. Med. Rev.* 7:512-522 (2002)).

Arginina en afecciones gastrointestinales: se asoció la acción de arginina sobre NO, gastrina y poliaminas, que ejerce sus efectos de promoción del crecimiento, angiogénicos e hiperémicos, con una aceleración de la cicatrización de úlceras durante los estudios preliminares (Brzozowski, T., *J. Gastroenterol.* 32:442-452 (1997)). Adicionalmente, NO desempeña un importante papel en la regulación de la motilidad gastrointestinal. La suplementación de arginina oral disminuyó significativamente la frecuencia e intensidad de los ataques de angina de pecho en pacientes con trastornos de motilidad esofágica (Appleton, J., *Altern. Med. Rev.* 7:512-522 (2002)). De manera similar, la ruta L-Arginina-NO participa en la regulación de la motilidad de la vesícula biliar y la ingestión de L-Arginina aumentó los volúmenes vesiculares en ayunas y residual (Luiking, Y. C. y col., *Am. J. Physiol.* 274:984-991 (1998)).

La arginina en afecciones genitourinarias: una encuesta que se llevó a cabo en Estados Unidos (1999) indicó que un 31% de los hombres y un 43% de las mujeres con edades comprendidas entre los 18 y los 59 años presentaban diversos grados de disfunción sexual (Christianson, D. W., *Acc. Chem. Res.* 38:191-201 (2005)). Estos problemas pueden deberse tanto a causas fisiológicas como psicológicas, o ambos. En los hombres, la disfunción sexual se describe de forma abreviada como disfunción eréctil (impotencia o DE), mientras que en las mujeres, la disfunción sexual se clasifica en cuatro categorías principales: deseo sexual hipoactivo, trastorno orgásmico, trastorno sexual por dolor y trastorno de excitación sexual (Basson, R. y col., *J. Urol.* 163:888-893 (2000)). Éste último, definido como la incapacidad de conseguir o mantener una excitación sexual suficiente que incluye erección del clítoris y congestión genital es análogo en el hombre DE en el sentido de que está causada por una deficiencia en la circulación de la sangre genital. Esto puede ser el resultado en ambos géneros de defectos fisiológicos en las reacciones catalizadas por enzimas que rigen el flujo sanguíneo hacia dentro y hacia fuera del cuerpo cavernoso, una cámara muscularizada de tejido expandible que se congestiona con sangre en la erección del pene o el clítoris (Christianson, D. W., *Acc. Chem. Res.* 38:191-201 (2005)).

La erección del pene, en particular, es un proceso hemodinámico que implica un mayor flujo arterial de entrada y un flujo venoso de salida limitado tras el estímulo sexual central o periférico (Musicki, B. y col., *Biol. Reprod.* 70:282-289 (2004)). La participación de NO, generado tanto por NO sintasa endotelial (eNOS) como por la NO sintasa penil neuronal (PhNOS) como mediador principal de la erección del pene está muy documentada. NO se difunde hacia el tejido del músculo liso adyacente estimulando la guanililciclase para producir guanosin monofosfato cíclico (cGMP) causando así la relajación del cuerpo cavernoso (Ferrini, M. y col., *Biol. Reprod.* 64:974-982 (2001)). A la inversa, se termina la erección cuando las fosfodiesterasas (PDEs) específicas de cGMP hidrolizan cGMP en 5'-GMP causando la contracción del músculo liso (Firoozi, F. y col., *Br. J. Urol. Int.* 96:164-168 (2005)). Por tanto, L-Arginina y los fármacos que actúan sobre la ruta L-Arginina-NO son atractivos como medios terapéuticos para DE. Asimismo, está muy extendido el uso de inhibidores selectivos de PDEs como citrato de Sildenafil (Viagra®), que inhiben la degradación de cGMP y, en consecuencia, prolongan la erección. No obstante, Sildenafil tiene un efecto vasodilatador e hipotensor sistémico que provoca un amplio abanico de efectos secundarios comenzando por cefaleas y puede incluso ser mortal (Cohen, J. S., *Ann. Pharmac. Ther.* 35:337-342 (2001)).

Con frecuencia, se han explorado los "nutracéuticos" de L-Arginina como remedios para la excitación sexual masculina y femenina. Por ejemplo, dosis suprafisiológicas a largo plazo o como suplemento de L-Arginina dietaria potenciaron la presión intracavernosa y la función eréctil en ratas (Moody y col. 1997) y en hombres, respectivamente. Los suplementos de L-Arginina a largo plazo mejoraron la DE en hombres con un metabolismo de

óxido nítrico anormal (Zorgniotti y Lizza 1994), al mismo tiempo que en otro estudio con mujeres, el suplemento nutricional de L-Arginina mejoró la satisfacción de la vida sexual en general en un 73,5% de los sujetos sometidos al ensayo (Ito, T. Y. y col., J. Sex Marital Ther. 27:541-549 (2001)). Por otra parte, NOS no es la única enzima que afecta a la erección del pene; arginasa comparte su único sustrato arginina y se coexpresa con NOS en el tejido del músculo liso de los genitales masculinos y femeninos. Por lo tanto, la inhibición de arginasa puede potenciar los procesos fisiológicos no dependientes de NO necesarios para la excitación sexual. Dado que muchos inhibidores de arginasa no presentan ningún efecto aparente sobre la presión arterial sistémica, ha pasado a ser otro potencial objetivo para el tratamiento de disfunción sexual (Christianson, D. W., Acc. Chem. Res. 38:191-201 (2005)).

Arginina en infertilidad de embarazo: la arginina es necesaria para una espermatogénesis normal en los hombres (Appleton, J., Altern. Med. Rev. 7:512-522 (2002)). Hace más de 50 años, los investigadores observaron que alimentar a un hombre adulto con una dieta deficiente en arginina durante nueve días disminuía el recuento de espermatozoides en un 90% y aumentaba el porcentaje de espermatozoides no móviles multiplicándose por 10 (Holt, L. E. Jr. y Albanese, A. A., Trans. Assoc. Am. Physicians 58:143-156 (1944)). La administración oral de 0,5 g de arginina-HCl al día a hombres infértiles durante varias semanas aumentó notablemente el recuento y motilidad de los espermatozoides en la mayoría de los pacientes sometidos a ensayo y tuvo como resultado embarazos exitosos (Tanimura, J., Bull. Osaka Med. School 13:84-89 (1967)). En otros estudios preliminares se registraron efectos similares en los índices de oligospermia y la concepción (Tanimura, J., Bull. Osaka Med. School 13:84-89 (1967); De-Aloysio, D. y col., Acta Eur. Fertil. 13:133-167 (1982)) y una mejor fertilidad. Sin embargo, cuando los recuentos de espermatozoides basales fueron inferiores a 10 millones/ml, la suplementación con arginina no pudo ayudar (Mrroueh, A., Fertil. Steril. 21:217-219 (1970); Appleton, J., Altern. Med. Rev. 7:512-522 (2002)).

La suplementación con arginina oral para mujeres con una escasa respuesta a la fertilización *in vitro* mejoró la respuesta ovárica, la receptividad endometrial y la tasa de embarazo en un estudio (Battaglia, C. y col., Hum. Reprod. 14:1690-1697 (1999)). Adicionalmente, la infusión de arginina intravenosa (30 g durante 30 minutos) en mujeres con contracciones uterinas prematuras, disminución de la contractilidad uterina transitoria (Facchinetti, F. y col., J. Perinat. Med. 24:283-285 (1996)). Otras pruebas derivadas de estudios con seres humanos y animales indicaron que el óxido nítrico inhibe la contractilidad uterina durante el embarazo y pueden ayudar, y por lo tanto actuar, contra el parto y alumbramiento prematuro (Appleton, J., Altern. Med. Rev. 7:512-522 (2002)).

En pacientes con cistitis intersticial (CI), la arginina oral durante seis meses disminuyó significativamente las molestias el vaciado urinario, el dolor abdominal y el dolor vaginal/uretral. La frecuencia urinaria durante el día y la noche también se redujo de manera significativa (Smith, S. D. y col., J. Urol. 158:703-708 (1997); Appleton, J., Altern. Med. Rev. 7:512-522 (2002)).

L-Lisina: L-Lisina es un aminoácido esencial básico; tiene un peso molecular de 146,19 g/mol, y lleva una carga positiva a un pH fisiológico. Aunque el D-estereoisómero de lisina no es biológicamente activo, L-Lisina es un aditivo alimentario conocido para los seres humanos y animales (Cynober, L. A. Metabolic and therapeutic aspects of amino acids in clinical nutrition. 2ª ed. CRC Press LLC, Boca Raton, EE.UU. (2003)). La L-Lisina ingerida es absorbida desde el lumen del intestino delgado hacia los enterocitos por transporte activo. Una porción de la misma se metaboliza dentro de los enterocitos y el resto es transportado a través de la circulación portal al hígado para participar en la biosíntesis de proteína o para ser metabolizada en ácido semialdehído L-alfa- aminoalípico, que se metaboliza posteriormente en acetoacetil-CoA. La L-Lisina que no se metaboliza en el hígado es transportada a diversos tejidos del cuerpo (Cynober, L. A. Metabolic and therapeutic aspects of amino acids in clinical nutrition. 2ª ed. CRC Press LLC, Boca Raton, EE.UU. (2003)).

La Lisina tiene muchas funciones. Sirve como precursor de glucógeno, glucosa y lípidos o sirve directamente para la producción de energía. Se concentra en los músculos, promueve el crecimiento óseo y potencia la formación de colágeno (Voet, D. y Voet, J. G., Biochemistry. 3ª ed. John Wiley and Sons Inc., Nueva York (2004)). El colágeno es la matriz básica de los tejidos conectivos (véase lo anterior), la piel, el cartílago y el hueso. La deficiencia de lisina puede contribuir a un crecimiento y una inmunidad menores, a una salud espermática alterada, además de a un incremento del calcio urinario. Éste último hecho sugiere que la lisina adecuada puede ayudar a prevenir la osteoporosis a través de una menor absorción y deposición del calcio (Flodin, N. W., J. Am. Coll.Nutr. 16:7-21 (1997)). La L-Lisina se hizo popular como suplemento nutricional cuando algunos estudios demostraron que puede disminuir la tasa de recurrencia de infecciones por *herpes simplex* y estimular la secreción de la hormona del crecimiento (véase más adelante).

Dosis recomendadas, efectos secundarios y contraindicaciones: Las dosis de los aminoácidos como suplementos que se han explicado pueden variar mucho dependiendo de las afecciones que se vayan a tratar. No obstante, se estima que las necesidades dietarias normales del aminoácido esencial lisina para un ser humano medio oscilan entre 0,75 y 1 g al día para evitar problemas de deficiencia. Las dosis de arginina utilizadas en la investigación clínica han variado considerablemente, desde tan solo 0,5 g al día para oligospermia hasta tanto como 30 g al día para cáncer, preeclampsia y contracciones uterinas prematuras. No se han notificado efectos adversos significativos acerca de la suplementación de los aminoácidos explicados a lo largo del presente artículo. No obstante, muchas de las aplicaciones clínicas mencionadas han de ser confirmadas con estudios más controlados, así como estudios a largo plazo. El presente artículo resume únicamente los informes positivos sobre los efectos de estos aminoácidos, si bien existen contra-informes en los que muchos de estos efectos no se pudieron confirmar (para una revisión

completa véase Flodin, N. W., J. Am. Coll. Nutr. 16:7-21 (1997); Appleton, J., Altern. Med. Rev. 7:512-522 (2002); y Dean, W. and Pryor, K., Growth hormone: amino acids as GH secretagogues - a review of the literature. Vit. Res. News; disponible en at www.vrp.com (2001)).

Dipéptidos y mezclas de aspartato, arginina y lisina en terapia clínica: Se administran favorablemente aspartato y arginina en combinación como dipéptidos o en mezclas para proporcionar una mayor biodisponibilidad para ambos aminoácidos y aumentar así su efectividad en dosis más bajas. Se investigó la administración de ambos aminoácidos durante varios estudios para el tratamiento de diferentes trastornos fisiológicos. En general, ambos aminoácidos se pueden administrar en la forma dipéptido para todas las aplicaciones antes mencionadas para los aminoácidos libres. En la siguiente sección se resumen, no obstante, los resultados de la investigación señalados específicamente para la forma de administración combinada. Dichos informes se derivan de estudios sobre terapia de heridas, sobre enfermedades endocrinas, tales como alteraciones de la secreción de GH y el potenciamiento del rendimiento atlético, o sobre enfermedades genitourinarias, entre las que se incluyen disfunción eréctil e infertilidad masculina y femenina.

En 1965 se sometió a ensayo clínico arginina-aspartato por primera vez contra astenia física y psíquica (Duruy, A. y Baujat, J. P., Vie. Med. Int. 9:1589 (1965)) y más tarde se confirmó su efecto positivo (Duruy, A., Med. Int. 1:203 (1966)). Otros estudios demostraron que la administración a largo plazo de arginina-aspartato mejora el metabolismo aeróbico y el rendimiento (Sellier, J., Rev. Med. Toulouse 5:879 (1979); Schmid, P. y col., Leistungssport 10:486-495 (1980)). La suplementación con arginina-aspartato potenció la cicatrización de heridas y las funciones inmunes de linfocitos T (Barbul, A. y col., Surgery 108:331-336 (1990)). Se han señalado también otros posibles efectos en el rendimiento atlético; por ejemplo en el metabolismo lipídico, de modo que el consumo de arginina durante 2 semanas solamente causó el hundimiento de las concentraciones de colesterol total (Hudson, M. y col., J. Parenter. Enteral Nutr. 19:227-230 (1995)). Por tanto el uso de L-Arginina-L-Aspartato (Sargenor®) está muy extendido entre atletas y pacientes para aumentar los efectos del entrenamiento, así como para tolerar el ejercicio. Se han notificado efectos impresionantes en el rendimiento de resistencia en este campo tras un consumo prolongado de L-Arginina-L-Aspartato causando una disminución de las concentraciones de lactato en sangre y el ritmo cardíaco durante ejercicios submáximos y un mayor consumo de oxígeno con aumentos de la carga de trabajo (Schmid, P. y col., Leistungssport 10:486-495 (1980); Sellier, J., Rev. Med. Toulouse 5:879 (1979); Burtcher, M. y col., J. Sports. Sci. Med. 4:314-322 (2005)).

La suplementación de la dieta con 30 g/d de arginina aspartato durante 2 semanas a voluntarios humanos sanos potenció la acumulación de colágeno en las heridas significativamente (Witte, M. B. and Barbul, A., Wound Rep. Reg. 11:419-423 (2003)). Cuando se administraron 250 mg/kg/día de arginina aspartato oral a cinco sujetos sanos con edades comprendidas entre 20 y 35 años durante siete días, se produjo un aumento del 60% de GH durante el sueño de onda lenta (Besset, A. y col., Acta Endocrinol. 99:18-23 (1982)). Otro grupo de investigadores consiguió resultados prometedores después de tratar a 12 adultos normales con una dosis grande (37,5 g) de arginina aspartato oral, que causó una liberación reducida pero significativa de hGH en suero (Elsair 1987). Esto ha hecho que arginina-aspartato sea interesante para los culturistas que desean aprovechar las propiedades anabólicas de hGH (Macintyre, J. G., Sports Med. 4:129-142 (1987)).

Asimismo se ha señalado que L-Arginina-L-Aspartato administrado por vía oral induce efectos positivos en el tratamiento de algunos tipos de cáncer. Por ejemplo, indujo efectos antimetastáticos en carcinoma quístico adenoide de glándula salivar en ratones acompañados de inhibición de la formación de focos metastáticos pulmonares y una supervivencia prolongada. Los experimentos posteriores *in vitro* e *in vivo* confirmaron estos resultados (Li, F. y col., Chin. J. Stomatol. 36:464-466 (2001); Li, F. y col., Chin. J. Stomatol. 37:87-89 (2002); Appleton, J., Altern. Med. Rev. 7:512-522 (2002)).

En el campo de la salud dental, se observó que la placa, el material orgánico esponjoso que se adhiere fuertemente a las superficies del diente, aceptaba péptidos de determinado tamaño y forma dentro de su matriz. Además, se demostró que se almacenaban en la placa péptidos de 2 a 4 unidades de aminoácido, siendo una o más de ellas arginina, protegidas de la dilución para restaurar de forma eficiente el pH de la boca a un nivel no carioso (6,1 o más). Se demostró además que estos oligómeros son eficaces incluso cuando se proporcionan de forma simultánea a carbohidratos. Esto sugirió la inclusión de dichos péptidos en productos dentales comunes, tales como pastas dentífricas y chicles (Kleinberg, I., Solicitud de patente EE.UU 4225579 (1980)).

También se ha aplicado L-Arginina-L-Aspartato para el tratamiento de trastornos genitourinarios. DE es común en un 25% de hombres con edades comprendidas entre 45 y 70 años de edad con disfunción eréctil moderada y en un 10% con disfunción eréctil severa (Kernohan, A.F. B. y col., Br. J. Clin. Pharmacol. 59:85-93 (2004)). Recientemente, se ha utilizado "L-arginil aspartato" como componente de varios productos farmacéuticos para el tratamiento de DE en los hombres, como Prelox® (Lamm, S. y col., Eur. Bull. Drug Res. 11:29-37 (2003)). Los estudios clínicos sobre los componentes de Prelox® demostraron una mejora en la función eréctil en un 5% y 92% de los cuarenta hombres con DE que recibieron 3 dosis de 1 g de "L-arginil aspartato" (Sargenor®) (1,7 g de arginina al día) en solitario, o en combinación con Pycnogenol® (estimula la secreción de NOS), respectivamente (Stanislavov, R. y Nikolova, V., J. Sex Marit. Ther. 29:207-213 (2003)). Durante el estudio a largo plazo, se trató primero solo con Sargenor® a cincuenta hombres con edades comprendidas entre 45 y 60 años que presentaban DE, una disminución del volumen de semen, una reducción de la motilidad de espermatozoides y anomalías morfológicas de los espermatozoides

en solitario durante 1 mes. El 10% de estos hombres experimentó una erección normal. Tras la adición de Pycnogenol® al tratamiento durante el segundo mes, el porcentaje de hombres con erección normal aumentó a un 80%. Se continuó el tratamiento durante un período de un año, tras el cual la calidad del esperma mejoró significativamente y 42% de las parejas lograron el embarazo (Stanislavov, R. y Nikolova, V., Int. J. Impot. Res. 14(4):S65 (2002); Lamm, S. y col., Eur. Bull. Drug Res. 11:29-37 (2003)). Esta última observación confirmó los estudios sobre el uso de arginina-aspartato, en los que aumentó el recuento y calidad espermática tras varios meses de suplementación (Tanimura, J., Bull. Osaka Med. School 13:84-89 (1967); Schellen, T. M. and Declerq, J. A., Dermatol. Monatsschr. 164:578-80 (1978); De-Aloysio, D. y col., Acta Eur. Fertil. 13:133-167 (1982)) y mejoró la fertilidad (Schacter, A. y col., J. Urol. 110:311-13 (1973); Schacter, A. y col., Int. J. Gynaecol. Obstet. 11:206-209 (1973)).

Apenas existen informes clínicos sobre dipéptidos que consiste en aspartato y lisina ya que este dipéptido no está disponible en grandes cantidades. No obstante, esta forma de dipéptido de lisina podría ser eficaz en los campos de aplicación conocidos para lisina libre y sus sales (véase lo anterior), en personas con deficiencia genética en los transportadores de lisina o, simplemente, como aditivo alimentario, con una mayor biodisponibilidad que la lisina libre, para seres humanos y animales. La arginina y la lisina funcionan sinérgicamente para liberar hormona del crecimiento (GH) (Suminski, R. R. y col., Int. J. Sport Nutr. 7:48-60 (1997)) y sus concentraciones son muy importantes en la nutrición del ser humano y animal (Armed, I. y Khan, M. A., Aquacult. Nutr. 10:217-225 (2004)). Las relaciones lisina:arginina bajas tienen un efecto hipocolesterolemico (Sánchez, A. y col., Nutr. 38:229-238 (1998)), de modo que se han hecho patentes para mezclas de proteína con una relación Arg: Lys de al menos 5,5 : 1 para su utilización con enfermedades cardiovasculares (Radha, C. y col., Solicitud de patente 7091001 (2006)). En contraposición, y dado que las proteínas del virus *herpes simplex* son ricas en L-Arginina, se sabe que una dieta con una relación alta de lisina con respecto a arginina en la dieta ayuda a reducir la replicación viral, los períodos de cicatrización y la citopatogenicidad durante los brotes (Griffith, R. S. y col., Dermatologica 156(5): 257-267 (1978)). Por lo tanto, en la prevención y el tratamiento de herpes, se sugiere la utilidad de evitar los alimentos ricos en arginina y consumir más alimentos ricos en lisina.

Las investigaciones recientes han señalado que la terapia en la que se utiliza L-lisina y L-arginina en combinación es útil, y posiblemente incluso mejor, que la combinación arginina/ornitina para estimular hGH y, en virtud de ello, mejorar la construcción de músculo, la ganancia de peso y el soporte inmunológico. En 15 sujetos de sexo masculino sanos con edades comprendidas entre 15 y 20 años, 1,2 g de arginina piroglutamato combinado con hidrocloreuro de L-lisina elevó significativamente los niveles de GH desde el doble a ocho veces más el valor inicial tras consumir la mezcla de aminoácido (Isidori, A. y col., Curr. Med. Res. Opin. 7:475-481 (1981)). Otro estudio indicó que la ingestión de 1,5 g de arginina y 1,5 g de lisina consumidos en condiciones de reposo provoca un agudo aumento de la secreción de GH (Suminski, R. R. y col., Int. J. Sport Nutr. 7:48-60 (1997)).

Para simular las condiciones naturales dentro del tracto digestivo, se utilizó el "jugo" intestinal preparado como inóculo y como suplemento nutricional en tubos de Hungate anaeróbicos que contenían CGP. La degradación completa de CGP en todos los tubos indica que se puede degradar fácilmente CGP en dicho entorno anaeróbico similar al de los tractos digestivos. Esto se confirmó también por los cortos períodos de degradación, que son análogos a los observados previamente para bacterias degradadoras de CGP anaeróbicas estrictas y facultativas (Obst, M. y col., Appl. Environ. Microbiol. 71:3642-3652 (2005); Sallam, A. y col., Presentado para publicación (2008)).

Durante este estudio y por primera vez se ha demostrado que las bacterias degradadoras de CGP están muy extendidas en los tractos digestivos de animales, aves y peces (Tablas 1, 2). Estudios anteriores sobre muestras del entorno demostraron también la diversidad morfológica entre las colonias degradadoras de CGP observadas durante los procedimientos de purificación y después entre los cultivos axénicos resultantes, lo que demostró la amplia extensión de degradadores de CGP entre procariotas (Tabla 2). Por otra parte, la capacidad de degradar CGP parece estar más extendida entre especies de géneros concretos; las investigaciones sobre la degradación de CGP extracelular hasta la fecha demuestran que los degradadores de CGP están muy extendidos entre los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* (Obst, M. y col., J. Biol. Chem. 277:25096-25105 (2002); Obst, M. y col., Biomacromolecules 5:153-161 (2004); Sallam, A. y col., este estudio ha sido presentado para publicación (2008)). No obstante, esto podría estar asociado a las condiciones de laboratorio aplicadas, que podrían haber favorecido estas bacterias, o simplemente debido al predominio de este género de bacterias en la naturaleza. Por otra parte, en contraposición con las cepas de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, es enormemente difícil traer a cultivos axénicos muchas bacterias degradadoras de CGP sin perder su capacidad de degradar CGP (Obst, M. y col., Appl. Environ. Microbiol. 71:3642-3652 (2005); Krug, A., Diplom thesis, Institut für Molekulare Mikrobiologie und Biotechnologie, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster, Alemania (2001)) y normalmente se descartan.

Se observó la degradación parcial de CGP en cultivos axénicos únicamente en condiciones anaeróbicas, y solamente para 8 cepas de las 46 cepas que degradaron CGP anaeróbicamente. Una posible razón de ello es la falta de interacciones naturales entre estas cepas y las demás como en su entorno natural, que suele causar a menudo la acumulación o agotamiento de sustancias limitantes o necesarias, respectivamente. Esto se corresponde con las observaciones anteriores sobre el formador de endosporas anaeróbicas estrictas cepa KI de *S. hongkongensis*, en las que se potenciaron en gran medida el crecimiento y la utilización de CGP en presencia de su coaislado cepa G de *Citrobacter amalonaticus* (Obst, M. y col., Appl. Environ. Microbiol. 71:3642-3652 (2005)).

Entre los ocho aislados identificados, varias cepas presentaron capacidad de degradación de CGP anaeróbica, si bien pertenecen a géneros conocidos como aeróbicos, tales como *Bacillus* o *Pseudomonas*. Sin embargo, se sabe que las cepas de *B. subtilis* y *B. megaterium* crecen anaeróbicamente y se sabe que algunas reducen nitrato (Glaser, P. y col., J. Bacteriol. 177:1112-1115 (1995)). De manera similar, se ha investigado en profundidad el crecimiento anaeróbico y la reducción de nitrato de los miembros del género *Pseudomonas* (Sallam, A. y col., Presentado para publicación (2008)). Se sabe asimismo que especies de *Micromonospora*, *Streptomyces* y *Brevibacillus* son anaeróbicas facultativas (Cochrane, V. W., Annu. Rev. Microbiol. 15:1-26 (1961); Borodina, I. y col., Genome Res. 15:820-829 (2005); Baek, S. H. y col., Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56:2665-2669 (2006)). En general, las investigaciones recientes acerca de la degradación de CGP apuntan hacia una amplia extensión de bacterias degradadoras de CGP entre las anaerobias facultativas.

Si bien CGP y sus dipéptidos son sustancias proteináceas simples de origen natural, se necesitan estudios clínicos para llevar estas sustancias al mercado. La extensión de bacterias de bacterias degradadoras de CGP en la flora intestinal de mamíferos, aves o peces sometida a ensayo durante el presente trabajo proporciona la primera evidencia de que CGP administrada por vía oral podría ser degradada de forma rápida y fácil al menos microbianamente. El aislamiento de dichas bacterias desde el tracto digestivo inferior de diferentes animales y aves (Tabla 1) indica que, si la digestión de CGP no se completó en el tracto digestivo superior, posiblemente continuaría en la parte inferior.

Los análisis de HPLC pusieron de manifiesto que los dipéptidos eran los productos de degradación de CGP de los 62 aislados. No se produjo ningún oligómero de dipéptido de orden superior, como tetrapéptidos (β -Asp-Arg)₂, desde CGP. Esto está de acuerdo con el efecto de las CGPasas de la cepa BI de *P. anguilliseptica* (Obst, M. y col., J. Biol. Chem. 277:25096-25105 (2002), cepa KI de *S. hongkongensis* (Obst, M. y col., Appl. Environ. Microbiol. 71:3642-3652 (2005)) y cepa DIP1 de *P. alcaligenes* (Sallam, A. y col., Presentado para publicación (2008)). Únicamente en el caso de la cepa BAC 19 de *Bacillus megaterium*, se detectaron dichos oligómeros de orden superior (Obst, M. y col., Biomacromolecules 5:153-161 (2004)). La *Espirulina* se conoce desde hace siglos por sus efectos nutricionales y terapéuticos y se sigue consumiendo como alimento en muchos países todavía hoy. Se sabe que el contenido en proteínas de la *Espirulina* alcanza más de 60% (Narasimha, D. L. R. y col., J. Sci. Food Agric. 33:456-460 (1982)). La presencia de CGP en los productos comerciales de *Spirulina platensis* indica que CGP podría participar en el efecto de bienestar del consumo regular de *Espirulina*. No obstante, el contenido de CGP determinado en las muestras analizadas varió en gran medida y fue relativamente bajo. Esto concuerda con los estudios anteriores sobre la acumulación de CGP en cianobacterias, según los cuales se sabe que hay muchos factores que afectan a la acumulación de CGP en cianobacterias, sabiéndose que la acumulación de CGP es afectada por muchos factores y que varía en consecuencia (Elbahloul, Y. y col., Appl. Environ. Microbiol. 71:7759-7767 (2005)). Por otra parte, seguramente, los productos de *Espirulina* comercializados han pasado por numerosas pruebas clínicas y toxicológicas antes de obtener su licencia para su comercialización. Esto indica que la CGP y los dipéptidos de CGP extraídos no deberían inducir ningún efecto tóxico al consumirlos por vía oral. Por otra parte, los dipéptidos de CGP se consumen y utilizan normalmente para el crecimiento en bacterias, y no presentaron ningún efecto bacteriostático ni bactericida durante las investigaciones dirigidas (no se muestran los datos). En general, los efectos y aplicaciones conocidos de *Espirulina* son muy similares a los demostrados para la arginina, hecho que señala que una parte de dichos efectos pueda deberse realmente al contenido en arginina (aproximadamente 6%) que incluye el de CGP.

Las bacterias poseen tres tipos de sistemas de transporte de péptidos, dos, oligopéptido permeasa (Opp) y dipéptido permeasa (Dpp), que pertenecen a la gran familia de transportadores ABC (cartucho de unión a ATP) y una para di- y tripéptidos que pertenecen a la familia (de transportadores de péptido) PTR. Únicamente este último sistema se conserva en los organismos eucarióticos superiores, empezando por levaduras (Daniel, H. y col., Physiology 21:93-102 (2006)). En los mamíferos, el sistema portador de di- y tripéptidos PEPT (familia SLC15) incluye 2 variantes: PEPT1 (SLC15A1) intestinal y la isoforma renal PEPT2 (SLC15A2). Transportan prácticamente todos los di- y tripéptidos posibles de manera estereoselectiva con preferencia de L- α -aminoácidos y sus derivados. Los péptidos que contienen solamente D- o cuatro o más aminoácidos no son aceptados. Dado que PEPT1 tiene una expresión prominente en todo el intestino delgado y debido a su alta capacidad de transporte, todos los sustratos de fármaco de PEPT1 presentan una excelente disponibilidad oral y, por tanto, PEPT1 ha pasado a ser un objetivo principal para la liberación de fármaco (Daniel, H. y col., Physiology 21:93-102 (2006)). Los L-aminoácidos constituyentes de los dipéptidos CGP, Asp-Arg y Asp-Lys (CGP recombinante) se unen a través de enlaces peptídicos α - β . Este tipo de unión y la estéreo-estructura de dipéptidos hace suponer sólidamente que podrían actuar como sustratos para el sistema PEPT y que pueden ser transportados desde el lumen del intestino de mamífero cuando se consumen. Por lo tanto, el uso de CGP y/o sus dipéptidos sería un enfoque ideal para la administración oral de los aminoácidos constituyentes como agentes terapéuticos y/o nutricionales.

Desde hace siglos se conocen los valores nutricionales y clínicos de los aminoácidos, incluyendo los que constituyen CGP como aspartato, arginina y lisina, y los que pueden integrarse todavía en su estructura como citrulina, ornitina, canavanina o glutamato. Se ha demostrado que las combinaciones de oligómero sintéticas de estos aminoácidos tienen una biodisponibilidad más alta que los aminoácidos libres y, por lo tanto, han sido frecuentemente objeto de investigación y se han aplicado en nutrición y terapia (véase lo anterior). CGP representa una fuente natural ideal para dichos oligómeros y, es de esperar, que sean más eficaces a dosis más bajas que los aminoácidos que los constituyen en su forma libre. Por consiguiente, actualmente, sigue investigándose la absorción, seguridad y efecto

de CGP y sus dipéptidos. Por otra parte, los estudios sobre otros aminoácidos que integran CGP presentaron unos resultados prometedores (no se muestran los resultados). Los dipéptidos resultantes pudieron aplicarse en diversos campos terapéuticos; por ejemplo, aspartato-ornitina en el tratamiento de enfermedades hepáticas (Kircheis, G. y col., *Hepatology* 25:1351-1360 (1997)). En consecuencia, todas las futuras alteraciones de la estructura de CGP aumentarían la gama de dipéptidos de CGP y, por consiguiente, extenderían su alcance de aplicación como productos terapéuticos y/o suplementos nutricionales.

Se estableció un proceso trifásico para una producción a gran escala de β -dipéptidos de cianoficina (CGP). La fase I se basa en un procedimiento de extracción de ácido optimizado para el aislamiento técnico de CGP desde biomasa; se obtuvo un total de 704 g de CGP pura, que contenía estructuralmente aspartato, arginina y un poco de lisina. La Fase II representa la producción fermentativa de una CGPasa extracelular (CphE); se produjo la enzima desde la cepa DIP1 de *Pseudomonas alcaligenes*, a escala 500 l y utilizando 1 g/l de citrato como único sustrato; se obtuvieron 17,5 g de polvo de proteína en bruto y presentó una alta actividad de degradación sobre CGP. La fase III comprende la degradación de CGP vía cphE; se degradaron 250 g de CGP en dipéptidos β -aspartato-arginina y β -aspartato-lisina con un grado de pureza de más de 99% (CCF, HPLC). La eficiencia global de la fase II fue 91%, al tiempo que se recuperó un 78% (p/p) de la CphE utilizada y presentó una actividad sostenida sobre CGP. El proceso establecido depende de los materiales y equipos con las normas industriales y aplicables al respecto para cada escala deseada.

Se sabe que las cepas de *P. alcaligenes*, incluyendo la cepa DIP1, desarrollan una amplia gama de sustratos y que requieren cantidades mínimas de éstos. La alta productividad enzimática de dichas cepas constituye asimismo una de las principales razones para su aplicación en la producción fermentativa de lipasas extracelulares (WO 95/30744; Gerritse, G. y col., *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2644-2651 (1998); Moore, E. R. B. y col. Mai 1999. *Pseudomonas: Nonmedical*. In Moore y col. (ed.), *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, 3ª edición, release 3.0, Springer-Verlag, Nueva York)). Estas características, sumadas a la alta estabilidad y actividad de la CGPasa desde la cepa DIP1 (Sallam, A., y A. Steinbüchel, *Appl. Environ. Microbiol.* 74(11):3434-3443 (2008)), fueron los factores principales para considerar esta cepa ideal para el proceso técnico diseñado.

Antes de crear el proceso trifásico final, se llevaron a cabo varias pruebas para alcanzar la misma meta cultivando la cepa DIP1 directamente sobre CGP; sin embargo, esa estrategia resultó menos eficiente debido al rápido consumo de dipéptidos CGP de las células en crecimiento; durante los procedimientos del proceso trifásico redefinidos se evitó el problema, excluyéndose las células de la cepa DIP1. Por otra parte, las soluciones de dipéptido obtenidas por cultivo directo presentaron grandes volúmenes y, por lo tanto, resultaron enormemente difíciles de manejar; asimismo, la presencia de pequeñas proteínas y sales en las soluciones de dipéptido resultantes representaron otra desventaja más de esa estrategia. En contraposición, son totalmente controlables las concentraciones de CGP degradada a través del proceso trifásico, así como el tiempo para la degradación. Siendo así, las soluciones de dipéptido resultantes se restringen a volúmenes pequeños y fáciles de manejar. La concentración más alta ensayada (50 g/l) es uno de los aspectos que aún se pueden optimizar para aplicaciones futuras haciendo así que el proceso sea más eficiente desde el punto de vista económico.

Los factores económicos son por lo general de gran importancia para los procesos técnicos, de manera que los resultados obtenidos durante la optimización del medio y la utilización del sustrato se consideraron satisfactorios; el citrato, que es un sustrato económico en cantidades técnicas, y que fue ideal para la cepa aplicada como único sustrato, había sido aplicado anteriormente para la producción fermentativa de lipasas extracelulares (Gerritse, G. y col., *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2644-2651 (1998)), sin embargo, la necesidad de un medio optimizado para la fase de producción de CphE en bruto (Fase II) se materializó en la necesidad de un control preciso del grado de turbiedad durante la fermentación, especialmente durante la fase de inducción y degradación. Las experiencias previas con la degradación de CGP experimental demostraron que medios turbios, así como un fuerte crecimiento de células pueden ser engañosos; además, un mejor crecimiento de células no significó esencialmente una mayor producción de CGPasa extracelular (datos sin publicar).

Se optimizó el procedimiento de extracción de ácido de CGP de Frey, K. M. y col., *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3377-3384 (2002), que se había aplicado con éxito durante estudios previos, para que fuera adecuado para el aislamiento de CGP pura a partir de cualquier cantidad técnica de biomasa. El cambio más efectivo con respecto al procedimiento original fue la etapa de filtración estéril de la CGP en solución; este procedimiento garantizó la completa eliminación de cualquier residuo celular insoluble en el HCl diluido. En contraposición, las etapas de mayor purificación con ácido diluido y agua, pueden conllevar innecesariamente una mayor pérdida de CGP, hecho que explica la diferencia entre la CGP obtenida y la cantidad esperada. La pérdida de CGP, así como el tiempo necesario para su extracción, se pueden minimizar centrifugando CGP en lugar de dejarlo sedimentarse a 4 °C.

Alternativamente, se puede aumentar drásticamente la productividad global de este procedimiento de extracción si se aplica un instrumento efectivo, como por ejemplo, un flujo cruzado; en este caso, se necesitan 2 cartuchos con 2 puntos de corte diferentes: uno más grande y el otro más pequeño que el tamaño molecular de la CGP que se va aislar; los 2 cartuchos se han de aplicar para la filtración alterna de CGP en los estados de CGP, disuelto y precipitado, respectivamente. No obstante, los precios relativamente altos y la vida aún limitada de dichos cartuchos de ultrafiltración hacen que su aplicación sea cuestión de costes.

Durante la producción fermentativa de la CphE en bruto (Fase II), se empleó la inducción con la CGP dentro de la fase estacionaria para garantizar una producción máxima de CphE, y para achacar los cambios de turbiedad exclusivamente a la cantidad de CGP en el medio.

El pH del medio aumentó para exceder el intervalo tolerado (pH 6,9 a 7,5) y se controló mediante la adición de HCl; lo más probable es que esto se deba a que las células de la cepa DIP1 de *P. alcaligenes* liberan amoníaco. Durante las investigaciones sobre la degradación de CGP, se documentó un comportamiento fisiológico similar para esta cepa (Sallam, A., y A. Steinbüchel, Appl. Environ. Microbiol. 74(11):3434-3443 (2008)).

El idéntico grado de pureza de los dipéptidos de CGP resultantes antes y después de los diferentes sistemas de filtración probados se debe claramente a la inicial falta de impurezas en la solución de dipéptido original. Esto representa otra ventaja para la aplicación de un proceso enzimático definido en comparación con las estrategias de cultivo directo con células bacterianas. Por otra parte, fue de esperar, y lamentablemente inevitable, la pérdida cuantitativa de dipéptidos debido a la filtración; se sabe que dichas pérdidas son causadas por diversos factores generales: el material de filtro, los puntos de corte y/o las características de la propia sustancia filtrada. Esto explica también la pérdida de un 9% de CGP y un 22% de CphE en bruto durante la fase de degradación (Fase III). Además, solamente se sometieron a ensayo membranas de filtro nuevas (COPs de 0,5-10 kDa), por tanto, lo más probablemente es que las cantidades perdidas de dipéptidos de CGP estén unidas a las superficies de membrana hasta la saturación.

Aunque la efectividad del proceso global de un 91% es bastante alta, se pueden mejorar aún más varios aspectos y, por lo tanto, están en vías de optimización; dichos aspectos incluyen una mayor productividad de CphE en bruto, posibles estrategias de purificación técnica para CphE y condiciones más eficaces para la fase de degradación (datos sin publicar). El valor comercial de los dipéptidos de CGP está directamente relacionado con los costes de producción de la propia CGP, si bien, durante los últimos años, se ha investigado intensamente la producción de CGP y se ha optimizado mediante el uso de diversas cepas bacterianas, en virtud de lo cual, se están consiguiendo cada vez más cantidades de CGP utilizando sustratos nuevos más adecuados y económicos; parece ser que estos avances van rápido en la dirección de la producción de CGP comercial (véase lo anterior); así pues, ha sido necesario que se comercialicen otros poliaminoácidos bacterianos como poli(ácido glutámico) y poly(ϵ -lysine), tanto para aplicaciones técnicas como alimentarias (revisado por Oppermann-Sanio F. B. y col., Naturwissenschaften 89:11-22 (2002); Obst, M. y col., Biomacromolecules 5:1166-1176(2004)). Hasta entonces, el valor biomédico de los dipéptidos de CGP puede de hecho mantener una relación de equilibrio con los costes de producción de CGP actuales. Por lo tanto, los efectos biomédicos de los dipéptidos de CGP se están investigando actualmente (Sallam, A., y A. Steinbüchel. 2007c. Potential of cyanophycin and its β -dipéptidos as possible additives in therapy, food and feed industries).

Se optimizó un proceso biotecnológico aplicado anteriormente para la producción a gran escala de β -dipéptidos a partir de cianoficina (CGP); el proceso original consistía en tres fases; Fase I: extracción a gran escala de CGP pura desde biomasa; Fase II: producción a gran escala de cianoficina en bruto (CphEa1) desde la cepa DIP1 de *Pseudomonas alcaligenes*; Fase III: degradación de CGP en sus péptidos. Se determinaron las condiciones de cultivo óptimas para la segunda fase: 2 g l⁻¹ de citrato, pH 6,5 y temperatura de cultivo 37 °C. La concentración óptima para CGP como inductor de CphEal fue 50 g l⁻¹, lo que representa 1/5 de la concentración aplicada previamente. Se obtuvieron concentraciones de enzima máximas tras 5 h de inducción. La misma concentración de dipéptidos de CGP demostró una eficiencia de inducción similar al cabo de 3 h solamente. Asimismo, una cantidad óptima de 4 g l⁻¹ de L-aspartato indujo CphEal, si bien con un 1/3 de eficiencia en comparación con CGP. Se purificó CphEal a través de la unión específica de sustrato sobre CGP. Se caracterizó la enzima purificada y resultó ser una serina proteasa con una actividad máxima a 50 °C y un pH 7-8,5. Se pudieron optimizar las condiciones para la Fase III del proceso original (degradación de CGP): pasando de 50 g l⁻¹ de CGP, 10 g l⁻¹ de CphEal en bruto e incubación durante 10 h a 30 °C a 100 g l⁻¹ de CGP, 10 g l⁻¹ de CphEal en bruto e incubación durante solamente 4 h a 50 °C. Se degradó CGP en los dipéptidos β -aspartato-arginina y β -aspartato-lisina, con un grado de pureza de más de 99% (HPLC). Estas optimizaciones supusieron que el proceso técnico fuera más eficiente en lo relativo al coste, el tiempo y el esfuerzo. Antes de la producción de CGP sobre protamilasa a una escala de fermentación de 500 l, los ensayos previos acerca de la carga disponible de protamilasa pusieron de manifiesto que 7% (vol/vol) era óptimo para la producción de CGP, si bien, durante el estudio previo de Elbahloul, Y. y col., Appl. Environ. Microbiol. 71:7759-7767 (2005) sobre la carga anterior de protamilasa, se observó que la concentración óptima era 6% (vol/vol). Esto se debe a que la protamilasa, que es un compuesto residual de la producción industrial de almidón, es un medio complejo con una composición que puede variar de una carga a otra y, por tanto, ha de ajustarse antes de la aplicación como medio de cultivo.

Durante la fermentación, y después de las primeras 6 h, se elevó la temperatura a 37 °C con el fin de inactivar la λ -represor (cl857) sensible a la temperatura dando cabida así a la inducción del gen (*CphA*) de CGP-sintasa. En este punto, las células de la cepa *E. coli* recombinante estuvieron todavía dos horas en la fase de crecimiento exponencial. Se demostró que este curso de fermentación era óptimo para la inducción de CGP-sintetasa, así como para una máxima acumulación intracelular de CGP (Frey, K. M. y col., Appl. Environ. Microbiol. 68:3377-3384 (2002)).

Asimismo, tras 6 h de fermentación, la turbiedad del medio presentó un salto repentino paralelo a un aumento de la agitación controlada automáticamente. Esto se puede explicar por la disminución del oxígeno en el medio como consecuencia de un fuerte crecimiento celular sumado a la elevación de la temperatura a 37 °C. Evidentemente, el contenido en oxígeno en el medio se redujo con respecto al mínimo ajustado previamente y provocó el aumento de la agitación automática, lo que llevó a su vez a una alta formación de espuma y burbujas de aire y en consecuencia a valores de DO850nm falsos. La adición manual de emulsión anti-espuma causó una rápida caída de la turbiedad alcanzando el nivel normal.

Se terminó la fermentación cuando se estimó microscópicamente la acumulación máxima de CGP en las células (al cabo de 15 h). No obstante, un análisis posterior de las muestras de fermentación indicó que podía haber sido un mejor momento de cosecha al cabo de 13 h de incubación. En ese momento, el contenido en CGP era de aproximadamente 13% (p/p de CDM) mientras que al cabo de 15 h, descendió a 10% (p/p de CDM). Esta pérdida se debió claramente a la imprecisión de la estimación microscópica del contenido en CGP que fue el único procedimiento posible durante la fermentación. Por otra parte, lo más probable es que la disminución del contenido en CGP se deba a las pérdidas de plásmido que tuvieron lugar con el tiempo durante la incubación (Elbahloul, Y. y col., Appl. Environ. Microbiol. 71:7759-7767 (2005)). Después de la extracción y la purificación del polímero, el análisis de HPLC puso de manifiesto un alto grado de pureza para CGP y que consistía en tres aminoácidos, aspartato (47,7 % molar), arginina (45,6 % molar) y lisina (6,8 % molar). SDS=PAGE demostró que CGP tiene un tamaño molecular de 25-30 kDa. Estas características se ajustan sólidamente con las de la CGP producida anteriormente con la misma cepa en varios medios (Frey, K. M. y col., Appl. Environ. Microbiol. 68:3377-3384 (2002); Elbahloul, Y. y col., Appl. Environ. Microbiol. 71:7759-7767 (2005)).

Recientemente, se ha aplicado un medio de sal mineral simple (medio SM) con 1 g l⁻¹ de citrato para una producción a gran escala de CphEal a partir de cepa DIP1 de *P. alcaligenes*. Este medio resultó favorable debido a su composición simple y económica, así como por la adecuación de la cepa utilizada (Sallam, A., y A. Steinbüchel. 2008b. Biotechnological process for the technical production of β-dipéptidos from cyanophycin. En preparación). No obstante, durante este estudio, aunque la concentración óptima de citrato para el crecimiento fue 6 g l⁻¹, no se produjo CphEal en dichos cultivos. La producción máxima de CphEal tuvo lugar en cultivos desarrollados sobre 2 g l⁻¹ de citrato; esto indicó que la enzima es inducida solamente en virtud de una limitación del sustrato. Otros experimentos en relación con la temperatura y el pH óptimos indicaron que 37 °C y un intervalo de pH de 5,5 a 7,5, óptimamente 6,5, eran los óptimos para la cepa DIP1 así como para la producción de CphEal. Esto potenció la eficiencia del proceso de producción, que se aplicó inicialmente sobre 1 g l⁻¹ de citrato, pH 7,5 y una temperatura de incubación de 30 °C (Sallam, A., y A. Steinbüchel. 2008b. Biotechnological process for the technical production of β-dipéptidos from cyanophycin. En preparación).

Las investigaciones ampliadas sobre la inducción de CphEal pusieron de manifiesto que solamente la quinta parte (50 mg l⁻¹) de la concentración de CGP aplicada previamente (250 mg l⁻¹) era suficiente para rendir el mismo efecto. También fue suficiente la misma concentración de dipéptidos de CGP (50 mg l⁻¹) para inducir CphEal con la misma eficiencia. No obstante, el corto período de incubación (3h) requerido hasta la cosecha para los cultivos inducidos con dipéptidos indica que los dipéptidos de CGP son los verdaderos inductores de CphEal y no la propia CGP. Asimismo, aspartato fue un inductor de CphEal satisfactorio pero, a diferencia de otros dipéptidos de CGP, se requirió una concentración de 4 g l⁻¹ y un mayor período de incubación de 5 h para una máxima producción de CphEal; esto representó tan sólo un tercio de la eficiencia de producción de CphEal con respecto a la de CGP o sus dipéptidos. Así pues, la elección del inductor en las aplicaciones futuras sí que dependiendo del coste y el caso.

Se observó que la tercera fase del proceso original (degradación a gran escala de CGP a través de CphEal en bruto) fue mucho más eficiente a 50 °C en lugar de 30 °C. Esta optimización rindió concentraciones mucho más altas de CGP (hasta 100 g l⁻¹), fácilmente degradables en la cuarta parte del tiempo de degradación a 30 °C. Esto se ajusta a la ecuación de Van 't Hoff, en la que la velocidad de una reacción se multiplica por dos con un aumento de temperatura de 10 kelvin (10 °C). A dicha temperatura elevada, se minimizan los volúmenes de las mezclas de degradación y el riesgo de su contaminación. A ambas temperaturas de incubación, 30 °C and 50 °C, el tiempo de degradación presentó un aumento colineal a la disminución de las concentraciones de CphEal en bruto y el aumento de las concentraciones de CGP. Por tanto, la fórmula resultante puede resultar útil para aplicar unos parámetros de degradación óptimos durante aplicaciones del proceso futuras. Dado que la eficiencia de la fase de degradación es mucho mayor a 50 °C, se calculó la fórmula para su aplicación a 50 °C y, por consiguiente, es adecuada para concentraciones de CGP de hasta 100 g l⁻¹.

La precipitación con disolventes orgánicos o sulfato de amonio proporcionó un débil efecto de purificación y unas tasas de recuperación de enzima bajas. En contraposición, el procedimiento desarrollado por unión específica a CGP demostró ser altamente eficiente y tiene la ventaja de separar CphEal de las demás proteínas en soluciones en bruto utilizando una sustancia (CGP). El procedimiento de purificación termina con la degradación de la matriz CGP en sus péptidos; éstos son al mismo tiempo los productos finales del proceso valiosos y, por tanto, se pueden dirigir posteriormente a la secuencia de producción principal (sin pérdida de material). Se puede aumentar a escala el procedimiento de purificación fácilmente e integrarlo en futuras aplicaciones de proceso si se desea.

Se crearon dos fórmulas para aumentar la eficiencia de la segunda fase del proceso original (producción a gran escala de CphEal bruto) y la posible purificación del mismo. La primera fórmula (véase a continuación) se basa en el

análisis fotométrico de CphEal y permite una rápida determinación del contenido de CphEal en sobrenadantes en bruto. La concentración de CphEal determinada se puede integrar después en la segunda fórmula para calcular la cantidad de CGP que se ha de unir, y en virtud de ello purificar el contenido completo de CphEal en el sobrenadante. Este esquema proporciona un instrumento fiable para las cargas de producción futuras de CphEal en bruto que podrían diferir en gran medida en su composición de proteína.

Durante los experimentos para determinar la especificidad de sustrato de la CphEal purificada, no solamente se degradó CGP, sino también BSA, aunque en menor medida. Esto indica que la CGPasa de la cepa DIP1 de *P. alcaligenes* podría ser menos específica que las CphEPa y CphEBm caracterizadas previamente de la cepa B1 de *P. anguilliseptica* y la cepa BAC19 de *Bacillus megaterium*, respectivamente. Una explicación más posible para este efecto inespecífico es la presencia de otras cuantas proteínas en la solución de enzima purificada. A pesar de ello, estas proteínas fueron visibles en SDS-PAGE únicamente en las muestras muy concentradas y con tinción con nitrato de plata intensa; únicamente una cantidad mínima de una proteasa no específica podría producir dicho efecto sobre los sustratos sometidos a ensayo diferentes a CGP.

CphEal de cepa DIP1 de *P. alcaligenes* fue inhibida en gran medida tanto por los inhibidores serina-proteasa Pefabloc® como PMSF. Esto indica que lo más probable es que esta CGPasa pertenezca a las proteasas de tipo serina. Esto se ajusta a los resultados de las CGPasas caracterizadas anteriormente: CphB, CphEPa and CphEBm. Además, CphEal fue inhibida totalmente por oxidante de triptofano N-bromosuccinimida, lo que demuestra que un resto triptóforo podría participar en el mecanismo catalítico de la enzima. Asimismo, esto señala la gran similitud entre CphEal y las CphEPa y CphEBm extracelulares. Las muestras de CphEal que fueron tratadas con leupeptina o EDTA no presentaron actividad de inhibición de CGPasa sobre placa agar con recubrimiento superpuesto de CGP, si bien, los análisis de HPLC de las muestras tratadas con EDTA mostraron una inhibición de CGPasa de aproximadamente un 75%. Esto se debe a la formación de grandes cantidades de precipitados durante la derivación con OPA y no a la inhibición de enzima (Obst, M. y col., J. Biol. Chem. 277:25096-25105 (2002); Obst, M. y col., Biomacromolecules 5:153-161 (2004)). En la tabla 3 se muestran las características bioquímicas de CphEal cepa DIP1 de *P. alcaligenes* en comparación con CphB, CphEPa y CphEBm de *Synechocystis sp.* PCC6803, cepa B1 *P. anguilliseptica* y cepa BAC19 *Bacillus megaterium*, respectivamente, caracterizadas anteriormente. Aunque varias de las características de CphEal purificada fueron relativamente similares a las de CphEPa y CphEBm, se pueden observar algunas diferencias relevantes, tales como el tamaño molecular y la temperatura óptima. Ésta fue 50 °C para CphEal, que es la temperatura más alta óptima para todas las CGPasas conocidas y, por tanto, aporta un gran beneficio para aplicar esta enzima tanto en la forma pura como en la forma bruta. La enzima purificada presentó un intervalo de pH óptimo de 7-8,5, siendo óptimo 8,5, que se desplaza del determinado para la enzima en bruto (5,5-7,5, siendo óptimo 6,5). Lo más probable es que esto se deba a la presencia de muchas otras proteínas en el extracto en bruto que representan un entorno complejo; las interacciones dentro de dicho entorno pueden a su vez afectar a la estructura y/o propiedades de la CGPasa. La línea celular *Pseudomonas alcaligenes* DIP1 fue depositada el 10 de junio de 2008 en DMSZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Alemania con el número de depósito DSM 21533.

La invención se describe con mayor detalle en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Procedimientos y materiales

Muestreo y preparación de muestras: se recogieron las muestras de la flora intestinal de ejemplares sanos recién sacrificados (Tabla 1). A excepción de los rumiantes (no se pudo determinar la historia del forraje), todos los animales, aves y peces seleccionados, llevaron al menos parcialmente una alimentación en libertad o libremente con pastos. Se recogieron las muestras de varios sitios (Tabla 2) de todo el tracto digestivo de cada animal fuente para llenar completamente tubos falcon estériles de 50 ml, que se mantuvieron a 4 °C hasta su uso. Se diluyeron las muestras (Tabla 1) con solución salina normal estéril y después se filtraron (filtro plisado, Schleicher, & Schuell, Dassel, Alemania) para separar los materiales sólidos en condiciones estériles. Se cortaron muestras de heces en solución salina estéril y se filtraron tal como se ha descrito.

Medios: para enriquecer las bacterias capaces de degradar CGP en condiciones anaeróbicas, se aplicó el siguiente medio basal (MB): 1,0 g NH₄Cl, 3,0 g KH₂PO₄, 3,0 g K₂HPO₄, 0,1 g KCl, 0,5 g MgCl₂ · 6H₂O, 0,1 g CaCl₂ · 2H₂O, 0,5 g NaCl, 0,5 g cisteína-HCl, 0,5 g extracto de levadura (a no ser que se indique de otro modo en el texto), 10 ml de solución de elementos traza SL10 y 1 mg of resazurina por l de agua destilada. Se ajustó el pH a 7,0 con KOH. Se llevó a ebullición el medio y después de haber añadido Na₂S · 9 H₂O a una concentración final de 0,04% (p/vol), se transfirió inmediatamente a una cámara anaeróbica (Tipo A – cierre de aire manual; Coy Inc., Grass Lake, MI, EE.UU.) que contenía una atmósfera de gas Formier (N₂:H₂, 95:5%, vol/vol). Después de refrigerar a temperatura ambiente, se introdujeron partes alícuotas de 10 ml en tubos Hungate, sellados, se sacaron de la cámara anaeróbica y posteriormente se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Se realizaron cultivos aeróbicos en matraces Klett de 10 ml que contenían medio BM carente de agentes reductores cisteína-HCl y Na₂S · 9 H₂O.

Se utilizó medio Luria Bertani (LB) (Sambrook, J. y col., Molecular cloning: a Laboratory Manual, 2ª ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbour Laboratory (1989)) para la purificación de bacterias degradadoras de CGP y para

el mantenimiento de cultivos viables.

Para el aislamiento de la cepa DIP1 de *P. alcaligenes* se utilizó un medio mineral modificado de Dufresne, A. y col., Macromolecules 31:6426-6433 (1998) (Medio SM): 1,0 g NH₄Cl, 5,0 g KH₂PO₄, 1 g MgSO₄ · 7H₂O (esterilizado y añadido por separado) y 10 ml de solución de reserva de elementos traza por l de agua del grifo. La solución de reserva de elementos traza contenía ácido nitrilotriacético (70 mM, pH 6,5), FeSO₄ · 7H₂O (5 g/l), MnCl₂ · 4H₂O (0,85 g/l), CoCl₂ · 6H₂O (0,14 g/l), CuCl₂ · 2H₂O (0,085 g/l), H₃BO₃ (0,17 g/l), ZnSO₄ · 7H₂O (0,9 g/l), y Na₂MoO₄ · 2H₂O (0,09 g/l). Se ajustó el pH del medio a 7,0 y posteriormente se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Se pusieron en matraces Erlenmeyer con deflectores los cultivos líquidos y se incubaron en un agitador horizontal Pilotshake RC-4/6-W (Kühner AG, Birsfelden, Suiza) a 150 rpm. Para preparar las placas agar con recubrimiento superpuesto de CGP, se añadió un 1,2% (p/vol) de bacto-agar a una suspensión de CGP (1-2 g/l); posteriormente, se esterilizó esta mezcla en autoclave a 121 °C durante 20 minutos y después del enfriamiento a 45 °C, se vertió como capas finas sobre las placas de agar SM preparadas anteriormente.

Para preparar las capas de agar con recubrimiento superpuesto de CGP, se añadió un 1,2% (p/vol) de bacto-agar a una suspensión de CGP (1-2 g/l); posteriormente, se esterilizó esta mezcla en autoclave a 121 °C durante 20 minutos y después del enfriamiento a 45 °C, se vertió como capas finas sobre las placas de agar SM preparadas anteriormente.

Fuente y aislamiento de CGP: Se aisló CGP "recombinante" de células liofilizadas de *Ralstonia eutropha* H16-PHB-4- Δ eda (pBBR1MCS-2::cphA6308/edaH16) (Voss, I. y col., Metabol. Eng. 8:66-78 (2006)) y se purificó con arreglo a un procedimiento de extracción de ácido modificado (Frey, K. M. y col., Appl. Environ. Microbiol. 68:3377-3384 (2002)). Se aisló CGP de productos comerciales de *Espirulina* de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente para cianobacterias (Simon, R. D. y col., Biochim. Biophys. Acta 420:165-176 (1976)).

Para aislar y purificar CGP a mayor escala, se optimizó el procedimiento de extracción de ácido (Frey, K. M. y col., Appl. Environ. Microbiol. 68:3377-3384 (2002)) del siguiente modo: se suspendió la masa seca con contenido en CGP en agua del grifo para dar una concentración final de 0,1 g/ml. Se redujo el pH a 1 con HCl concentrado (32%) y se agitó durante toda la noche. Se centrifugó la suspensión a 17000 rpm con una centrífuga continua CEPA Z61 (CEPA, Carl Padberg Zentrifugenbau GmbH, Lahr, Alemania), se volvió a suspender el sedimento en 20 l de HCl 0,1 N, se agitó durante 1 h, se volvió a centrifugar y se añadió el sobrenadante a la primera carga, al tiempo que se descartaba el sedimento. Se neutralizó el sobrenadante que contenía CGP (pH 7,3) con NaOH (50%) en botellas de vidrio de 30 l para que precipitara CGP. Se dejó sedimentar la suspensión lechosa durante toda la noche a 4 °C antes de descartar el sobrenadante. Se disolvió CGP repetidamente y se neutralizó 3 veces más para eliminar todas las impurezas insolubles en HCl diluido. Se volvió a disolver la CGP resultante en 30 l de HCl 0,1 N y se pasó a través de una unidad de filtro Sartobran-P de 0,2 μ m tipo 00 (Sartorius AG, Göttingen, Alemania). Se volvió a neutralizar la solución (pH 7,3) con NaOH, se dejó reposar toda la noche, se descartó el sobrenadante. Para eliminar cualquier impureza hidrosoluble y desalar CGP, se lavó el sedimento 3 veces sucesivas con 5 volúmenes de lecho de agua destilada. Finalmente, se centrifugó el sedimento de CGP a 20000 rpm (centrífuga continua CEPA Z41), se congeló a -30 °C y se liofilizó en un liofilizador BETA tipo 1-16 (Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode, Alemania).

Esterilización de CGP: Para preparar suspensiones de reserva de CGP estériles, se añadió éter dietílico a CGP en una relación 3:1 (vol/p). Al cabo de 15 minutos, se descartó el disolvente y después de completar la evaporación, se obtuvo una suspensión fina disolviendo CGP en HCl 0,1 N estéril y haciendo precipitar después el polímero a un pH 7,3 por adición de un volumen igual de NaOH 0,1 N estéril. Alternativamente, se disolvió CGP primero en HCl 0,1 N, se pasó a través de un filtro (tamaño de poro 0,2 μ m, Millipore GmbH, Eschborn, Alemania) y finalmente se volvió a precipitar tal como se ha descrito antes. Se ajustaron las concentraciones de CGP en las soluciones de reserva por sedimentación de CGP con una centrifugación breve (3500 x g durante 2 minutos) o dejando sedimentar CGP simplemente durante toda la noche a 4 °C. En ambos casos, se descartó después parcialmente el sobrenadante para obtener finalmente la concentración de CGP deseada. Se llevaron a cabo los experimentos para determinar la degradación de CGP anaeróbica en tubos Hungate preparados anaeróbicamente que contenían 10 ml de BM con y sin 0,5 g l⁻¹ de extracto de levadura. Se inyectaron suspensiones de CGP estériles directamente en los tubos Hungate con BM preparados anaeróbicamente hasta concentraciones finales de 1 g l⁻¹. La desaparición a simple vista de CGP en los tubos indicó su degradación. Para preparar placas agar con recubrimiento superpuesto de CGP, se añadió un 1,2% (p/vol) de bacto-agar a una suspensión de CGP; posteriormente, se esterilizó esta mezcla en autoclave a 121 °C durante 20 minutos y después del enfriamiento a 45 °C, se vertió como capas finas sobre las placas de agar SM preparadas anteriormente.

Degradación anaeróbica de CGP con muestras de flora intestinal de mamífero, aves y peces: Para simular las condiciones naturales de los hábitats en los que se obtuvieron las muestras, se utilizaron las muestras preparadas como inóculo y como suplemento nutricional al mismo tiempo. Se inocularon tubos Hungate anaeróbicos estériles que contenían 1 g l⁻¹ CGP en medio BM (sin extracto de levadura) hasta una concentración final de 10% y se incubaron a 37 °C hasta que tuvo lugar la degradación.

Reconocimiento de bacterias degradadoras de CGP en la flora intestinal: Para aislar bacterias degradadoras de CGP, se extendieron partes alícuotas de 100 µl de las muestras de flora preparadas sobre placas de agar BM preparadas aeróbicamente con recubrimientos superpuestos de CGP. Durante la incubación durante varios días a 37 °C, se inspeccionaron las capas para determinar la aparición de halos causada por las colonias de bacterias degradadoras de CGP. Asimismo, durante la incubación, se aplicó un procedimiento de recuento de colonia para determinar las relaciones entre las colonias degradadoras de bacterias y las no degradadoras.

Aislamiento de cultivos axénicos degradadores de CGP: Se seleccionaron colonias bacterianas degradadoras de CGP morfológicamente diferenciadas y se purificaron posteriormente transfiriendo el material desde las colonias que presentaban halos de degradación a placas agar con recubrimiento superpuesto de CGP nuevas durante tres generaciones sucesivas. A continuación, se aplicaron tres etapas de purificación en las placas agar LB antes de someter a ensayo el cultivo axénico sobre las placas agar con recubrimiento superpuesto de CGP para confirmar que retenían la capacidad de degradar CGP.

Control de pureza: Se confirmó periódicamente la pureza de los cultivos axénicos aislados con microscopio y también mediante el cultivo en diferentes medios en condiciones tanto anaeróbicas como aeróbicas.

Técnicas de análisis: Se detectaron aminoácidos libres y pequeños péptidos (dipéptidos de CGP) por HPLC en fase inversa (Kontron Instruments, Neufahrn, Alemania) tras la derivación pre-columna de sus grupos amino libres con reactivo o-ftaldialdehído (OPA), tal como se ha descrito anteriormente (Aboulmagd, E. y col., Arch. Microbiol. 174:297-306 (2000)). Para el análisis de muestras de CGP, se sometió el polímero con antelación a hidrólisis ácida HCl 6 N, 95 °C, durante toda la noche). De manera similar, se aplicó hidrólisis ácida para la confirmación cualitativa y cuantitativa de los aminoácidos que constituían el dipéptido. Se equipó el sistema de HPLC con una columna B801 (Prep Nova-Pak HR 3,9 x 300) (Knauer GmbH, Berlin, Alemania), y se equilibró con eluyente de partida (81%, vol/vol, Na-acetato (50 mM): 19%, vol/vol, metanol). Se eluyeron los derivados OPA de los aminoácidos con un gradiente de metanol (19-75%, vol/vol) a 40 °C y con una velocidad de flujo de 1,0 ml/min y después se detectaron fluorométricamente a 330/40 nm (excitación/emisión) empleando un detector de fluorescencia modelo 1046A (Hewlett Packard, Waldbronn, Alemania). Para la calibración, se utilizaron aminoácidos cromatográficamente puros (Kollektion AS-10 de Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Alemania) o dipéptidos producidos por la hidrólisis enzimática total de CGP empleando la CGPasa extracelular de *P. alcaligenes* DIP1 (CphEal) (Sallam, A. y col., Presentado para publicación (2008)).

Se controló el crecimiento bacteriano midiendo el aumento de la turbiedad a 578 nm tras la inserción de los matraces Klett en un espectrofotómetro Eppendorf 1101M (Eppendorf, Hamburg, Alemania).

Se aplicó el análisis de cromatografía de capa fina (CCF) sobre placas de gel de sílice 60 (Merck, Darmstadt, Alemania); se utilizó el eluyente de partida de la HPLC como tampón de corrida también para la CCF, para la tinción, se aplicó una solución de ninhidrina al 20% (p/vol) en acetona. Se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) en geles al 11,5% (p/vol) según Laemmli, R.U., Nature 227:680-685 (1970). Se mancharon las proteínas y la cianoficina con el método de tinción Coomassie (Weber, K. y col., J. Biol. Chem. 244:4406-4412 (1969)) y a continuación el método de tinción de plata (Heukeshoven, J. y col., Electrophoresis 6:103-112 (1985)) para producir proteínas con concentraciones visibles menores.

Extracción de ADN y análisis de genes ARNr 16s: Se llevó a cabo el aislamiento del total de ADN genómico desde los cultivos axénicos tal como se ha descrito anteriormente (Rao, R. N. y col., Methods Enzymol. 153:166-198 (1987)). Se amplificaron los genes ARNr 16S por PCR desde el total de ADN utilizando cebadores de oligonucleótido habituales (MWG-BIOTECH AG, Ebersberg, Alemania). Se purificaron los productos de la PCR utilizando un kit Nucleo-trap CR (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) y después se secuenciaron directamente. Se realizó la secuenciación de ADN adaptada en el instituto para química clínica y medicina de laboratorio (W.W.U. Münster, Alemania) en un secuenciador capilar (analizador de AND ABI Prism 3730) y se analizaron las secuencias con el software de recogida de datos v3.0 (ambos de Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania). Se prepararon las reacciones de secuencia utilizando un equipo secuenciador de ciclo v3.1 BigDyeq terminator (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania) de acuerdo con los procedimientos indicados por el fabricante y los siguientes cebadores de secuencia:

27f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; SEQ ID NO:1),
 343r (5'-CTGCTGCCTCCCGTA-3'; SEQ ID NO:2),
 357f (5'-TACGGGAGGCAGCAG-3'; SEQ ID NO:3),
 519r (5'-G(T/A)-ATTACCGCGGC(T/G)GCTG-3'; SEQ ID NO:4),
 536f (5'-CAGC(C/A)GCCGCGTAAT(T/A)C-3'; SEQ ID NO:5),
 803f (5'-ATTAGATACCCTGGTAG-3'; SEQ ID NO:6),
 907r (5'-CCGTCAATTCATTTGAGTTT-3'; SEQ ID NO:7),
 1114f (5'-GCAACGAGCGCAACCC-3'; SEQ ID NO:8),
 1385r (5'-CGGTGTGT(A/G)CAAGGCC-3'; SEQ ID NO:9) y
 1525r (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'; SEQ ID NO:10)

(MWG-BIOTECH AG, Ebersberg, Alemania).

Se aplicaron el análisis y la alineación de secuencia, así como la construcción del árbol filogenético tal como se ha descrito anteriormente (Sallam, A. y col., Presentado para publicación (2008)): se analizaron los datos de la secuencia de ácido nucleico con el software online Contig Assembly Program (CAP). Se alinearon las secuencias con secuencias publicadas anteriormente de cepas representativas y otras bacterias utilizando la función blast disponible en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Se alinearon las secuencias de referencia utilizando el software ClustalX 1.8 y se construyó el árbol filogenético utilizando los programas TreeView 1.6.5 y NJplot. Se aplicó una técnica de bootstrap para evaluar la tipología del árbol llevando a cabo 100 repeticiones del proceso.

Cultivo a escala de 500 l: Se realizó el cultivo a una escala de 500 l en un biorreactor de acero inoxidable Biostat D650 (B. Braun Biotech International, Melsungen, Alemania), que tenía un volumen total de 650 l (64 cm diámetro interior y 198 cm de altura) y un valor de relación d/D (relación entre el diámetro de agitador y el diámetro del vaso) de 0,375. Este biorreactor estaba equipado con tres agitadores, cada uno de ellos con seis palas y un destructor mecánico de espuma Funda-Foam (B. Braun Biotech International, Melsungen, Alemania). Además, se utilizaron accesos para sondas esterilizables para medir el oxígeno disuelto (pO_2) (modelo 25; Mettler Toledo GmbH, Steinbach, Suiza), el pH (modelo Pa/25; Mettler-Toledo GmbH), la espuma (modelo L300/Rd. 28; B. Braun Biotech International, Melsungen, Alemania), la temperatura (electrodo pt 100; M. K. Juchheim GmbH, Fulda, Alemania) y la densidad óptica a 850 nm (modelo CT6; Sentex/Monitek Technology Inc.). Se controlaron las operaciones y se registraron mediante una unidad de control digital en combinación con el paquete de software MFCS/win (B. Braun Biotech International). Se llevaron a cabo los cultivos a 30 °C y se ajustó el pO_2 para que excediera un 40% de saturación en el medio, que se controló automáticamente por agitación, se mantuvo estable la tasa de aireación a 0,7 vvn (volumen por volumen x minuto). El pH inicial del medio fue 6,9, tolerándose un aumento hasta 7,5 durante el crecimiento; no siendo así, se controló el pH por adición de HCl 4N.

Separación de células, concentración y desalación de proteínas de sobrenadante: Se cosecharon las células por centrifugado con centrifugas continuas CEPA tipo Z41 o tipo Z61 (Carl Padberg Zentrifugenbau GmbH, Lahr, Alemania). Se concentraron las proteínas con un peso molecular superior a 30 kDa y a continuación se desalaron (5 volúmenes de lecho de H_2O) utilizando un cartucho de poliétersulfona Sartocon® de flujo cruzado con un COP (Punto de corte) de 30 kDa y un soporte de acero inoxidable de tipo Sartocon® 2 Plus (Sartorius AG, Gottingen, Alemania).

Crecimiento en diferentes sustratos: Se investigó la utilización del sustrato en matraces Klett de 100 ml con deflectores; cada uno de los matraces contenía 10 ml de medio SM y 1 g l⁻¹ de uno de los siguientes sustratos: lactato, citrato, succinato, acetato, propionato, gluconato, glucosa, fructosa, sacarosa y glicerina. Se esterilizaron soluciones de reserva de todos los sustratos por filtración (tamaño del poro 0,2 µm, Millipore GmbH, Eschborn, Alemania). Se llevaron a cabo los experimentos por duplicado, inoculándose desde un precultivo desarrollado en las mismas condiciones de ensayo. Se controló el crecimiento en virtud del aumento de OD_{578nm} tras un período de incubación de 24 h a 30 °C.

Producción fermentativa de cianoficina: Se produjo CGP a una escala de fermentación de 500 l utilizando una cepa recombinante de *E. coli* DH1 que albergaba plásmido pMa/c5-914::cpHAPCC6803 (Frey, K. M. y col., Appl. Environ. Microbiol. 68:3377-3384 (2002)). Como sustrato y como medio se utilizó el medio de protamilasa aplicado anteriormente (Avebe, Veendam, Países Bajos) y se preparó por dilución, tamizado y centrifugado, tal como describe (Elbahloul, Y. y col., Appl. Environ. Microbiol. 71:7759-7767 (2005)).

Para determinar la concentración óptima de la carga de protamilasa disponible para la producción de CGP, se sometieron a ensayo cultivos de 100 ml sobre medio de protamilasa con concentraciones comprendidas entre 4 y 8% (vol/vol) en matraces con deflectores de 200 ml; el medio tenía un pH de 7,5 y contenía 100 mg l⁻¹ de ampicilina. Tras la inoculación, se incubaron los matraces a 37 °C durante 15 h con agitación (120 rpm) (agitador tipo G 25, New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen, Alemania). Finalmente, se estimó el contenido en CGP en una muestra de 50 ml de cada matraz.

Antes de la fermentación, se cultivaron 16 l de precultivo en matraces con deflector de 2 l que contenían 1 l de medio de protamilasa (7%; vol/vol, pH 7,5), 100 mg l⁻¹ de ampicilina y 0,15% (vol/vol) de emulsión antiespumante de silicona (50%; vol/vol, Wacker Silicones, Burghausen, Alemania) y se incubaron a 30 °C durante 20 h con agitación (110 rpm, agitador tipo RC-6-W, Adolf Kühner AG, Birsfelden, Suiza).

Se llevó a cabo el cultivo principal en un biorreactor de acero inoxidable Biostat D650 (B. Braun Biotech International, Melsungen, Alemania) con un volumen total de 650 l (diámetro interior 64 cm y altura 198 cm) y un valor d/D (relación entre el diámetro del agitador y el diámetro del vaso) de 0,375. El biorreactor estaba equipado con tres agitadores, con seis palas cada uno y un destructor mecánico de espuma Funda-Foam (B. Braun Biotech International, Melsungen, Alemania). Además, se utilizaron accesos para sondas esterilizables para medir el oxígeno disuelto (pO_2) (modelo 25; Mettler Toledo GmbH, Steinbach, Suiza), el pH (modelo Pa/25; Mettler-Toledo GmbH), la espuma (modelo L300/Rd. 28; B. Braun Biotech International, Melsungen, Alemania), la temperatura (electrodo pt 100; M. K. Juchheim GmbH, Fulda, Alemania) y la densidad óptica a 850 nm (modelo CT6; Sentex/Monitek Technology Inc.). Se controlaron los funcionamientos y se registraron en una unidad de control digital en

combinación con el paquete de software MFCS/win (B. Braun Biotech International).

Se cargó el biorreactor con 400 l de medio de protamiasa al 7% (pH 7,5) y 75 ml de solución antiespumante, se esterilizó *in situ* y después de la refrigeración a 30 °C, se inoculó con un 4% (vol/vol) de precultivo tras la adición de 100 mg l⁻¹ de solución de ampicilina estéril. Se puso en marcha el cultivo a 30 °C durante las 6 primeras horas, se mantuvo el pH del medio a 7,5 por adición de NaOH 6M o HCl 6M. Se mantuvo la pO₂ constante a 20% y se mantuvo estable a 0,17 vvm (volumen por volumen x minuto). Se controló la formación de espuma automáticamente con un destructor mecánico de espuma o mediante la adición de una solución antiespumante estéril (50%, vol/vol). Al cabo de 6 h de incubación, se elevó la temperatura a 37 °C hasta que terminó la fermentación. Se cosecharon las células por centrifugado con una centrifuga continua CEPA tipo Z61 (Carl Padberg Zentrifugenbau GmbH, Lahr, Alemania).

Extracción y purificación de CGP a gran escala: Para obtener CGP puro desde la biomasa húmeda resultante, se aplicó el procedimiento de extracción de ácido previamente optimizado para la extracción y purificación de CGP a gran escala (Sallam, A., y A. Steinbüchel. 2008b. Biotechnological process for the technical production of β -dipéptidos from cyanophycin. En preparación). Finalmente se congeló la CGP extraída a -30 °C y se liofilizó en un liofilizador BETA tipo 1-16 (Christ Gefriertrocknungsanlagen, Osterode, Alemania).

Esterilización de CGP: Se esterilizó CGP con éter dietílico o por disolución en HCl 0,1 N y filtración estéril tal como se ha descrito anteriormente (Sallam, A., y A. Steinbüchel, Appl. Environ. Microbiol. 74(11):3434-3443 (2008)). Se ajustaron las concentraciones de CGP deseadas en soluciones de reserva por sedimentación de CGP con un breve centrifugado (2800 x g durante 2 min) o dejando sedimentar la CGP durante toda la noche a 4 °C; a continuación, se descartó parcialmente el sobrenadante para obtener la concentración de CGP deseada.

Técnicas de análisis: Se controló el crecimiento bacteriano y la degradación de CGP midiendo el cambio de turbiedad tras la inserción de los matraces Klett en un fotómetro Klett (Manostat Corporation, Nueva York, EE.UU.), o midiendo la DO en muestras de 1 ml a 600 nm con un fotómetro Libra S5 (Biochrom Ltd., Cambridge, RU). Se llevó a cabo la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) en geles al 11,5% (p/vol) según Laemmli, R.U., Nature 227:680-685 (1970). A continuación, se aplicó renaturalización en gel de las proteínas (Lacks, S. A. y col., J. Biol. Chem. 225:7467-7473 (1980)). Se mancharon las proteínas y la cianoficina con el método de tinción Coomassie (Weber, K. y col., J. Biol. Chem. 244:4406-4412 (1969)) o con métodos de tinción de plata (sólo para proteínas) (Nesterenko, M. V. y col., J. Biochem. Biophys. Methods 3:239-242 (1994)). Se determinaron las concentraciones del total de proteínas y CGP utilizando un reactivo Bradford tal como describe (Elbahloul, Y. y col., Appl. Environ. Microbiol. 71:7759-7767 (2005)). Se concentraron, desalaron y separaron de dipéptidos de CGP las proteínas de tamaño grande de las muestras de cultivo por ultrafiltración utilizando tubos Vivaspín con membrana de 10 kDa (Vivascience AG, Hannover, Alemania), o utilizando una cámara Amicon (Amicon, Beverly, EE.UU) con membranas de 10 kDa (Millipore Corporation, Bedford, EE.UU.) para volúmenes más grandes. Se detectaron aminoácidos libres y dipéptidos por HPLC en fase inversa (Kontron Instruments, Neufahrn, Alemania) tras la derivación precolumna de sus grupos aminoácido libre con reactivo ortoaldealdehído (OPA) tal como se ha descrito antes (Aboulmagd, E. y col., Arch. Microbiol. 174:297-306 (2000)). Para el análisis de los aminoácidos constituyentes de CGP o dipéptidos de CGP, se sometieron las muestras con antelación a hidrólisis ácida (HCl 6 N, 95 °C durante toda la noche). El sistema de HPLC estaba equipado con una columna B801 (Prep Nova-Pak HR 3.9 x 300) (Knauer GmbH, Berlin, Alemania) y equilibrado con un eluyente de partida (81%, vol/vol, Na-acetato (50 mM): 19%, vol/vol, metanol). Se eluyeron los derivados de OPA de aminoácidos con un gradiente de metanol (19-75% vol/vol) a 40 °C con una velocidad de flujo de 1,0 ml min⁻¹ y, a continuación, se detectaron fluorométricamente a 330/450 nm (excitación/emisión) empleando un detector de fluorescencia modelo 1046A (Hewlett Packard, Waldbronn, Alemania).

Determinación de la actividad y concentración de CphEal: Se examinó la actividad de cianoficina (CphEal) en virtud de la formación de halos de degradación en las placas de agar con recubrimiento superpuesto de CGP con pequeñas partes alícuotas de soluciones de enzima concentradas; para ello, se centrifugaron 5 ml de muestras de cultivo a 2800 x g durante 30 min (Megafuge 1.0 R, Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Alemania) y se concentraron 4 ml del sobrenadante resultante 100 veces por ultrafiltración. Para la determinación cuantitativa de la enzima en las muestras de cultivo, se desarrolló un método fotométrico del siguiente modo: se añadieron 2 μ l del sobrenadante de cultivo concentrado a 1 ml de suspensión de CGP (100 mg l⁻¹) y se incubó a 30 °C durante 30 minutos en un rotador de tubos (3 rpm, tipo 502 S, Watson-Marlow GmbH, Rommerskirchen, Alemania). Finalmente, se midió el OD_{600nm} de las muestras, que indicó la disminución de la cantidad de CGP como consecuencia de la degradación; esto a su vez se utilizó para indicar la concentración de CphEal en las soluciones en la curva de calibración correspondiente.

Concentraciones y condiciones óptimas para la degradación de CGP: Utilizando polvo de CphEal en bruto obtenido de la fermentación de 500 l anterior con cepa DIP1 de *P. alcaligenes* (Sallam, A., and A. Steinbüchel. 2008b. Biotechnological process for the technical production of β -dipéptidos from cyanophycin. En preparación.), y para determinar la relación óptima entre la concentración de CGP y CphEal en bruto con respecto al tiempo de degradación necesario, se prepararon diluciones en serie (50-100 g l⁻¹) de suspensiones de CGP pura (en agua, pH 7,3) en tubos Eppendorf con un volumen total de 1 ml cada uno; se añadieron diferentes cantidades de polvo de CphEal en bruto [contenido de CphEal 4,6% (p/p)] a cada concentración de CGP preparada, se incubaron los tubos

de reacción a 30 °C en un rotador de tubos (3 rpm) para averiguar los períodos de incubación necesarios para una degradación de CGP completa.

Se llevaron a cabo experimentos para determinar el pH óptimo para la degradación de CGP en tubos Eppendorf que contenían 1 ml de suspensión de CGP (100 g l⁻¹) con valores de pH comprendidos entre 5,0 y 9,0; los tubos de reacción incluyeron además 10 g l⁻¹ de CphEal en bruto y fueron incubados a 30 °C durante 30 minutos. Las mezclas de reacción para una temperatura de degradación óptima incluyeron concentraciones similares de CGP (pH 7,0) y CphEal y se incubaron a 15, 20, 25, 30, 35, 37, 40, 50, 60 o 70 °C durante 30 min. Finalizados ambos experimentos, se calculó el porcentaje de degradación de CGP en todos los tubos y se compararon.

Purificación de CphEal con en disolventes orgánicos y precipitación con sulfato de amonio: Se añadió 1 ml de concentraciones comprendidas entre 10-100% (vol/vol) de etanol frío, acetona o metanol a 50 µl de la solución de CphEal en bruto concentrada (14 g l⁻¹) en tubos Eppendorf, se incubaron las mezclas de reacción durante 60 min a -20 °C. Después de centrifugar los tubos de reacción durante 5 min a 16000 x g, se secaron los sedimentos y se volvieron a suspender en 50 µl de tampón fosfato sódico (pH 7,0). Se aplicó fraccionamiento con sulfato de amonio con un aumento gradual del porcentaje de saturación de sulfato de amonio (10-100%) en 10 ml de solución de CphEal (3,5 g l⁻¹), en cada etapa, se incubaron los tubos a temperatura ambiente durante 30 min y se centrifugaron durante 10 min a 16000 x g; se suspendieron los sedimentos en tampón fosfato sódico (pH 7,0) y, a continuación, se desalaron por ultrafiltración. Se sometieron a ensayo todos los sedimentos de proteína para determinar la degradación de CGP sobre placas de agar con recubrimiento superpuesto de CGP, así como el contenido de proteínas por SDS-PAGE.

Purificación de CphEal de sustrato específico: Se desarrolló un procedimiento de purificación para CphEal que dependió de la fuerte afinidad de la enzima en el extracto en bruto a su sustrato insoluble (CGP), de manera que solamente CphEal se une a CGP y se puede cosechar por precipitación. Para determinar el tiempo necesario para completar la unión de la enzima a CGP, a un pH 7,0, se añadieron 0,5 ml de solución de CphEal en bruto concentrada (14 g l⁻¹) a 0,5 ml de una suspensión de CGP (100 g l⁻¹). Transcurridos los primeros 10 minutos de incubación, se sometieron a ensayo partes alícuotas de 2 µl del sobrenadante de reacción (tras un breve centrifugado) para determinar la actividad de degradación sobre placas de agar con recubrimiento superpuesto de CGP, según lo cual la disminución de los halos de degradación indicó una unión completa de CphEal a CGP. Se llevaron a cabo procesos de purificación reales en 1 ml de mezcla de reacción similar y se procedió del siguiente modo: una vez completada la unión de CphEal a CGP, se centrifugó la mezcla durante 30 segundos (16000 x g), se descartó el sobrenadante y se lavó el sedimento 5 veces con 10 ml de tampón fosfato sódico (50 mM). A continuación, se suspendió el sedimento en 1 ml de tampón fosfato y se incubó durante toda la noche a 30 °C con rotación (3 rpm) hasta que se produjo una degradación completa de CGP. Se centrifugó la mezcla (5 min, 16000 x g); a continuación, se separaron los dipéptidos de CGP por ultrafiltración y se analizó la fracción de proteína concentrada del sobrenadante para determinar su pureza por SDS-PAGE.

Caracterización de CphEal de cepa DIP1 de *P. alcaligenes*: Para determinar la estabilidad según la temperatura de la CphEal purificada, se incubaron partes alícuotas de 10 µl durante 20 min a diferentes temperaturas (10-80 °C), a continuación, se sometieron a ensayo 3 µl de ellas para determinar la actividad de degradación en placas de agar con recubrimiento superpuesto de CGP a 30 °C. Para determinar la temperatura de degradación óptima, se añadieron partes alícuotas de 3 µl de la solución de CphEal purificada a 1 ml de suspensiones de CGP (100 g l⁻¹ in 50 mM tampón fosfato Na, pH 7,0) y se incubaron durante 20 min a diferentes temperaturas (10, 20, 30, 40, 45, 50 y 60 °C). Para determinar el pH óptimo de degradación de CGP por CphEal purificada, se añadieron partes alícuotas de 3 µl de la solución de reserva de CphEal purificada a 1 ml de suspensiones de CGP (100 g l⁻¹ en 50 mM tampón fosfato Na-) con diferentes valores de pH (5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5 o 9) y se incubaron durante 30 min a 30 °C. Finalmente, se determinó la degradación de CGP fotométricamente en tubos de reacción de los dos experimentos, tal como se ha descrito anteriormente. Se sometió a ensayo la especificidad de sustrato de CphEal purificada, tal como se ha descrito anteriormente (Obst, M. y col., Biomacromolecules 5:153-161 (2004)) en los siguientes sustratos de polipéptido CGP, caseína bovina (calidad Hammersten) (Merck, Darmstadt, Alemania), albúmina de suero bovino (BSA) (Roth, Karlsruhe, Alemania), and poli(ácido α,β-D/L-aspartico) (Bayer AG, Leverkusen, Alemania).

Para averiguar el efecto de los inhibidores de enzima sobre la CphEal purificada, se añadieron partes alícuotas de 50 µl de la solución de reserva enzimática purificada a 450 µl de tampón fosfato Na (50 mM) y se incubaron durante 2 h a 30 °C en presencia de uno de los siguientes inhibidores específico de grupo: Leupeptina (tiol-proteasas), EDTA (metaloproteasas), Pefabloc (serina-proteasas), PMSF (serina-proteasas) o N-bromosuccinimida (restos de triptofano). Se sometió a ensayo una muestra de 5 µl de cada mezcla de reacción para determinar su actividad sobre placas de agar con recubrimiento superpuesto de CGP. A continuación, se añadieron partes alícuotas de 5 µl de una suspensión de reserva de CGP (50 g l⁻¹) a los tubos de reacción, se incubaron durante 15 min más, se centrifugaron y se exploraron para determinar los productos de degradación por HPLC.

Ejemplo 1. Degradación anaeróbica de CGP con muestras de flora intestinal de mamíferos, aves y peces: las muestras de flora filtradas contenían un gran número de diferentes bacterias, así como un alto contenido de sustratos. Para simular las condiciones naturales dentro de los tractos digestivos de los que se obtuvieron estas muestras, se utilizaron soluciones de flora como inóculo y como suplemento nutricional al mismo tiempo. Se

inoculaban tubos Hungate anaeróbicos estériles que contenían medio BM y 1 g l-1 de CGP como único sustrato, a una concentración de 10%. Todos los tubos anaeróbicos inoculados presentaron una completa degradación de CGP en estas condiciones. Los períodos de incubación necesarios para una degradación completa de CGP en los tubos oscilaron entre 12 y 48 h.

5 Reconocimiento de bacterias degradadoras de CGP en la flora intestinal: para aislar las bacterias degradadoras de CGP, se extendieron partes alícuotas de 100 µl de las muestras de flora preparadas sobre placas de agar con recubrimiento superpuesto de CGP. Durante la incubación de varios días a 37 °C, se observó en las placas que la aparición de bacterias degradadoras de CGP variaba en gran medida entre las diferentes floras (Tabla 1). La máxima incidencia fue el caso de la flora del ciego de conejo (Egipto), oveja (Alemania) y la flora del tracto digestivo de la carpa (Alemania). También variaron bastante las características morfológicas de las colonias degradadoras, el período de incubación necesario, la forma y la intensidad de los halos causados por la degradación de CGP, entre las diferentes muestras de flora, así como entre las colonias dentro de cada muestra. Esto indica la presencia de especies de bacterias diferenciadas con diversas capacidades de degradación de CGP.

15 Aislamiento y purificación de cepas degradadoras de CGP: Se seleccionaron colonias de bacterias degradadoras de CGP morfológicamente diferenciadas y se purificaron posteriormente transfiriendo las colonias que presentaban halos de degradación a placas agar con recubrimiento superpuesto de CGP nuevas. Durante el trabajo de purificación, muchas de las colonias degradadoras de CGP perdieron su capacidad de inducir halos de degradación como cultivos axénicos, y por lo tanto fueron descartadas. De manera similar, varios de los consorcios degradadores de CGP resultaron enormemente difíciles de conseguir como cultivos axénicos y también se omitieron de los procedimientos de purificación posteriores. Por otra parte, la fase de purificación tuvo como resultado 62 cultivos axénicos, que presentaron características morfológicamente diferenciadas, con retención de la capacidad de degradar CGP. Tal como se muestra en la Tabla 1, se aislaron bacterias degradadoras de CGP de diferentes sitios del tracto digestivo de cada animal. Esto se ajusta a los hechos conocidos acerca de la degradación de proteína dietaria, por ejemplo, en rumiantes; aunque el rumen es el principal sitio de degradación de la proteína dietaria, la proteína no digerida (proteína de paso o que escapa) se traslada con el alimento digerido hacia el tracto digestivo inferior, donde es descompuesta en parte por las enzimas del animal o por la flora intestinal inferior para ser absorbida antes de excretar el resto. La degradación de la proteína de paso es importante para funciones fisiológicas específicas, tales como la producción de leche (Holter, J. B. y col., J. Dairy. Sci. 76:1342-1352 (1993)).

20 Degradación de CGP mediante cultivos axénicos en condiciones anaeróbicas y aeróbicas: Se examinaron 62 cultivos axénicos para determinar su capacidad de degradar CGP en medios líquidos en condiciones aeróbicas. Esto se aplicó en un medio BM que contenía 1 g l-1 de CGP y 0,5 g l-1 de extracto de levadura y se tradujo en la capacidad de todos los cultivos axénicos de degradar CGP (Tabla 1). Los experimentos de degradación de CGP anaeróbica en tubos Hungate que contenían un medio similar, además de agentes de reducción, pusieron de manifiesto que de las 62 cepas aisladas, 46 fueron capaces de degradar CGP anaeróbicamente también. De ellas, 38 degradaron CGP completamente, mientras que el resto presentó una degradación de CGP parcial. Los períodos de incubación necesarios para la degradación de CGP anaeróbica mediante cultivos axénicos oscilaron entre 24 h y 7 días a 37 °C.

30 Productos de degradación de CGP: Directamente después de la degradación completa de CGP mediante los 62 aislados puros en cultivos aeróbicos y anaeróbicos, se determinaron los productos de degradación de CGP en los sobrenadantes de cultivo por HPLC tras la derivación precolumna con reactivo OPA, tal como se ha mencionado en la sección de procedimientos. Según lo esperado, el análisis de HPLC puso de manifiesto que todos los aislados degradan CGP en sus dipéptidos constituyentes. Análisis similares para las muestras de sobrenadante que habían sido sometidas con antelación a hidrólisis ácida pusieron de manifiesto la presencia de los tres aminoácidos constituyentes de CGP: aspartato, arginina y lisina. La detección de estos tres aminoácidos concuerda con la composición conocida de CGP recombinante, que se aplicó para estos experimentos, en la que aproximadamente 6% molar de las fracciones de arginina están sustituidas por lisina (Voss, I. y col., Metabol. Eng. 8:66-78 (2006)).

40 Afiliación taxonómica de los cultivos axénicos degradadores de CGP: Las características morfológicas de los cultivos axénicos aislados señalaron que aproximadamente un 50% de los aislados pertenecen al género *Bacillus* y *Pseudomonas*, mientras que el resto de los aislados pertenecen a otros géneros, entre los que se incluyen *Streptomyces* y *Micromonospora*. Para proporcionar un examen más claro sobre la filogenia de las bacterias degradadoras de CGP en la flora intestinal examinada, se identificaron además ocho cepas de las 62 por secuenciación de ADNr 16S. Tal como se muestra en la Tabla 1, se identificaron como miembros del género *Bacillus* tres aislados: 17, 35, 49 de la flora del rumen de ovejas (Alemania), la flora del ciego de pavo (Egipto) y la flora del tracto digestivo del pez tilapia (Egipto), respectivamente, con una similitud de secuencia de ADNr 16S de más de 99% con *B. megaterium* AC46b1, *B. megaterium* MPF-906 y *B. Koguryoae* SMC4352-2T, respectivamente. Se observó que dos aislados: 15 y 47 de flora de colon de vaca (Alemania) y flora de ciego de paloma (Egipto) pertenecían al género *Brevibacillus* con una similitud de secuencia de ADNr 16S de más de 98% con *B. reuszeri* DSM9887T y *Brevibacillus* sp. SEQ004, respectivamente. La cepa 31, aislada de ciego de conejo (Alemania) se afilió al género *Streptomyces*, con una similitud de secuencia de más de 98% con *S. avermitilis* NCIMB 12804T. Los análisis de secuencia ADNr 16S también demostraron que la cepa 38 de ciego de pato (Alemania) pertenece al género *Micromonospora* y que tiene una similitud de secuencia de más de 99% con *Micromonospora* sp. 0138. Finalmente, se encontró también un representante del género *Pseudomonas* entre los aislados identificados; la cepa

52 de carpa (Alemania) presentó una similitud de secuencia de ADNr 16S de más de 99% con la bacteria degradadora de CGP *P. alcaligenes* DIP1.

El árbol filogenético construido (Fig. 1) presenta la relación entre las ocho cepas identificadas de diversas floras de animales, aves y peces y sus cepas íntimamente relacionadas y con otras bacterias. Asimismo, la posición taxonómica de todas las bacterias conocidas capaces de degradar CGP extracelularmente queda demostrada en el árbol filogenético. Además, la Tabla 2 proporciona una visión de conjunto de la extensión, los hábitats y la filogenia de las bacterias capaces de degradación de CGP extracelular.

CGP en productos comerciales de *Spirulina olatensis*: El nombre comercial *Espirulina* está asociado a menudo con diversos beneficios nutricionales y, por consiguiente, se utiliza como aditivo para seres humanos y animales (Narasimha, D. L. R. y col., J. Sci. Food Agric. 33:456-460 (1982); Kihlberg, R., A. Rev. Microbiol. 26:427-466 (1972); Lu, J. y col., Aquaculture 254:686-692 (2004); Ross, E., Poult-Sci. 69:794-800 (1990)). Para investigar si ello está asociado a la presencia de CGP, se examinaron tres productos de *Espirulina* disponibles en el mercado alemán para determinar la presencia de CGP. Dos de los productos: de Sanatur GmbH (Singen, Alemania) y Greenvally GmbH (Berlín, Alemania), consistieron en 100% de *Spirulina platensis*, mientras que la tercera variante de Aurica GmbH (Schwalbach-Elm, Alemania) contenía 40% de la misma. Se prepararon 10 g de CDM de cada uno de los tres productos, que corresponde aproximadamente al doble de la dosis diaria habitual, por molienda para obtener un polvo fino antes del aislamiento de CGP. Las tres variantes comerciales presentaron contenidos de CGP de 0,06%, 0,13% and 0,15%, respectivamente. Los análisis de HPLC confirmatorios de las muestras hidrolizadas de las CGP aisladas pusieron de manifiesto, según lo esperado, los típicos aminoácidos constituyentes de CGP cianobacterial: aspartato y arginina.

Ejemplo 2: Desarrollo de un proceso óptimo para la producción de β -di péptidos de CGP: se optimizaron primero varios factores a pequeña escala; por ejemplo, el medio adecuado y económico necesario, las suspensiones de CGP muy concentradas que se pueden preparar para la degradación en la práctica, así como definir la cantidad necesaria de enzima extracelular para conseguir la completa degradación de CGP en un período de incubación relativamente corto.

El cambio de OD600nm durante la producción de CphE como consecuencia de la adición del inductor (CGP) y su subsiguiente degradación representa un signo definitivo de la liberación del CphE, de manera que fue necesario un medio transparente y un crecimiento controlado de las células; esto se consiguió a través de la composición de medio final que se menciona en la sección materiales y procedimientos. Asimismo, entre los sustratos sometidos a ensayo, la cepa DIP1 de *P. alcaligenes* presentó un crecimiento mejor sobre citrato (Fig. 3); la concentración de citrato aplicada (1 g/l) como único sustrato garantizó una turbiedad de crecimiento de los cultivos razonable, pero al mismo tiempo controlada, durante las fases de inducción y degradación.

Para determinar una relación equilibrada entre CGP y las concentraciones de CphE en bruto para la fase de degradación del proceso a gran escala (Fase III, ver más adelante), se llevaron a cabo los siguientes experimentos a pequeña escala: se prepararon diluciones en serie (10-50 g/l) de suspensiones de CGP pura (en agua, pH 7,3) en tubos Eppendorf con un volumen total de 1 ml cada uno. Asimismo, se sometió a ensayo una dilución en serie (1-10 g/l) de CphE en bruto en cada concentración de CGP preparada; se incubaron los tubos de reacción a 30 °C en un rotador de tubos a una velocidad de rotación de 3 rpm. Los experimentos demostraron un aumento relativamente constante del tiempo de degradación de CGP cuando se utilizaron concentraciones más bajas de CphE. La concentración de CGP más alta sometida a ensayo (50 g/l) se pudo degradar en 10 h en presencia de 2 g/l de polvo de CphE en bruto (Fig. 4).

Producción a gran escala de dipéptidos de CGP: Para dar cabida a una producción de rutina de grandes cantidades de dipéptidos de CGP, se construyó un proceso trifásico. Fase I: aislamiento y purificación a gran escala de CGP, Fase II: producción a gran escala de polvo de CphE en bruto; Fase III: degradación de CGP en sus dipéptidos.

Fase I (aislamiento y purificación a gran escala de CGP): Para obtener una gran cantidad de CGP, se utilizaron 4776 g de masa seca de células que contenían CGP; dicha cantidad se produjo previamente durante una fermentación de 500 l con *Ralstonia eutropha* H16-PHB-4- Δ eda (pBBR1MCS-2::cphA6308/edaH16). El contenido de CGP de esta carga de biomasa fue 32% (p/p) (Voss, I. y col., Metabol. Eng. 8:66-78 (2006)). Adicionalmente, se mezclaron varias cargas más de biomasa de fermentaciones a escala de laboratorio con *R. eutropha* H16-PHB-4- Δ /dh/ Ω km-cphA6308, (un total de 2490 g) y se consideraron como carga secundaria. Se extrajo CGP y se purificó desde cada carga por separado de acuerdo con el procedimiento de extracción de ácido mencionado en la sección Materiales y procedimientos. La masa húmeda de CGP resultante fue 1948 g para la carga celular principal y 295 g para la carga secundaria; después del liofilizado de la CGP purificada, se obtuvieron de ambas cargas 621,83 g y 82,17g de CGP pura, respectivamente.

El análisis de HPLC de los constituyentes de aminoácido individuales de la CGP aislada de ambas cargas celulares puso de manifiesto que el polímero estaba compuesto principalmente de aspartato y arginina y que contenía tan sólo un 4,5% (mol/mol) de lisina. La electroforesis en gel de poliácridamida SDS puso de manifiesto que la CGP aislada en ambas cargas tiene un peso molecular de aproximadamente 20 a 30 kDa. Asimismo, tanto el análisis de HPLC como la electroforesis en gel de poliácridamida con SDS indicaron la falta de impurezas en la CGP obtenida. Por lo

tanto, pudieron mezclarse ambas cargas de CGP hasta una cantidad final de 704 g de CGP pura.

Fase II (producción a gran escala de polvo de CphE en bruto): Para continuar con el desarrollo de un proceso dirigido a la producción comercial de dipéptidos de CGP, fue necesaria la producción de una cantidad suficiente de CphE en bruto desde *P. alcaligenes* DIP1, de modo que se cultivó la cepa a una escala de 500 l en un biorreactor Biostat D650. Se llevó a cabo el precultivo de *P. alcaligenes* DIP1 en matraces con deflector de 2 l que contenían 1 l de medio SM con 1 g/l de citrato sódico; se incubaron los matraces con agitación durante 12 h a 30 °C. Se cargó el biorreactor con 420 l de medio SM que contenía 1 g/l de citrato sódico, se esterilizó y se inoculó con 4% (vol/vol) de precultivo. Se ajustó el pH inicial a 6,9. Durante la fermentación, las células de la cepa DIP1 de *P. alcaligenes* empezaron a crecer ligeramente tras la primera hora de fermentación y alcanzaron un valor de OD600nm de 0,4 para entrar en la fase estacionaria al cabo de prácticamente 9 h. Se indujo la excreción de CphE por adición de 0,25 g/l de suspensión de CGP estéril transcurridas las primeras 2 h de la fase estacionaria; la adición del inductor (CGP insoluble) aumentó inmediatamente la OD600nm de 0,55 a 0,98; la degradación completa de la CGP añadida requirió 2 h y fue indicada por la disminución de OD600nm para alcanzar un valor cercano al previo a la inducción. Una hora más tarde, las células empezaron a crecer ligeramente, debido probablemente a la presencia de dipéptidos de CGP en el medio. Se terminó la fermentación tras un período de cultivo total de 14 horas (Fig. 5).

Para la cosecha, concentración y desalación de las proteínas en el sobrenadante que incluía la cianofenilasa extracelular excretada, se preparó un sistema continuo al mismo tiempo que se dejaba en marcha la fermentación (Fig. 6); para la cosecha, se utilizó una centrifuga continua CEPA Z41 para separar las células al mismo tiempo que se recogía el sobrenadante en un tanque central de 100 l. Para concentrar el sobrenadante recogido simultáneamente, se conectó una unidad de flujo cruzado con un cartucho de 30 kDa al tanque central; se volvió a bombear hacia el tanque el material retenido concentrado que contenía proteínas con un tamaño molecular superior al de COP del cartucho de filtro (30 kDa), al mismo tiempo que se descartaba directamente el filtrado. Se ajustó la velocidad de flujo del flujo cruzado para mantener el volumen del tanque en aproximadamente 50 l. Para la refrigeración, se introdujo una bolsa de hielo en el tanque central para mantener la temperatura de la solución por debajo de 20 °C. Una vez terminada la cosecha, se continuó el proceso de concentración hasta que quedaron en el tanque solamente 5 l. Para la desalación, se lavó el concentrado con 5 volúmenes de lecho de H₂O. Durante cada una de las etapas anteriores, se recogieron muestras y se comprobaron en cuanto a la degradación de CGP en placas de agar con recubrimiento superpuesto de CGP (Fig. 2). Finalmente, se congeló el concentrado a -30 °C se liofilizó para obtener un peso en seco final de polvo de proteína en bruto de 17,5 g.

Fase III (Degradación de CGP pura en sus péptidos): Se aplicó la degradación a gran escala de CGP en sus péptidos sobre 250 g de CGP pura y utilizando 10 g del polvo de CphE en bruto -estas cantidades representan la concentración de CGP más fácil de preparar (50 g/l)- y la concentración suficiente de CphE (2 g/l) para asegurar la completa degradación en 12 h, tal como se determina en los experimentos a pequeña escala. Se resolvieron los 250 g de polvo de CGP en 5 l de HCl 0,1 M, se neutralizó a un pH 7,3, se dejó sedimentar a 4 °C y, finalmente, se desaló lavándolo 3 veces con agua del grifo para obtener la concentración deseada en un volumen total de 5 l. A continuación, se añadieron 10 g del polvo de CphE en bruto a la suspensión de CGP y se incubó durante 12 h a 30 °C con agitación débil. Una vez completada la degradación de CGP, se realizó la filtración estéril de la solución de dipéptido, se separó de los componentes de proteína en bruto con el mismo sistema de flujo cruzado que se utilizó durante la fase II, se congeló a -30 °C y, finalmente, se liofilizó para obtener 227,5 g de dipéptidos de CGP.

Para su determinación, son necesarias más etapas de filtración para la purificación de los dipéptidos de CGP; se filtraron varias partes alícuotas de 20 ml (tomadas antes de las últimas etapas de congelación y liofilizado) con diferentes membranas que tenían los siguientes COP: 10, 5, 1, y 0,5 kDa. Tras la filtración, se evaluó la pérdida de dipéptidos de CGP determinando el peso en seco de partes alícuotas de 1 ml liofilizadas antes y después de la filtración, así como por análisis de HPLC. En comparación con la solución de dipéptido original, la pérdida de peso en seco máxima durante la filtración fue en el caso de la membrana con el COP más pequeño (0,5 kDa), que fue de un 78,5% (p/p), la membrana con 1 kDa causó una pérdida de 47,8% (p/p), mientras que la de 5 kDa causó una pérdida de 11,6% (p/p); la membrana de filtro con el COP más alto (10 kDa) presentó una pérdida mínima de 7,4% (p/p).

Se controló por análisis de CCF, así como por HPLC, el grado de pureza de los dipéptidos que resultaron de todos los sistemas de filtración; todas las muestras de dipéptido filtradas presentaron el mismo alto grado de pureza (Fig. 7, I). Por tanto, no fueron necesarias más etapas de filtración para la carga de dipéptido principal. El flujo cruzado con el cartucho de 30 kDa fue claramente el instrumento más práctico también para recuperar la porción de proteína de la solución de CGP degradada. Se volvió a congelar y liofilizar la solución de proteínas recuperada. El ensayo de actividad del polvo recuperado sobre placas de agar con recubrimiento superpuesto de CGP mostró que CphE sobrevivió a todos los procedimientos mencionados previamente y que retuvo su actividad (Fig. 2). La tasa de recuperación del polvo bruto fue 78%.

Para el control de calidad final del polvo de dipéptido resultante, se examinaron las muestras directas, así como las muestras hidrolizadas con ácido por CCF; en las muestras directas, se indicó solamente un punto (Fig. 7, I), mientras que las hidrolizadas presentaron los puntos típicos para los aminoácidos habituales aspartato, arginina y lisina (Fig. 7, II). Asimismo, el análisis de HPLC confirmatorio para las muestras hidrolizadas con ácido puso de manifiesto solamente los picos típicos para estos 3 aminoácidos constitutivos. A la vista de estos resultados, se

estimó que la pureza del polvo de dipéptido era superior a un 99%. El resultado final (227,5 g dipéptidos puros) de la degradación de 250 g de CGP indica que la eficacia global del proceso en su totalidad representa un 91%, que se puede incrementar incluso más con futuras optimizaciones.

Ejemplo 3. Producción fermentativa de cianoficina a escala de 500 l: Se produjo una cantidad suficiente de CGP para este estudio en fermentación a escala de 500 l (Elbahloul, Y. y col., Appl. Environ. Microbiol. 71:7759-7767 (2005)). No obstante, la cepa recombinante *E. coli* DH1 (pMa/c5-914::cphAPCC6803) fue cultivada sobre protamilasa al 7% (vol/vol); se demostró que esta concentración era la óptima para la producción durante los experimentos previos sobre la carga de protamilasa disponible.

Durante la fermentación (Fig. 8) y tras las primeras 6 h de incubación, se elevó la temperatura a 37 °C para dar cabida a la inducción del gen (*CphA*) CGP-sintetasa (Frey, K. M. y col., Appl. Environ. Microbiol. 68:3377-3384 (2002)). Las muestras tomadas cada hora presentaron, según lo esperado, una acumulación intracelular progresiva del polímero que alcanzó un máximo al cabo de 13 h (estimado microscópicamente) y permaneció constante después (Fig. 9). La OD_{600nm} alcanzó 18,3 al cabo de 15 h y se terminó entonces la fermentación, si bien los análisis posteriores pusieron de manifiesto un máximo de acumulación de CGP de 13% (p/p de CDM) después de 13 h de fermentación, y que cayó hasta un 10% (p/p de CDM) en el momento de la cosecha (15 h). Tras la extracción de CGP de los 4626 g resultantes de células de masa húmeda (1372 g CDM), se obtuvieron 135 g de polvo de CGP puro; el análisis de HPLC de la CGP indicó solamente los aminoácidos constitutivos aspartato, arginina, además de lisina que representó un 6,8% molar del polímero. La SDS-PAGE confirmó la pureza de la CGP y presentó un peso molecular de 25-30 kDa.

Condiciones de crecimiento óptimas para la cepa DIP1 de *P. alcaligenes*: Los ensayos del medio SM con diferentes concentraciones de citrato, (0,5-10 g l⁻¹) que, según lo demostrado previamente, era un sustrato óptimo para la cepa DIP1 (Sallam, A., y A. Steinbüchel. 2008b. Biotechnological process for the technical production of β-dipéptidos from cyanophycin. En preparación.), demostraron que 6 g l⁻¹ produce un crecimiento máximo (475 unidades Klett tras 13 h a 30 °C). Los cultivos de la cepa DIP1 cultivados sobre 6 g l⁻¹ de citrato en las mismas condiciones pero con diferentes valores de pH (5,5-8,5) demostraron que la cepa DIP1 presenta un pH de crecimiento óptimo de 6,5, mientras que los cultivos a diferentes temperaturas de incubación (15-45 °C) pusieron de manifiesto que 37 °C era la temperatura de crecimiento óptima.

Condiciones de cultivo óptimas para la máxima producción de CphEal mediante la cepa DIP1 de *P. alcaligenes*: Para concluir con las condiciones de cultivo óptimas para una máxima producción de CphEal mediante la cepa DIP1, se cultivaron células en diferentes concentraciones de citrato en las condiciones de crecimiento óptimas cuando las células alcanzaron la fase estacionaria; se indujo la producción de CphEal por adición de 0,25 g l⁻¹ de CGP. Durante las siguientes 5 h, se concentraron las muestras de sobrenadante (100 veces) y se exploraron para determinar la actividad de degradación sobre las placas de agar con recubrimiento superpuesto de CGP, así como fotométricamente. Las muestras de sobrenadante de cultivos con citrato, con concentraciones por debajo de 0,5 o superiores a 4 g l⁻¹ no presentaron ninguna actividad de degradación, al tiempo que se controló la actividad máxima y la subsiguiente producción máxima de CphEal al cabo de 5 h de inducción para cultivos desarrollados sobre 2 g l⁻¹ de citrato. Los experimentos de cultivo posteriores en las condiciones de producción óptimas confirmaron que las células de la cepa DIP1 alcanzan la fase estacionaria al cabo de aproximadamente 13 h de incubación, con lo que se demostró que este momento es el óptimo para la inducción de CphEal. Por lo tanto, se consideró que las siguientes condiciones eran las óptimas para la producción de CphEal: medio SM con 2 g l⁻¹ de ácido cítrico, pH 6,5, 37 °C, inducción al cabo de 13 h y cosecha durante la 16^a hora de incubación.

Inducción óptima de CphEal con CGP e inductor alternativo: Además de CGP, se sometieron a ensayo otros posibles inductores en cultivos de la cepa DIP1: β-dipéptido de CGP, dipéptidos sintéticos (α-arginina-aspartato, α-lisina-aspartato, α-ornitina-aspartato) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EE.UU.), α-poliaspartato (Bayer AG, Leverkusen, Alemania), poli-ε-Lisina (Chisso, Tokio, Japón), L-aspartato, L-arginina, L-lisina, L-citrulina, L-ornitina, así como análogos de aspartato [N-acetil-aspartato, ácido ureidosuccínico (N-carbamoil-aspartato)]. Se sometieron a ensayo todos los inductores a una concentración de 0,25 g l⁻¹ y se ensayó la producción de CphEal sobre placas de agar con recubrimiento superpuesto de CGP, y también fotométricamente. Tan solo CGP, sus dipéptidos y aspartato indujeron cantidades significativas de CphEal. Por consiguiente, se investigaron las concentraciones óptimas y el momento de cosechado de CphEal óptimo en cultivos inducidos con estos tres inductores; para CGP, se sometieron a ensayo concentraciones comprendidas entre 0,001 y 0 g l⁻¹ 1; el efecto inductivo aumentó con concentraciones de hasta 0,05 g l⁻¹, al tiempo que concentraciones más altas presentaron la misma eficacia. La producción máxima de CphEal se obtuvo al cabo de 5 h de inducción con 0,05 g l⁻¹ CGP.

Los cultivos desarrollados en condiciones similares pero inducidos con dipéptidos de CGP dentro del mismo intervalo de concentración sometidos a ensayo para determinar CGP presentaron unos resultados similares en lo que se refiere a la concentración de inductor; sin embargo, la producción máxima de CphEal tan solo se obtuvo al cabo de 3 h de inducción. Se demostró también que el aspartato era un inductor adecuado, obteniéndose una producción máxima de CphEal con 4 g l⁻¹ de aspartato al cabo de 5 h de inducción; sin embargo, en comparación con los cultivos inducidos con una concentración óptima de CGP (0,05 g l⁻¹), la producción de CphEal tras la inducción con aspartato representó solamente la tercera parte.

Condiciones óptimas de degradación de CGP en dipéptidos a través de CphEal en bruto: Con el fin de reducir los volúmenes de reacción manejados y el tiempo necesario para la tercera fase (degradación de CGP) del proceso original, se sometió a ensayo el tiempo de degradación de concentraciones más altas de CGP (50-100 g/l) a 30 °C, con lo que se demostró un aumento colineal del tiempo de degradación con concentraciones decrecientes de CphEal en bruto y con concentraciones crecientes de CGP. En presencia de 10 g l⁻¹ de CphEal en bruto, se controló el período de degradación más corto (4 h) para la concentración de CGP más baja sometida a ensayo (50 g l⁻¹), al tiempo que se requirieron 16 h para degradar la concentración de CGP más alta sometida a ensayo (100 g l⁻¹).

Se llevaron a cabo los experimentos para estimar el pH y la temperatura óptimos para la degradación de CGP mediante el polvo de CphEal en bruto por separado tal como se describe en la sección de materiales y procedimientos. La determinación fotométrica de la CGP remanente en los tubos de reacción indicó que el máximo de degradación de CGP (45%) tuvo lugar a un pH 6,5; no obstante, el intervalo de pH de 5,5 a 7,5 puso de manifiesto resultados similares. Por otra parte, la degradación de CGP aumentó con temperaturas crecientes para alcanzar un máximo de 90% a 50 °C. Por tanto, se repitieron los experimentos para determinar la relación óptima entre las concentraciones de CGP y CphEal con los parámetros óptimos (50 °C, pH 6,5). Esto redujo el tiempo de degradación necesario (en presencia de 10 g l⁻¹ de CphEal en bruto) para concentraciones de CGP de 50 y 100 g l⁻¹ a 1 y 4 h, respectivamente. Asimismo, en las condiciones óptimas, el tiempo de degradación presentó un aumento colineal con concentraciones decrecientes de CphEal en bruto y concentraciones crecientes de CGP. Esta relación colineal puede ser útil para aplicar unos parámetros de degradación óptimos durante aplicaciones de proceso futuras. Se calcula la correspondiente fórmula para concentraciones de CGP de hasta 100 g l⁻¹ y se basa en la concentración de CphEal puro (E); para aplicar extractos en bruto, se debe determinar el contenido en CphEal (véase a continuación) antes de aplicar la fórmula:

$$P \text{ Tiempo de degradación a } 50^\circ\text{C} = 17,55 - 29,891 E \text{ [Concentración deseada de CphEal pura (g/l)]}$$

Purificación de CphEal desde de sobrenadantes en polvo en bruto: Para seguir avanzando hacia un proceso más eficaz y obtener un mejor conocimiento sobre las características de la CGPasa de la cepa DIP1 de *P. alcaligenes*, se sometieron a ensayo varios procedimientos técnicamente aplicables para purificar CphEal de polvo en bruto. Con la precipitación y la purificación de la enzima empleando disolventes como etanol, metanol o acetona no se consiguieron resultados satisfactorios debido a las bajas tasas de recuperación y al bajo efecto de purificación. No obstante, la precipitación con sulfato de amonio proporcionó resultados comparativamente mejores con una concentración de saturación de 70%, aunque el grado de pureza fue bastante bajo también.

Purificación de CphEal a través de la unión específica a sustrato: Se desarrolló un procedimiento sencillo para purificar CGPasa de la cepa DIP1 de *P. alcaligenes*. Para ello, se utilizó la propia CGP insoluble como matriz de unión para la unión específica de CphEal tal como se describe en la sección materiales y procedimientos. Los ensayos previos demostraron que CphEal se une completamente a CGP transcurridos los primeros 5 min, de modo que se consideró como el tiempo de unión mínimo en posteriores aplicaciones. La SDS-PAGE de todas las etapas de purificación presentó una purificación gradual de la enzima (Fig. 10A) y que las dos primeras etapas de lavado son necesarias para eliminar otras proteínas que no se unieron a CGP. Tras la degradación de la matriz de CGP y la eliminación de los dipéptidos por ultrafiltración, se obtuvo un alto grado de pureza de CphEal. Las placas agar con recubrimiento superpuesto de CGP presentaron una alta actividad de la CphEal purificada y la proteína purificada presentó un peso molecular aparente de 45 kDa en la SDS-PAGE. Se confirmó la identidad de CphEal por renaturalización en gel, en el que se recuperó la actividad y se formaron halos de degradación sobre las placas de agar con recubrimiento superpuesto de CGP. La concentración de la CphEal purificada fue 43,2 mg ml⁻¹, al tiempo que el contenido total de proteínas en la solución de proteína en bruto inicial fue 944 µg ml⁻¹. Para detectar el grado de pureza de la enzima purificada con más precisión, se repitió la SDS-PAGE para un volumen de muestra más grande (el triple de volumen) y se manchó durante más tiempo con tinción de plata; esto puso de manifiesto la presencia de unas cuantas bandas más de proteína en concentraciones comparativamente más bajas (Fig. 10B).

Determinación del contenido en CphEal en sobrenadantes de fermentación: Si se desea la aplicación de CphEal pura en aplicaciones de proceso futuras, en primer lugar, ha de estimarse la concentración de CGPasa en los sobrenadantes producidos; por lo tanto, se desarrolló un ensayo rápido utilizando 1 ml de suspensión de CGP con una concentración fija (100 mg l⁻¹) con una OD_{600nm} de 0,215. Se añadieron a esta solución, 3 µl de soluciones de diferentes concentraciones (2,7-43,2 µg ml⁻¹) de la enzima purificada. Se incubaron las reacciones durante 60 min a 30 °C con rotación lenta (3 rpm). Finalmente, se determinó fotométricamente el grado de degradación de CGP a 600 nm. Para garantizar la reproducibilidad del ensayo y la precisión de su fórmula (véase a continuación), deben conservarse los parámetros de ensayo y el intervalo de medida a OD₆₀₀ (0,15-0,215).

$$E \text{ [Contenido de CphEal en el extracto en bruto (µg/ml)]} = [0,2404 - D \text{ (OD}_{600\text{nm}} \text{ tras } 600 \text{ min)}] / 0,0017$$

Cantidades de CGP requeridas para la purificación técnica de CphEal: Para integrar el procedimiento de purificación de enzima en el proceso de producción principal, se ha determinar también la cantidad de CGP que se tiene que unir necesariamente al total de CphEal (en sobrenadantes con un contenido de CphEal conocido). Se añadieron a un volumen de reacción total de 0,5 ml, soluciones de 50 µl de CphEal purificada con diferentes concentraciones (1,4-19 mg ml⁻¹) a diferentes concentraciones de CGP (0,1-6 g l⁻¹). Se incubaron mezclas de reacción durante 10 min a 30 °C con rotación lenta (3 rpm). Después del centrifugado (16000 x g, 2 min), se centrifugaron los tubos de reacción

y se exploraron los sobrenadantes para determinar la actividad en las placas agar con recubrimiento superpuesto de CGP. Para todas las concentraciones de CphEal ensayadas, se multiplicaron por 3 las concentraciones de CGP mínimas que no indujeron halos de degradación por seguridad y después se integraron en una curva de calibración. La fórmula resultante fue la siguiente:

$$C [\text{concentración de CGP necesaria (g/l)}] = [E[\text{contenido de CphEal en el extracto en bruto (μg/ml)}] - 2,4392]/0,9432$$

Caracterización bioquímica de CphEal purificada: La CphEal purificada presentó una actividad de degradación de CGP máxima a 50 °C, al mismo tiempo que tuvo lugar la completa inactivación de la enzima a 68 °C. El intervalo de pH óptimo para la degradación de CGP fue 7-8,5, siendo el óptimo 8,5. Al someter a ensayo la especificidad del sustrato de la CphEal purificada sobre CGP, BSA, caseína bovina y poli(ácido aspártico) presentó la actividad de degradación sobre CGP más alta. No obstante, también se degradó BSA parcialmente (65% en comparación con CGP). La caseína bovina y el poli(ácido aspártico) resultaron mínimamente afectados por la actividad enzimática de la CphEal purificada.

Para obtener información sobre el mecanismo catalítico de CphEal, se realizaron experimentos de inhibidor empleando diferentes inhibidores específicos de grupo (Tabla 1). Se ensayó la inhibición de CGPasa sobre placas agar con recubrimiento superpuesto de CGP y por análisis de HPLC sobre productos de degradación de CGP. Esto puso de manifiesto que la CphEal extracelular es fuertemente inhibida por los inhibidores de serina proteasa Pefabloc y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). También N-bromosuccinimida (oxidante de triptófano) llevó a una total inhibición de la enzima. En contraposición, la formación de halos de degradación por la CphEal no se vio afectada por el inhibidor de tiol proteasa leupeptina o por el inhibidor de metaloproteasa EDTA. El análisis de HPLC confirmó estos resultados excepto para las muestras tratadas con EDTA, que presentaron inhibición de CphEal.

Ejemplo 4. Absorción de dipéptidos de CGP por cultivos celulares de células Caco2: Para probar las aplicaciones potenciales de dipéptidos de CGP en nutrición y terapia, se sometió a ensayo la absorción de estos dipéptidos altamente solubles utilizando cultivos celulares de células Caco2 (células de adenocarcinoma epitelial de colon humano) en un estudio preliminar. Se utilizó medio de Eagle modificado con Dulbecco (DMEM) que contenía 20% de suero de becerro fetal (FCS) y 1% de solución de Glutamina 2 mM como medio de cultivo. Se diseminaron aproximadamente 7000 células Caco2 por pocillo en una placa de 24 pocillos y se incubaron a 37 °C bajo una atmósfera de CO₂ al 5% y aproximadamente un 98% de humedad. Se comprobaron las células microscópicamente de forma diaria hasta que formaron una monocapa al cabo de unas 50 h. Se reemplazó el medio de incubación completamente con 700 μl nuevos por pocillo del mismo medio suplementado con 350 μg/ml de dipéptidos de CGP (90% Asp-Arg: 10% Asp-Lys) o con una mezcla de las cantidades equivalentes de los ácidos L-aspártico, L-arginina y L-lisina libres. Se suministraron a una de las líneas de los pocillos 700 μl nuevos del medio de incubación sin más aditivos y se consideró como el control. Se tomaron muestras tras períodos de incubación de 0, 13, 22, 67 y 113 h y se analizaron por HPLC tal como describe Sallam y Steinbüchel (J. App. Microbiol. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04221.x) para determinar el cambio de concentraciones de los dipéptidos y aminoácidos sometidos a ensayo.

El análisis de HPLC de las muestras del medio puso de manifiesto la absorción de aproximadamente un 60% de los dipéptidos Asp-Arg de cianoficina y un 68% de los dipéptidos Asp-Lys de cianoficina al cabo de 113 h de incubación. Por otra parte, tan solo se absorbió un 41% de la arginina libre y un 51% de la L-lisina libre a lo largo del mismo período de incubación. Excepcionalmente, parece ser que el ácido L-aspártico es mejor absorbido en la forma libre por células Caco2 y que fue absorbido completamente en un período de incubación más corto, de aproximadamente 67 h. En contraposición, y en comparación con las cantidades absorbidas de arginina libre y lisina libre, fueron absorbidos por las células en forma de dipéptidos de CGP un 31,6% más de arginina y un 24,4% más de lisina. Por tanto, los dipéptidos de CGP representan fuentes biodisponibles superiores para ambos aminoácidos, arginina y lisina. Estos resultados constituyen la primera evidencia directa de la potencial aplicación de dipéptidos de CGP en nutrición y terapia y confirman los resultados previos sobre la degradación de CGP por la flora intestinal (Sallam y Steinbüchel J. App. Microbiol. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04221.x). Estos resultados se ajustan asimismo a los estudios *in vitro* e *in vivo* anteriores que demostraron que los oligopéptidos en general tienen una biodisponibilidad más alta que la de sus aminoácidos constituyentes en la forma libre (Adibi, S. A., J. Clin. Invest. 50:2266-2275 (1971); Adibi, S. A., Gastroenterology 113:332-340 (1997); Dock, D. B. y col., Biocell 28:143-150 (2004)).

Tabla 1. Extensión, filogenia y características de bacterias degradadoras de OGP en la flora intestinal de mamíferos, aves y peces

Fuente de flora /Sitio de muestra-País)	Factor de dilución	% de colonias que forman halo	Aislados degradan OGP (total)	Aislados que degradan OGP (anaeróbicamente)	Aislados que OGP identificados	Degradación de OGP		Género
						Oxica	Anoxica	
<u>I. Flora de mamífero</u>								
Bovino:								
[Angus rojo; <i>Bos taurus</i>]								
Rumen(Alemania)	100 x	0,9	7	4	Cepa 15	+	±	<i>Brevibacillus</i>
Colon (Alemania)	100 x	2,1	9	6				
Ovino:								
[Oveja jura; <i>Pecora giurassiana</i>]								
Rumen(Alemania)	100 x	2,3	3	3	Cepa 17	+	+	<i>Bacillus</i>
Retículo (Alem.,)	50 x	1,7	4	3				
Omaso (Alem.,)	100 x	1,6	2	1				
Abomaso (Alem.,)	20 x	1,2	1	1				
Ciego (Alemania)	100 x	3	3	3				
Conejo:								
[Europeo común; <i>Oryctolagus cuniculus</i>]								
Ciego (Alemania)	50 x	1,9	3	2	Cepa 31	+	±	<i>Streptomyces</i>
Ciego (Egipto)	50 x	3,5	1	1				
<u>II. Flora aviar</u>								
Pato:								
[Pato real; <i>Cairina moschata</i>]								
Intestion (Alem.,)	50 x	0,5	2	2	Cepa 38	+	±	<i>Micromonospora</i>
Ciego (Alemania)	50 x	0,6	1	1				

(continuación)

Fuente de flora /Sitio de muestra-País)	Factor dilución	de % de colonias que forman halo	Aislados degradan (total)	que CGP degradan (anaeróbicamente)	Aislados identificados	Degradación de CGP		Género
						Oxica	Anoxica	
Pollos: [Gallo bankiva; <i>Gallus Gallus</i>] Intestino (Alem.)	50 x	0,8	1					
Pavo: [Pavo salvaje; <i>Meleagris gallopavo</i>] Ciego (Egipto)	50 x	1,1	3	2	Cepa 35	+	+	<i>Bacillus</i>
Paloma: [Paloma bravía; Columba livia] Heces (Alemania) Ciego (Egipto)	50 x 50 x	1,5 1,0	5 2	4 1	Cepa 47	+	±,	<i>Brevibacillus</i>
III. Flora de peces Carpa común; <i>Cyprinus carpio</i> Tracto digestivo (Alemania)	50 x	2,5	7	5	Cepa 52	+	+	<i>Pseudomonas</i>
Rutilo ; <i>Rutilus rutilus</i> Tracto digestivo (Alemania)	50 x	0,8	2	2				
Tenga; <i>Tinca tinca</i> Tracto digestivo (Alemania)	50 x	1,2	3	3				
Mojarra plateada; <i>Telapia nilotica</i> Tracto digestivo (Egipto)	50 x	2	3	2	Cepa 49	+	+	<i>Bacillus</i>

+; degradación de CGP completa, ±; degradación CGP parcial

Tabla 2. Visión de conjunto de la extensión, hábitat y filogenia de bacterias capaces de degradar CGP extracelularmente aisladas previamente y durante el estudio.

	Muestra	Fuente de muestra	Número de aislados	Géneros identificados	Cepa más investigada	Enzimas caracterizadas
Bacterias Gram-negativas aeróbicas^a	Agua marina	Mar Báltico	11	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. Anguilliseptica</i>	CphEpa
	Sedimento					
	Aguas estancadas	Alemania		<i>Stryptomycetes</i>	cepa BI.	
Bacterias Gram-positivas aeróbicas^b	Aguas residuales	Alemania				
	Suelo forestal	Alemania	43	<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i>	CphEBm
	Agua fluvial	Alemania		<i>Micromonospora</i> ,	cepa BAC19	
Bacterias anaeróbicas estrictas^{c,d}	Sedimento	Alemania	1	<i>Sedimentibacter</i>	<i>S. hongkongensis</i>	
	aguas estancadas				cepa KI	
	Agua marina,	Jordania	+ 27			
	Aguas residuales	Mar Norte	consorcios mixtos			
Bacterias anaeróbicas Facultativas^e	Marismas,	Mar Báltico				
	Suelo					
	Sedimento	Alemania	1	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. Alcaligenes</i>	
Bacterias degradadoras de CGP y asparaginas anaeróbicas^f	aguas estancadas				cepa DIP1	
	Agua marina	Mar Negro,	242	<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium</i>	CphEal
	Agua fluvial	Turquía		<i>Pseudomonas</i> ,	sp.	
	Suelo	Alemania		<i>Comamonas</i> .		
bacterias degradadoras de CGP de flora intestinal de mamíferos, aves y peces		Francia		<i>Plrotobacter</i>		
		Cáucaso		<i>Oligella</i> ,		
				<i>Ochrobacter</i> ,		
				<i>Sphingomonas</i>		
	Flora intestinal	Alemania	62	<i>Bacillus</i>	8 aislados	
				<i>Previbacillus</i>	cepas 15, 17, 3	
		Egipto		<i>Micromonospora</i>	1,	
				<i>Stryptomycetes</i> ,	35, 38, 47, 49,	
				<i>Pseudomonas</i>	52	

a, b, c, d Datos de Obst, M. y col., J. Biol. Chem. 277:25096-25105 (2002); Obst, M. y col., Biomacromolecules 5:153-161 (2004); Obst, M. y col., Appl. Environ. Microbiol. 71:3642-3652 (2005) y Krug 2001, respectivamente. *e* Datos de Sallam, A. y col., Presentado para publicación (2008). *f* Datos de Zine, S., Diplom thesis, Institut für Molekulare Mikrobiologie und Biotechnologie, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster, Alemania (2004). *g* El presente estudio.

Tabla 3: Efecto de varios inhibidores específicos de grupo en CphEal purificada de cepa DIP1 de *P. alcaligenes*

Especificidad de inhibidor	Inhibidor	Concentración (mM) (baja-alta)	Análisis de HPLC (% inhibición ^b)	
			Concentración inhibidor baja	Concentración inhibidor alta
Tiol proteasas	Leupeptina	0,001- 0,01	10	39
Metaloproteasas	EDTA	30– 60	65 ^c	75 ^c
Serina proteasas	Pefabloc®	8– 80	91	100
Serina proteasas	PMSF	1– 10	0	57
Restos de triptofano	NBS	1- 5	100	100
Controla			0	

^a Control sin inhibidor, ^b Los valores en porcentaje de la inhibición se refieren al control, es decir, la actividad de CGPasa en ausencia de un inhibidor,

^c Los valores no se deben a la inhibición, sino a la formación de precipitados durante la derivación con OPA antes del análisis de HPLC,

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo Pefabloc®: 4-(2-aminoethyl) benzenosulfonilo fluoruro · HCl, NBS: N-bromosuccinimida,

Tabla 4: Comparación entre las características bioquímicas de CphEaI de cepa DIP^o de *P. alcaligenes* strain DIP1 y CGPasas caracterizadas anteriormente

Propiedades de enzima							
Bacteria (Enzima)	Localización	Tamaño molecular (kDa)	Temperatura óptima	intervalo de pH óptimo	Productos de degradación de CGP	Mecanismo	Inhibidores
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 (CphB) ^a	Intracelular	28	35°C	7-8	β-Asp-Arg	Exopeptidasa	Pefabloc®, PMSF, 3,4-dichloroisocoumarin
<i>P. anguilliseptica</i> cepa BI (CphEPa) ^b	Extracelular	43	n.d.	8-8,5	β-Asp-Arg	Exopeptidasa	Pefabloc®, PMSF, NBS
<i>B. megaterium</i> cepa BAC19 (CphEBm) ^c	Extracelular	37	30-42°C	8-8,5	β-Asp-Arg + (β-asp-Arg) ₂	n.d.	Pefabloc®, PMSF, NBS
<i>P. alcaligenes</i> cepa DIP1 (CphEaI) ^d	Extracelular	45	50°C	7-8,5	β-Asp-Arg	n.d.	Pefabloc®, PMSF, NBS

^a Datos de Richter, R. y col., Eur. J. Biochem. 263:163-169 (1999), ^b Datos de Obst, M. y col., J. Biol. Chem. 277:25096-25105 (2002),

^c Datos de Obst, M. y col., Biomacromolecules 5:153-161 (2004), ^d El presente estudio. PMSF: Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo, Pefabloc®: 4-(2-aminoetil) benzenosulfonilo

· HCl, NBS: N-bromosuccinimida, n.d.: no determinado.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Westfaelische Wilhelms-Universitaet Muenster	
5	<120> Producción Biotecnológica de Dipéptidos de Cianoficina	
	<130> 091762wo	
	<150> EP 08158205.8	
10	<151> 13-06-2008	
	<160> 10	
	<170> PatentIn versión 3.3	
15	<210> 1	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> cebador 27f	
	<400> 1	
25	gagtttgatc ctggctcag	19
	<210> 2	
	<211> 15	
	<212> ADN	
30	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador 343r	
35	<400> 2	
	ctgctgcctc ccgta	15
	<210> 3	
	<211> 15	
40	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador 357f	
45	<400> 3	
	tacgggaggc agcag	15
	<210> 4	
50	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
55	<223> cebador 519r	
	<220>	
	<221> misc_feature	
60	<222> (2)..(2)	
	<223> n = T o A	
	<220>	
	<221> misc_feature	
65	<222> (14)..(14)	
	<223> n = T o G	

	<400> 4 gnattaccgc ggcngctg	18
5	<210> 5 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador 536f	
15	<220> <221> misc_feature <222> (5)..(5) <223> n = C o A	
20	<220> <221> misc_feature <222> (17)..(17) <223> n = T o A	
25	<400> 5 cagcngccgc ggtaatnc	18
30	<210> 6 <211> 17 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> cebador 803f	
40	<400> 6 attagatacc ctggtag	17
45	<210> 7 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> cebador 907r	
55	<400> 7 ccgtcaattc attgagttt	20
60	<210> 8 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> cebador 1114f	
	<400> 8 gcaacgagcg caacc	16
	<210> 9 <211> 17 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador 1385r	
	<220>	

ES 2 619 952 T3

<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> n = A o G

5 <400> 9
 cgggtgtgtnc aaggccc 17

10 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> cebador 1525r

 <400> 10
 agaaaggagg tgatccagcc 20

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción enzimática de una composición de β -dipéptido a partir de una preparación de una cianoficina (CGP) o un polímero de tipo CGP, estando las estructuras peptídicas comprendidas esencialmente por una o más unidades de β -dipéptido compuestas de dos aminoácidos seleccionados de ácido aspártico, arginina, lisina, ácido glutámico, citrulina, ornitina y carvanina, procedimiento que comprende la degradación de la preparación de CGP o de polímero de tipo CGP con una CGPasa de *Pseudomonas alcaligenes* en β -dipéptidos, en el que la CGPasa tiene un peso molecular de aproximadamente 45 kDa, una temperatura óptima de aproximadamente 50 °C y un intervalo de pH óptimo de 7 a 8,5 y degrada CGP en β -Asp-Arg.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la CGPasa es una CGPasa de la cepa DIP1 de *P. alcaligenes*.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la CGPasa es la CGPasa de *P. alcaligenes* DIP1 CphEal que ha sido depositada en la DSMZ como DSM 21533.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que:
 - (i) la composición de β -dipéptido se compone de un solo β -dipéptido o de una mezcla de β -dipéptidos; y/o
 - (ii) la composición de β -dipéptido se compone de β -dipéptidos que comprenden restos de aminoácidos seleccionados de aspartato, arginina, lisina y otros restos de aminoácidos presentes en el polímero de tipo CGP.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que los β -dipéptidos/unidades de β -dipéptido se seleccionan de β -aspartato-arginina y β -aspartato-lisina.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además la preparación de la CGP o la preparación de polímero de tipo CGP por cultivo de una línea celular productora procariota o eucariota.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la línea celular productora se selecciona de *Escherichia coli*, *Ralstonia eutropha*, *Acinetobacter baylyi*, *Corynebacterium glutamicum*, *Pseudomonas putida*, cepas de levaduras y biomasa vegetal.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la línea celular productora es *Ralstonia eutropha* H16-PHB-4- Δ eda (pBBR1MCS-2::cphA₆₃₀₈/edaH16) o *E. coli* DH1 (pMa/c5-914::cphA_{PCC6803}).
9. El procedimiento de la reivindicación 6, 7 u 8, que comprende además el aislamiento, la purificación y/o la modificación química del producto de CGP obtenido por cultivo de la línea celular productora.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 6, 7 u 8, en el que el producto de CGP obtenido por cultivo de la línea celular productora se somete directamente, sin aislamiento o purificación, a degradación con la CGPasa.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además la purificación o separación del producto de degradación.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además la modificación química del producto de degradación.
13. Una CGPasa como se definió en la reivindicación 3.

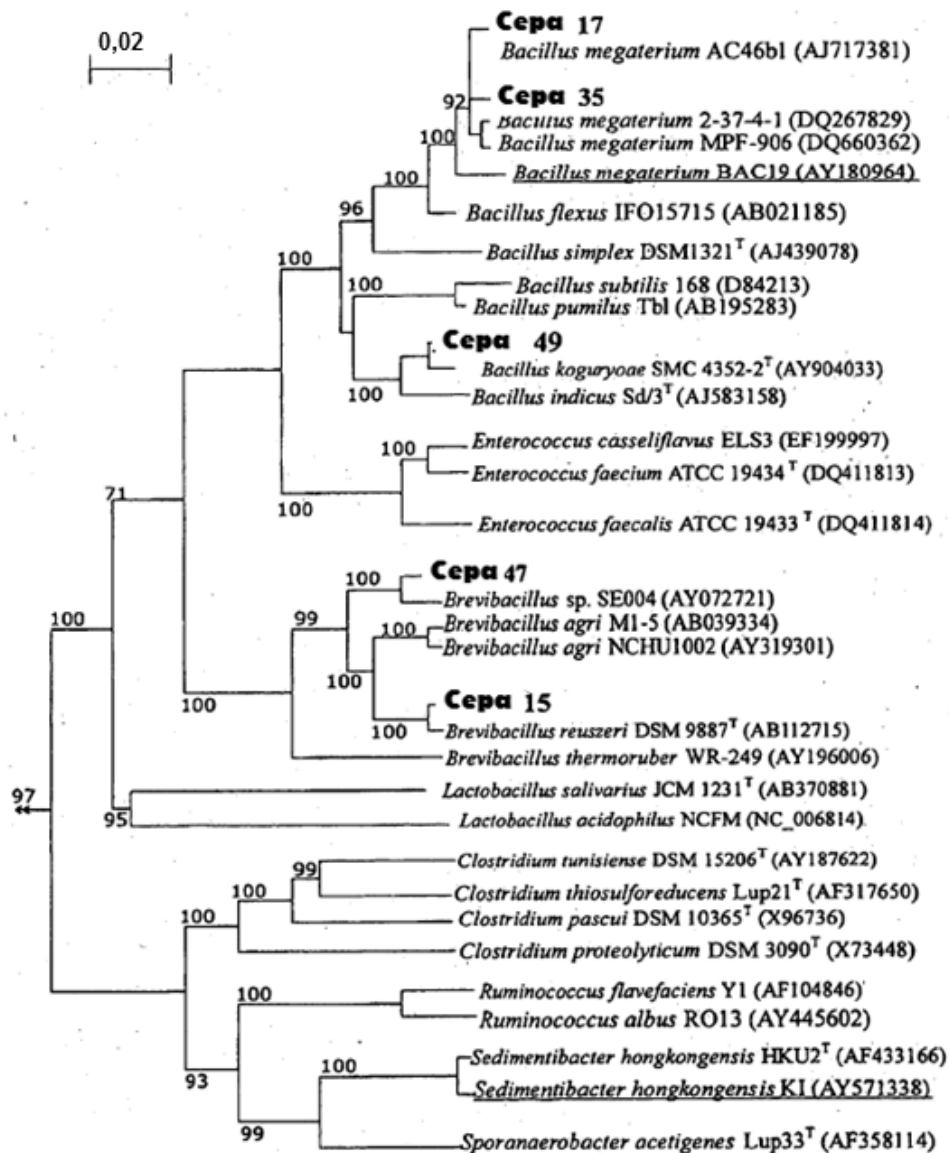


Fig.1A

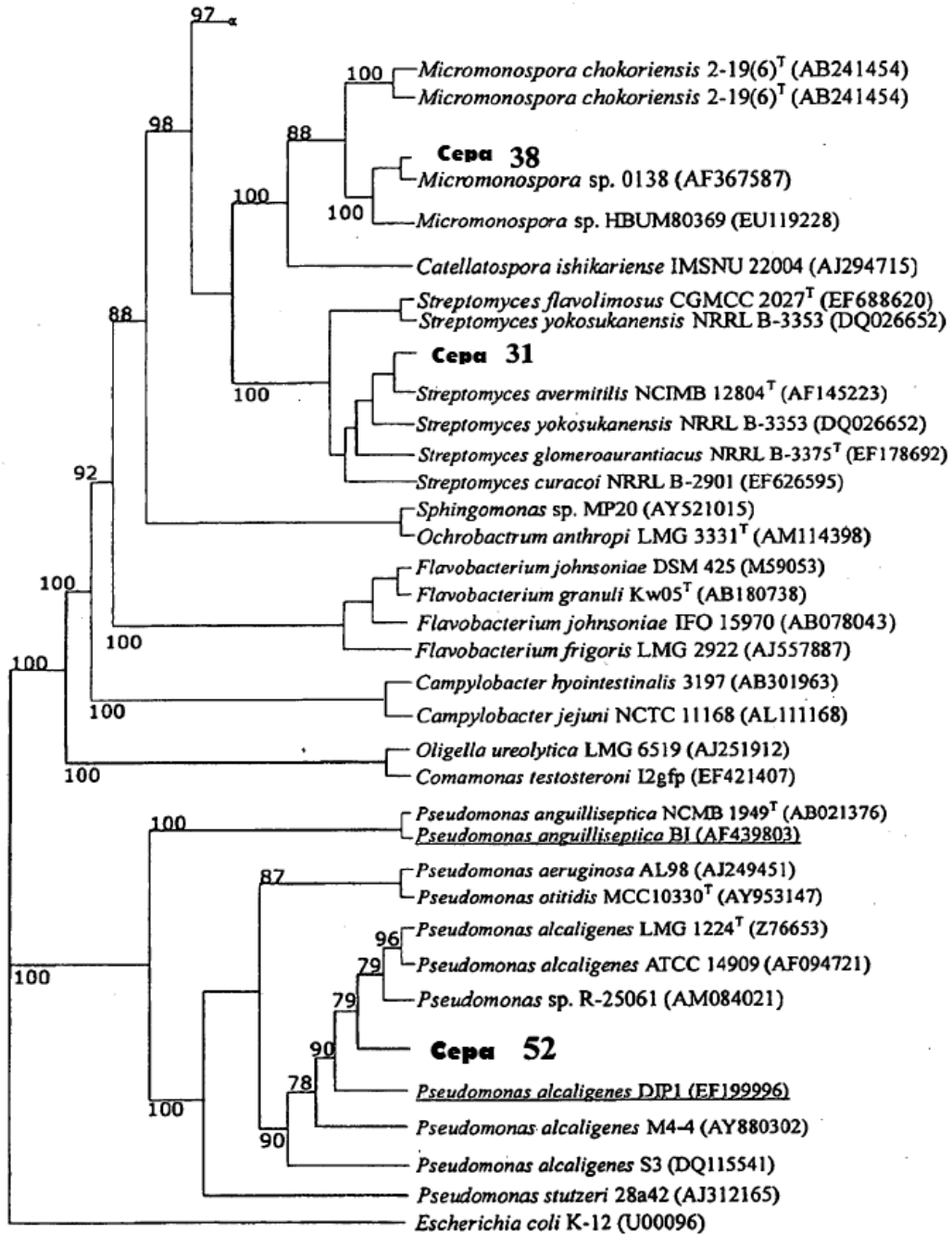


Fig.1B

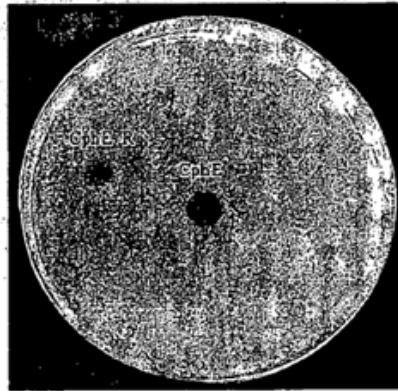


Fig.2

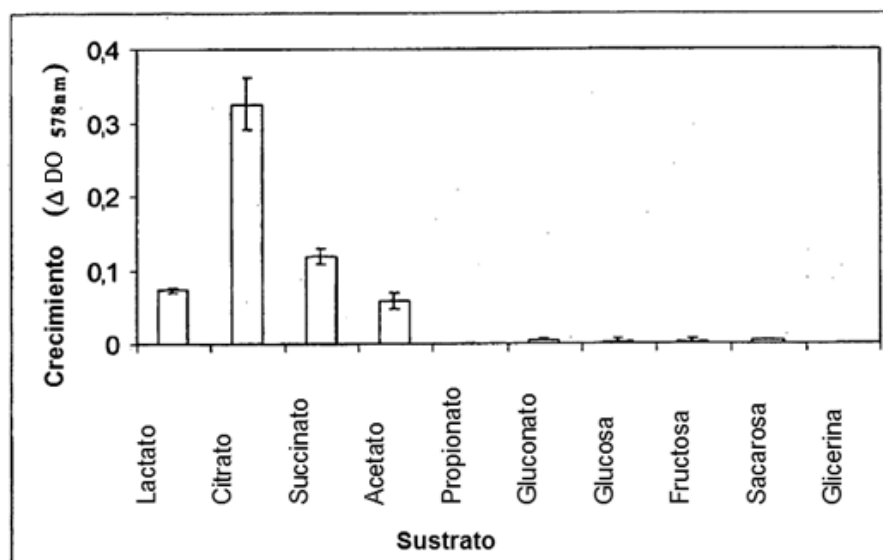


Fig.3

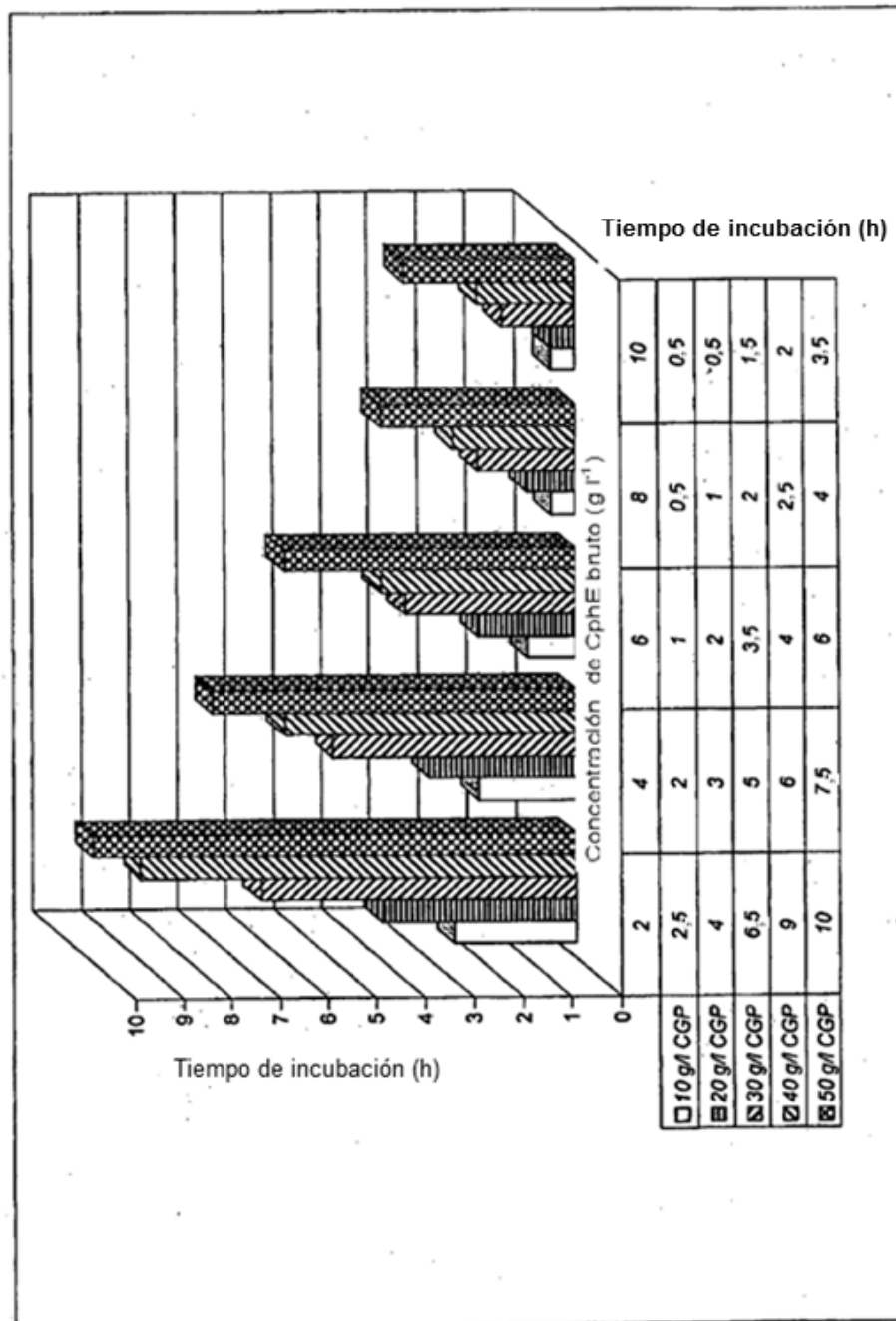


Fig.4

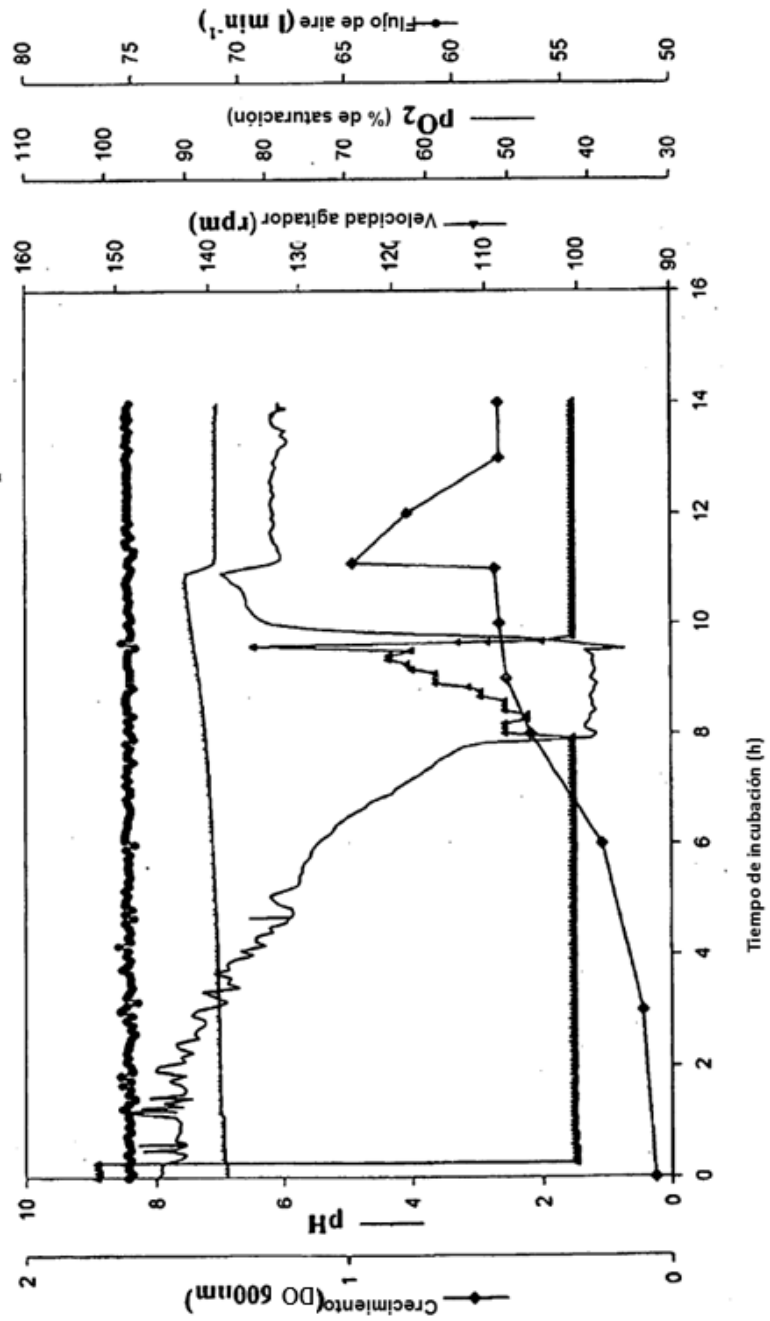


Fig.5

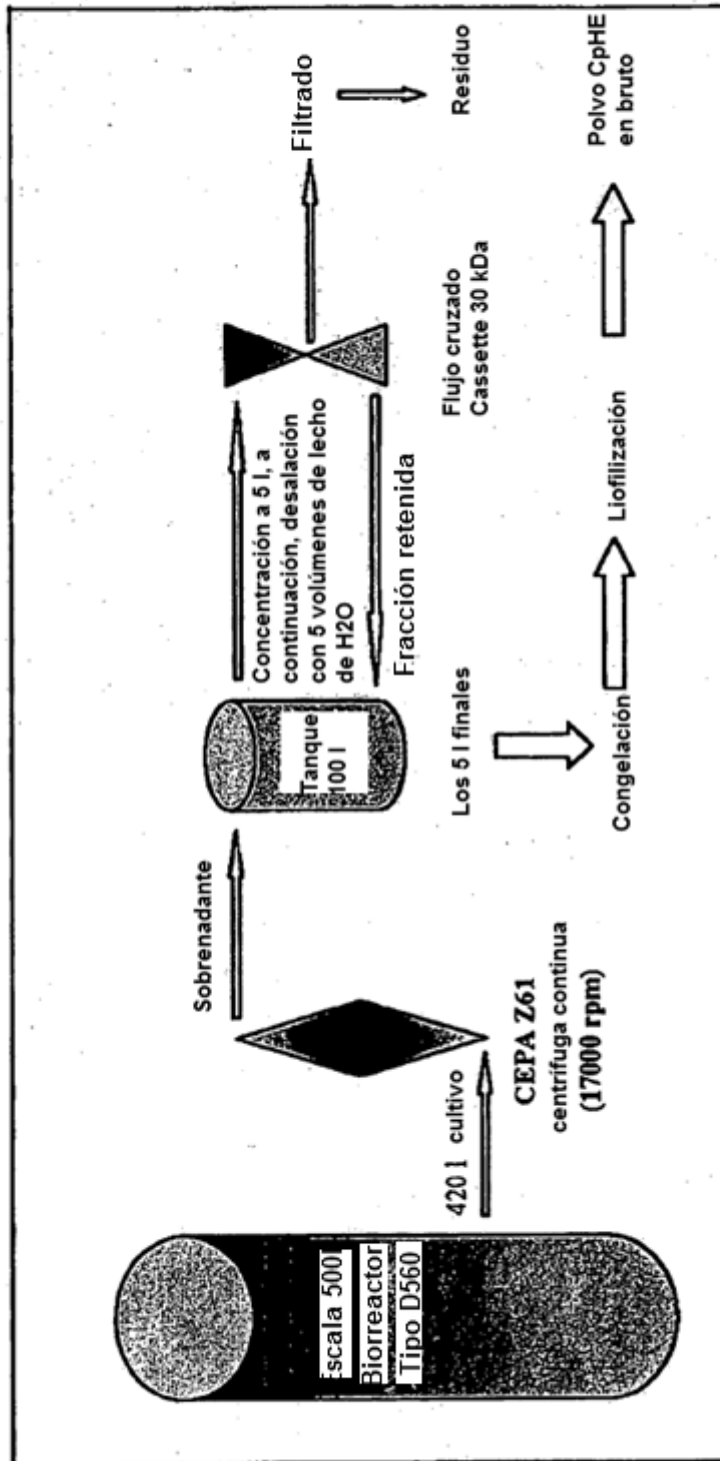


Fig.6

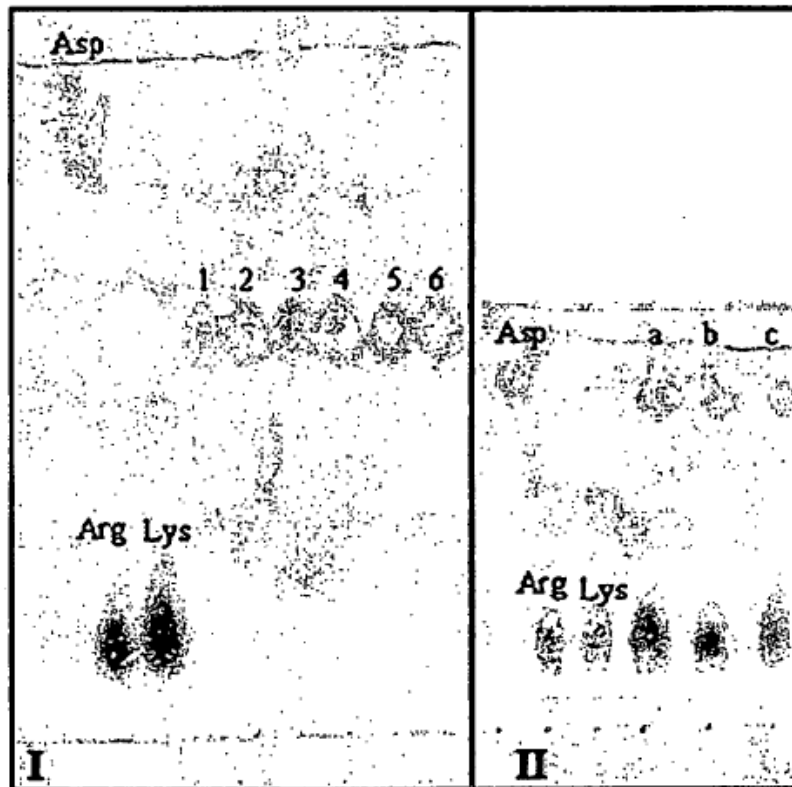


Fig.7

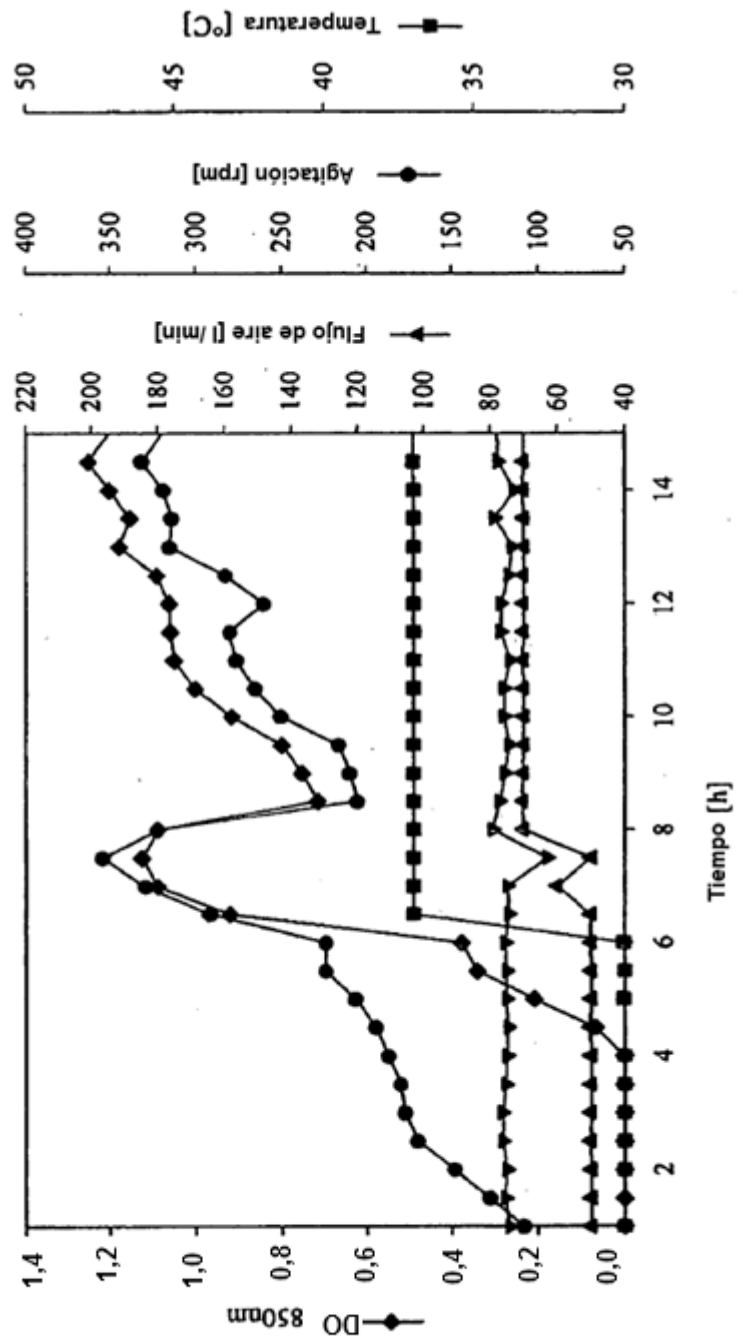


Fig.8

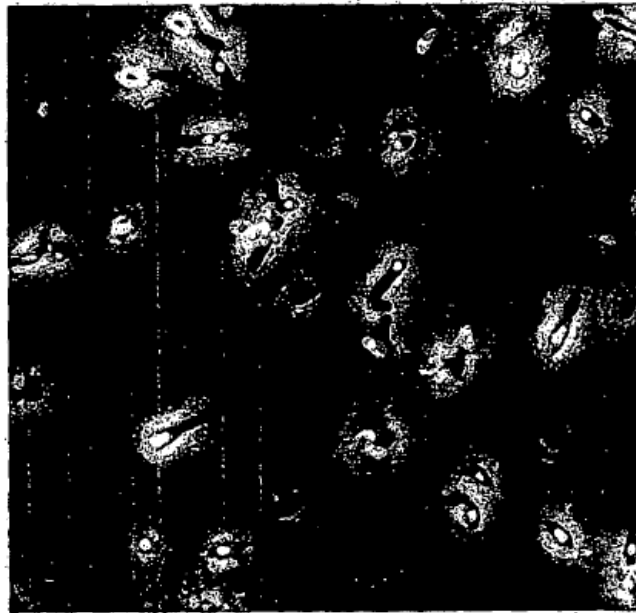


Fig.9

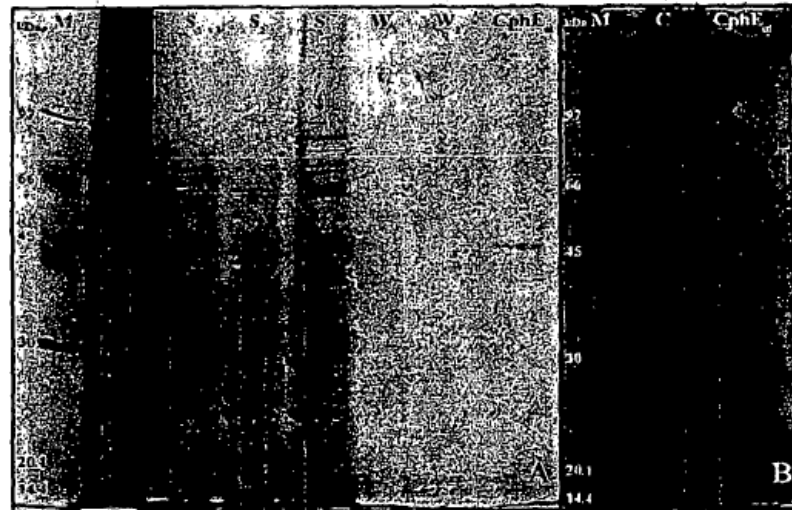


Fig.10