

①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①1 Número de publicación: **2 352 924**

②1 Número de solicitud: 200930266

⑤1 Int. Cl.:

C12N 9/24 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

A23B 4/22 (2006.01)

A23B 7/155 (2006.01)

①2

SOLICITUD DE PATENTE

A1

②2 Fecha de presentación: **04.06.2009**

④3 Fecha de publicación de la solicitud: **24.02.2011**

④3 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
24.02.2011

⑦1 Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

⑦2 Inventor/es: **Escribano Garaizábal, María Isabel;**
Merodio Moreno, Carmen y
Goñi Ramos, Óscar

⑦4 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤4 Título: **Endoquitinasa ácida activa a bajas temperaturas, procedimiento de obtención y usos.**

⑤7 Resumen:

Endoquitinasa ácida activa a bajas temperaturas, procedimiento de obtención y usos.

Endoquitinasa obtenida a partir de la pulpa de especies de la familia *Annonaceae*, catalíticamente activa a bajas temperaturas, con capacidad antifúngica y estable a pH ácido, procedimiento de obtención, y usos.

ES 2 352 924 A1

DESCRIPCIÓN

Endoquitinasa ácida activa a bajas temperaturas, procedimiento de obtención y usos.

5 La presente invención se encuentra dentro de la enzimología, la biotecnología, la biorremediación, biocatálisis y el biocontrol de hongos fitopatógenos, y tiene aplicación en la industria agroalimentaria, energética, medioambiental, farmacéutica y médica. Se refiere a una nueva proteína endoquitinasa catalíticamente activa a bajas temperaturas, con capacidad antifúngica y estable a pH ácido. Se refiere también a un método para el aislamiento, producción y purificación de dicha proteína y su uso en procesos de degradación o modificación de materiales que contienen
10 quitina en condiciones que requieran bajas temperaturas, siendo fácilmente inactivada a temperaturas moderadas o pH alcalinos.

Estado de la técnica anterior

15 La quitina, polisacárido lineal formado por unidades de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) unidas por enlaces β (1-4) glucosídicos, es el polímero más abundante que contiene nitrógeno y el segundo biopolímero más abundante de la Tierra, siendo una fuente de nitrógeno esencial para el crecimiento y supervivencia de ecosistemas marinos y terrestres. Este biopolímero natural es el constituyente principal de la pared celular de los hongos, del exoesqueleto de artrópodos, y del caparazón de algunos otros animales como crustáceos y nematodos.

20 Industrialmente, la quitina es purificada a partir de desechos de crustáceos marinos. Posteriormente es despolimerizada y/o desacetilada, dando lugar a quitosano, oligosacáridos de quitina/quitosano y N-acetil-D-glucosamina/D-glucosamina. La conversión enzimática de quitina es una alternativa respetuosa con el medioambiente al ser sustitutiva de los métodos convencionales que usan productos químicos para su despolimerización, siendo utilizada en procesos de biocatálisis (enzima soluble o inmovilizada), biorremediación y biocontrol (hongos fitopatógenos) y para su aplicación en la industria agroalimentaria (alimentos marinos y conservación de alimentos sanos) y médica.

25 Las endoquitinasas (EC 3.2.1.14, según la clasificación EC-Enzyme Commission numbers-) están presentes en un amplio rango de organismos, entre los que se encuentran los virus, bacterias, hongos, insectos, plantas superiores y animales. Recientemente se ha descrito actividad endoquitinasa en el suero humano. Esta clase de quitinasas hidrolizan de un modo aleatorio la cadena hidrocarbonada de la quitina, generando oligosacáridos de quitina de tamaño variable. Las enzimas endoquitinolíticas desempeñan funciones muy diversas, dependiendo del organismo. Así, están implicadas en la resistencia de las plantas a hongos debido a su naturaleza inducible ante un estrés y su actividad antifúngica *in vitro* (siendo mayoritariamente las endoquitinasas las que muestran esta actividad). En hongos, además de su papel defensivo, presentan funciones autolíticas, nutricionales y morfogenéticas. En virus están involucradas en la patogénesis y en bacterias están relacionadas con la nutrición y el parasitismo.

30 Además de estas funcionalidades naturales, las endoquitinasas pueden ser utilizadas para la producción de quitooligosacáridos, los cuales actúan como agentes antibacterianos e inmunopotenciadores. Incluso la N-acetil-D-glucosamina presenta actividad antiinflamatoria, siendo efectiva en el tratamiento de afecciones gastrointestinales. Gracias a sus conocidas propiedades antifúngicas *in vitro* e *in vivo*, las endoquitinasas pueden ser también aplicadas en la agricultura para el biocontrol de hongos fitopatógenos u otros patógenos vegetales y como biopesticidas (Patil *et al.*, 2000. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 473-483; Kasprzewska 2003. *Biology Letters*, 8, 809-824; Dahiya *et al.*, 2006. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 733-782).

35 Por sus útiles aplicaciones biotecnológicas las quitinasas están ganando importancia en diferentes industrias, como la bioquímica, química o alimentaria. Sin embargo, el éxito en el empleo de estas enzimas hidrolíticas depende del suministro de preparaciones altamente activas y estables en diferentes condiciones de pH y temperatura. Así, una alta estabilidad está generalmente considerada como una ventaja en una determinada etapa industrial puesto que reduce la cantidad de enzima mínima catalíticamente útil en unas condiciones definidas. Con el fin de aumentar la estabilidad de las quitinasas se han empleado múltiples y diferentes estrategias tales como: mutaciones, modificación química del centro activo, introducción de puentes disulfuro, inmovilizaciones de las enzimas, estabilización entrópica, cambio de condiciones del pH y el uso de diferentes sales. Conocer los datos termodinámicos de la estabilidad de las enzimas y de su reacción de catálisis es esencial para predecir el ámbito de la reacción y el estado de cualquier etapa del proceso
50 en el cual la reacción se produce.

55 Para conocer con detalle el efecto de la temperatura sobre la actividad catalítica de una enzima es esencial determinar dos factores: su actividad residual y el valor de la energía libre de Gibbs de activación catalítica (ΔG^*) a una temperatura definida. Recientemente ha cobrado interés el estudio de un nuevo grupo de enzimas llamadas "enzimas adaptadas al frío" (*cold-adapted enzymes*) que, comparadas con sus homologas mesófilas y termófilas, muestran a bajas temperaturas (0-20°C) mayores constantes catalíticas (k_{cat}) y eficiencias fisiológicas (k_{cat}/K_m), y menores valores de la energía de activación (E_a). Otra peculiaridad que tienen es que se encuentran en general, si no siempre, asociadas a una mayor termolabilidad. Este aspecto permite el control de la reacción enzimática a través de la inactivación por calor, mediante la aplicación de temperaturas moderadas (50-60°C). Todos estos aspectos sumados a sus inherentes propiedades bioquímicas permiten que este nuevo grupo de enzimas ofrezcan un considerable espectro de aplicación en diferentes procesos industriales a bajas temperaturas. Dentro de éstos destacan la elaboración de detergentes, la síntesis de productos químicos o farmacéuticos de alta pureza, en la industria alimentaria o en la biorremediación (Gerday *et al.*, 2000. *Trends in Biotechnology*, 18, 103-107).

ES 2 352 924 A1

A pesar de su potencial aplicación biotecnológica, muy pocas enzimas activas a baja temperatura están siendo utilizadas comercialmente, quizá debido al alto riesgo y coste asociado a la obtención de estas enzimas. Entre otras, dos lipasas, una lisozima, una celulasa, una endoxilanas y varias proteasas (Cavicchioli *et al.*, 2002. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 253-261. Joseph *et al.*, 2008. *Biotechnology Advances*, 26 (5), 457-470).

5 En relación con las proteasas adaptadas a bajas temperaturas, existe un documento que describe una proteasa alcalina para su uso como detergente procedente de un actinomiceto (WO 9,743,406; 1996) y dos proteasas procedentes de bacterias CP-58 (WO 9,730,172; 1997) y CP-70 (U.S. 6,200,793; 1998). Con respecto a las lipasas activas a bajas temperaturas, hay dos patentes registradas acerca de esta clase de enzima y sus variantes procedentes de *Candida Antartica* (U.S. 6,020,180; 2000 y U.S. 6,074,863; 2000). Por último dentro de las familias de glicosil-hidrolasas existen dos documentos relacionados: uno de ellos es referente a una β -galactosidasa activa por debajo de 8°C procedente de una bacteria Antártica (Patente U.S. 6,727,084; 2001) y otro a una endoxilanas aislada de un microorganismo psicrófilo (WO 2005/087916). Este tipo de proteínas han sido producidas, hasta ahora, por microorganismos adaptados al frío u organismos psicrófilos, capaces de vivir a temperaturas por debajo de los 5°C, encontrándose su temperatura óptima de desarrollo entre 4°C y 15°C. Las estrategias utilizadas para la obtención de este tipo de enzimas han pasado por el clonaje del gen que las codifica y su expresión recombinante en *E. coli* a bajas temperaturas.

El principal inconveniente derivado del uso de nuevas proteínas en alimentos refrigerados está relacionado con el origen de las mismas. Los requerimientos de seguridad y de aceptación por el consumidor apuntan hacia productos naturales u orgánicos, en contra de aditivos y productos químicos o materiales modificados genéticamente. Una primera aproximación para el reemplazo de estos conservantes químicos podría ser la utilización directa de microorganismos psicrófilos en los alimentos, disminuyendo o eliminando la población de otros microorganismos no deseables. La presencia de los microorganismos en alimentos no es aceptable, por lo que una alternativa a este problema sería la adición de enzimas activas a baja temperatura de origen natural. Debido al gran interés industrial que despierta este tipo de proteínas se están buscando nuevas fuentes naturales. Recientemente hemos solicitado dos patentes de proteínas crioprotectoras procedentes de frutos, una quitinasa básica (P200801914) y una 1,3- β -glucanasa ácida también activas a bajas temperaturas (P200801931).

De todo ello deriva que estas enzimas quitinolíticas activas a bajas temperaturas, además de su aplicación en la industria alimentaria ejerciendo su efecto sobre hongos y bacterias que contaminan y deterioran alimentos refrigerados, pueden ser utilizadas en la industria de alimentos marinos para la degradación de desechos quitinosos de crustáceos, en la síntesis de productos químicos o farmacéuticos de alta pureza, en biorremediación (junto a proteasas, glucanasas y celulasas).

Es necesario encontrar enzimas que exhiban una menor dependencia de su actividad hidrolítica a bajas temperaturas (menores E_a y elevados valores de k_{cat}/K_m y k_{cat}) y un control sobre su inactivación a una temperatura moderada.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona una enzima de origen natural, catalíticamente activa a bajas temperaturas, antifúngica y estable en un rango de pH ácido. Se trata de una proteína endoquitinasa obtenida de la pulpa de chirimoya (*Annona cherimola* Mill), y cuyas propiedades tanto cinéticas como termodinámicas, han sido determinadas mediante técnicas cromatográficas, electroforéticas y espectrofotométricas, tratándose de una proteína monomérica con una masa molecular de 48.500 ± 1.000 Da, y un punto isoeléctrico (pI) de $4,43 \pm 0,09$.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a una proteína quitinasa monomérica aislada de clase I ácida y extracelular (clase Ib), de ahora en adelante proteína de la invención, obtenida de la pulpa de especies de la familia *Annonaceae*, preferiblemente del género *Annona*, que presenta capacidad antifúngica *in vitro* frente a *Botrytis cinerea*, con la capacidad de hidrolizar tanto sustratos poliméricos como oligoméricos solubles, caracterizada por las siguientes propiedades fisicoquímicas:

a) masa molecular de entre 47.500 Da y 49.500 Da, determinada mediante análisis electroforético en geles de poliacrilamida que se realiza en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE),

b) punto isoeléctrico (pI) de entre 4,34 y 4,52 determinado por cromatografía,

c) incluye dos péptidos cuya secuencia aminoacídica se recoge en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2.

El término "aislado", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a una proteína que: 1) se encuentran sustancialmente libre de componentes que normalmente acompañan o interaccionan con ella en la naturaleza, o 2) si se encuentran en su medio natural, ha sido sintéticamente (no naturalmente) alterada por la intervención humana.

En una realización preferida, la proteína de la invención presenta, frente a sustratos poliméricos solubles como el derivado de quitina CM-Chitin-RBV (*-Carboxymethyl-Chitin-Remazol Brilliant Violet-*), un valor de la constante de afinidad (K_m) de 0,16 y 0,18 mg·ml⁻¹, para la constante catalítica (k_{cat}) un valor de entre $1,19 \cdot 10^5$ y $1,21 \cdot 10^5$ $\Delta A_{550} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$, y un valor de la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) de entre $6,5 \cdot 10^5$ y $7,22 \cdot 10^5$ $\Delta A_{550} \cdot \text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. En otra realización aún más preferida, la proteína de la invención presenta frente al oligó-

ES 2 352 924 A1

mero soluble 4-MU- β -(GlcNAc)₃, un valor para la constante catalítica (k_{cat}) de entre 9,56 y 10,58 s⁻¹, un valor para la constante de afinidad (K_m) de entre 0,19 y 0,23 mM y una eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) de entre 44,7 y 51,42 s⁻¹·mM⁻¹.

5 Aunque es una enzima catalíticamente activa y estable en un amplio rango de pH ácido, de 2,5 a 7,5 es también altamente inestable a pH básicos, presentando un pH óptimo de 5,5 ± 0,5. Así, en otra realización preferida de este aspecto de la invención, la proteína es estable en un rango de pH de entre 2,5 y 7,5, presentando un pH óptimo de entre 5 y 6.

10 En esta memoria se dice que una proteína es “estable” cuando conserva más un 90% a 100% de su actividad tras 2 h a un valor de pH o temperatura determinado con respecto a la actividad obtenida en condiciones óptimas. Estable también se refiere a la conformación de las proteínas que presentan mayor número de interacciones débiles entre sus átomos.

15 Como “pH óptimo” de una enzima se entiende aquel valor de pH en el que la proteína desempeña de mejor manera sus funciones, esto es, el pH donde la enzima presenta su actividad máxima, con rápida disminución de la actividad a cada lado de este valor de pH. El pH óptimo de una enzima puede guardar relación con cierta carga eléctrica de la superficie, o con condiciones óptimas para la fijación de la enzima a su sustrato. Cuando hay un exceso de iones hidrógeno, las enzimas los unen a sus moléculas y ante un déficit los ceden.

20 Con respecto a la temperatura, además de ser quitinolíticamente activa a bajas temperaturas, manteniendo al menos un 40% de su actividad a 5°C, presenta una acusada termosensibilidad a partir de 50°C. Así mismo, exhibe un valor bajo de la energía de activación (E_a) de la reacción que cataliza (6,56 ± 0,41 kJ·mol⁻¹). Por tanto, en otra realización preferida, la proteína de la invención, mantiene al menos un 40% de actividad a una temperatura de 5°C. Más preferiblemente mantiene al menos un 50% de actividad a una temperatura de 5°C. En otra realización preferida, la proteína de la invención, presenta una temperatura óptima de entre 33 y 37°C.

25 En esta memoria se entiende por “temperatura óptima” de una enzima aquella en la que la actividad o la velocidad de una reacción catalizada por dicha enzima es máxima. La velocidad de reacción aumenta con la temperatura hasta que comienza a la desnaturalización de la proteína.

30 Los organismos del género *Annona* pertenecen al Superreino *Eukaryota*, Reino *Viridiplantae*, Phylum *Streptophyta*, Orden *Magnoliales*, Familia *Annonaceae*. En una realización preferida, la proteína se aísla de la especie *Annona cherimola* Mill.

35 La naturaleza quitinasa de la proteína de la invención ha sido determinada por inmunodetección con anticuerpos policlonales frente a proteínas quitinasa (PR-Q) de tabaco, viéndose su relación serológica con esta clase de enzimas quitinasas. Posteriormente, la proteína de la presente invención ha sido identificada con una quitinasa de clase I ácida y extracelular (clase Ib) mediante el análisis del mapa de la huella peptídica y la posterior secuenciación *de novo* de los péptidos de la digestión utilizando para ello técnicas de espectrometría de masas. La enzima de la invención presenta una constante de afinidad (K_m) frente al derivado de quitina soluble (CM-Chitin-RBV) de 0,17 ± 0,01 mg·ml⁻¹, similar a la descrita para otras quitinasas de la bibliografía con sustratos poliméricos semejantes. Sin embargo el valor de esta constante frente al oligómero de quitina 4-MU- β -(GlcNAc)₃ (K_m = 0,21 ± 0,02 mM) fue significativamente mayor que la detectada en otras quitinasas de la bibliografía. Frente a esta menor afinidad, la enzima de la invención muestra un valor de la constante catalítica (k_{cat}) de 10,07 ± 0,51 s⁻¹ para este último sustrato, que es tres órdenes de magnitud superior a la detectada en otras quitinasas de la bibliografía. En síntesis, la enzima de la invención muestra una elevada eficiencia catalítica (48,06 ± 3,36 s⁻¹·mM⁻¹), indicando su alto potencial hidrolítico frente a oligómeros de quitina conocidos (Li *et al.*, 2003. *Plant and Cell Physiology*, 44, 1162-1167).

45 La enzima de la invención tiene como ventajas adicionales que es completamente estable en un amplio rango de pH ácido (2,5-7,5), siendo inactivada rápidamente en intervalos más alcalinos. La completa termoestabilidad de la enzima de la invención se ubica entre 5 y 45°C, perdiendo su estabilidad a partir de temperaturas moderadas-altas (superiores a 50°C).

50 El rango de temperaturas donde la enzima de la invención mantuvo el 50% de su actividad se encontraba entre 5 y 50°C. El valor estimado de la k_{cat} a una temperatura de 5°C es del orden del 50% del valor estimado en el ensayo estándar *in vitro* a 37°C siendo por ello una enzima activa a bajas temperaturas. En referencia a este aspecto, la enzima de la invención presentaba valores inusualmente bajos de la energía de activación (E_a = 6,56 ± 0,41 kJ·mol⁻¹) entre 5 y 37°C y de la energía libre de Gibbs de activación catalítica (ΔG^* = 33,79 ± 2,38 kJ·mol⁻¹) a 5°C. Las condiciones óptimas de reacción de la enzima de la invención se situaron en pH 5,5 ± 0,5 y una temperatura de 35 ± 2°C. Por tanto, en una realización preferida la proteína de la invención presenta un valor de E_a de entre 6,15 y 6,97 kJ·mol⁻¹ entre 5 y 37°C, de entalpía de activación (ΔH^*) de entre 3,73 y 4,23 a 37°C y de entre 4,04 y 4,46 a 5°C expresados en kJ·mol⁻¹, de entropía de activación (ΔS^*) (de entre -138 y -131,2 a 37°C y de entre -145,6 y -128,4 a 5°C expresados en J·mol⁻¹·K⁻¹) y de energía libre de Gibbs (ΔG^*) (de entre 26 y 29,2 a 37°C y de entre 31,4 y 36,2 a 5°C expresados en kJ·mol⁻¹).

65 El crecimiento de las hifas del fitopatógeno *Botrytis cinerea* fue inhibido significativamente *in vitro* sobre placas de agar dextrosa de patata (PDA) tras la adición de diferentes concentraciones de la enzima de la invención. En concreto, 10 ± 0,5 µg de proteína fueron suficientes para obtener una superficie de inhibición con un radio mayor que 0,45 ± 0,07 cm.

ES 2 352 924 A1

La proteína de la invención puede utilizarse, de manera soluble o inmovilizada, por ejemplo inmovilizada mediante distintos procedimientos como el enlace a soportes sólidos, el atrapamiento en geles, la encapsulación en vesículas, el entrecruzamiento entre moléculas de enzima y el confinamiento en birreactores de membranas, acoplados por ejemplo a sistemas de filtración, intercambio iónico o pH.

5

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la proteína se encuentra en forma soluble. Sin embargo, cuando las enzimas se aplican como reactivos en forma soluble, se produce su pérdida, una vez utilizadas, lo que aumenta el coste en los procesos industriales. Aunque la enzima por regenerarse en el proceso podría usarse muchas veces, su separación a partir de la mezcla de reacción no es económicamente factible. Por eso ha significado un avance importante la posibilidad de inmovilizar las enzimas sobre soportes inertes, reteniendo así gran parte de su actividad catalítica original. Como las reacciones enzimáticas se desarrollan en medio acuoso, la matriz del soporte debe ser insoluble en agua, pero tan hidrófila que garantice un buen contacto con el medio de la reacción. En general, presentan una serie de ventajas:

10

15 - son térmicamente más estables que las enzimas nativas y más resistentes a la autólisis,

- al final de una reacción catalizada enzimáticamente, la enzima enlazada puede separarse por simple centrifugación o filtración, sin necesidad de agregar un reactivo de inactivación o precipitación,

20

- una vez recuperada, la enzima enlazada puede volver a usarse las veces que se desea, sin pérdida sustancial de actividad después de un simple lavado con soluciones tampones acuosas y permitiendo realizar así procesos enzimáticos continuos.

25

Por tanto, en una realización más preferida de este aspecto de la invención, la proteína se encuentra inmovilizada.

Por tanto, otro aspecto se refiere a una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende la proteína endoquitinasa monomérica de la invención. Como se ha dicho anteriormente, la endoquitinasa de la invención tiene la propiedad de inhibir el crecimiento de las hifas de hongos, como se ha demostrado con el fitopatógeno *Botrytis cinerea*, pudiendo ser usada en alimentación, agricultura y medicina. De esta manera, la composición de la invención comprenderá los excipientes y vehículos adecuados dependiendo de su uso, esto es, vehículos y excipientes no tóxicos adecuados para su empleo en alimentación, agricultura, y/o farmacéuticamente aceptables para su empleo como medicamento. La proteína de la invención podría ser formulada como un líquido (una solución o suspensión) o como un sólido. Puesto que las enzimas endoquitinasas necesitan agua libre para poder llevar a cabo su actividad, la proteína de la invención se puede, por ejemplo, formular como una solución acuosa, o como polvos secos que contengan la proteína, que será activa una vez el agua se encuentre disponible, por ejemplo, por la lluvia. En cualquier caso, el agua será el vehículo preferido cuando los componentes de la composición de la invención sean solubles en ella.

30

40

Así mismo, la presente invención describe un procedimiento de aislamiento de la proteína de la invención con una recuperación de entre el 4,85 y el 7,85% y un factor de purificación de entre 42 y 66, de la proteína, de manera que si se parte de una pequeña cantidad de material vegetal (250 ± 50 gramos) se obtienen alrededor de $0,25 \pm 0,10$ mg de una proteína pura a homogeneidad y con elevada actividad específica.

45

Por tanto, otro aspecto de la invención lo constituye un procedimiento de aislamiento y purificación de la proteína de la invención, en adelante procedimiento de la invención, que comprende:

50

a) pretratar a bajas temperaturas, entre 3 y 10 días a unos $4-10^{\circ}\text{C}$, el material vegetal de partida, que taxonómicamente pertenece a la familia *Annonaceae*, preferiblemente al género *Annona*, y aún más preferiblemente a la especie *Annona cherimola* Mill,

55

b) extracción de las proteínas del material vegetal, mediante su triturado y homogeneización en un medio acuoso constituido por una disolución acuosa salina, tamponada en un pH comprendido entre 3,0 y 10,0 y a una temperatura de entre 3 y 30°C ,

c) ultrafiltración, para separar los carbohidratos poliméricos, especialmente sustancias pécticas y almidón, y otras moléculas de gran tamaño de las proteínas,

60

d) separación de la proteína de la invención del resto de proteínas de la fracción soluble mediante técnicas de precipitación selectiva, y

e) purificación de la proteína de la invención separada en el paso (d).

65

En una realización preferida el procedimiento de la invención permite el aislamiento de la proteína de la invención con una recuperación de entre el 4,85 y el 7,85%. En una realización aún más preferida, el procedimiento de la invención permite el aislamiento de la proteína de la invención con un factor de purificación de entre 42 y 66.

ES 2 352 924 A1

En otra realización preferida, como *material de partida* se emplea material vegetal, tejidos de frutos y/o subproductos de la manipulación y comercialización de frutos, de plantas de la familia *Annonaceae*, más preferiblemente del género *Annona*, y aún más preferiblemente la pulpa de chirimoyas (*Annona cherimola* Mill.). Dicho material preferiblemente se encuentra conservado en condiciones atmosféricas entre 3 y 10 días a unos 4-10°C.

La extracción de las proteínas del material vegetal del paso (b) del procedimiento de la invención se puede realizar, pero sin limitarse, tal y como se describe en el ejemplo 1. Preferiblemente se realiza a un pH de entre 4 y 6, preferiblemente a un pH de aproximadamente pH= 5, Más preferiblemente se realiza a una temperatura de entre 3 y 5, y aún más preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 4°C. Opcionalmente, en esta etapa pueden adicionarse secuestradores de fenoles, como por ejemplo polivinilpirrolidona soluble, al medio acuoso.

Tras la homogeneización se separa la parte soluble del residuo sólido por medio de cualquier técnica convencional de separación de sólido-líquido, como por ejemplo sin que limite el alcance de la invención, por centrifugación. La fracción soluble resultante o extracto crudo que es la que contiene la actividad quitinasa, se ultrafiltra por medio de discos de membrana con filtro de 100.000 MW con el fin de eliminar los polímeros de naturaleza coloidal presentes en estos tejidos de dicha fracción soluble. Posteriormente, el filtrado proteico es fraccionado y concentrado mediante ultrafiltración empleando discos de membrana de 10.000 MW obteniendo finalmente más del $92 \pm 5\%$ de las unidades enzima con actividad quitinasa contenido en la fracción inicial.

Durante la etapa (b) del procedimiento de la invención se observaron inicialmente por parte de los inventores dificultades para obtener altos rendimientos de la proteína quitinasa de la invención, por lo que se añadieron antioxidantes (como el ácido ascórbico, por ejemplo) y agentes quelantes de cationes al medio acuoso que facilitaron una extracción más eficaz de la proteína de la invención debido a que solubilizan las pectinas de la matriz vegetal en las condiciones de la extracción. Por tanto, una realización particular la extracción (b) del procedimiento de la invención se realiza mediante la adición de antioxidantes, preferentemente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, ácido ascórbico. En otra realización particular, la extracción (b) del procedimiento de la invención se realiza mediante la adición de agentes quelantes de cationes, por ejemplo pero sin limitarse, ácido etilendiamino-tetraacético sal disódica 2-hidrato (EDTA).

La separación de la proteína de la invención puede realizarse por cualquier método conocido en el estado de la técnica, preferiblemente mediante técnicas de precipitación selectiva, y aún más preferiblemente mediante el fraccionamiento con sulfato amónico por saturación progresiva. Las proteínas con actividad quitinasa son solubles a bajas concentraciones de sulfato amónico y precipitan cuando se eleva significativamente la concentración de dicha sal. El fraccionamiento con sulfato amónico por saturación progresiva, por el que se separa la proteína de la invención del resto de proteínas de la fracción soluble, comprende varias etapas:

- precipitación de proteínas a baja concentración de sulfato amónico entre 10% y 30%, preferentemente con 20%, obteniéndose un sobrenadante enriquecido en actividad quitinolítica,

- saturándose progresivamente con sulfato amónico hasta llegar a una concentración del 80% y 90%, preferentemente del 85%,

- lavado y ultrafiltrado del precipitado, por ejemplo, por una membrana de 10.000 MW,

Para la separación de la proteína de la invención de otras proteínas de la fracción soluble pueden emplearse otros métodos de precipitación selectiva de proteínas como por ejemplo, sin que limite el alcance de la invención, temperatura, pH, solventes orgánicos o polímeros solubles.

El precipitado, lavado y ultrafiltrado por la membrana de 10.000 MW, tiene actividad quitinasa y comprende una mezcla de isoenzimas con actividad quitinasa que contiene más del $73 \pm 5\%$ de las unidades iniciales.

Adicionalmente el extracto obtenido se puede someter a un *proceso de purificación* (d) para obtener la proteína de la invención purificada parcialmente o a homogeneidad, o bien dicho extracto se puede desecar o liofilizar y mantenerlo como fuente de enzima con alta actividad endoquitinasa para ensayos que no requieran el empleo de dicha proteína con elevada pureza. Para la purificación de la proteína de la invención (d), se puede usar cualquier técnica convencional de purificación de proteínas, como técnicas de ultrafiltración, cromatográficas de intercambio iónico (DEAE-Celulosa, DEAE-Sepharosa, Mono S; Mono Q; Source S; Source Q; CM-Sepharose) y de cromatofoco (Mono P). En una realización particular de este aspecto de la invención la purificación de d) se realiza mediante técnicas cromatográficas. En una realización aún más preferida, se realiza en dos etapas: (1) mediante cromatografía de intercambio aniónico debido a la naturaleza ácida de la proteína de la invención y (2) mediante cromatografía de afinidad.

El procedimiento de aislamiento de la proteína de la invención descrito manifiesta un alto rendimiento reflejado en una recuperación del $6,35 \pm 1,5\%$ y un factor de purificación de 54 ± 12 . Concretamente se pueden obtener valores de alrededor de 1,0-1.5 mg de proteína pura a homogeneidad y con elevada actividad específica por kg de material vegetal. Si se extrapolan estos datos a escala industrial supone la obtención de una gran cantidad de quitinasa a partir de un material desechable y económico como el caso de un subproducto procedente de cooperativas agrarias o empresas de transformación de frutos, valorizando un residuo suponiendo una salida comercial del mismo.

ES 2 352 924 A1

La proteína de la invención, por sus características cinéticas, puede ser utilizada en cualquier aplicación propia de las proteínas con actividad quitinasa, incluso en reacciones que requieran una alta eficiencia catalítica. Además, debido a su alto valor para la constante catalítica a 5°C y bajos valores de energía de activación, la enzima de la invención puede presentar aplicaciones en biocatálisis cuando las reacciones requieran bajas temperaturas como en el caso de la utilización de solventes orgánicos muy volátiles; en biorremediación como el tratamiento de residuos-desechos ricos en quitina a baja temperatura; en biocontrol como agente fitopatógeno, evitando enfermedades en las plantas y cultivos, y/o en la conservación de alimentos sanos en condiciones que requieran bajas temperaturas. En todos los casos además de ser una enzima hidrolítica estable a bajas temperaturas, tiene la ventaja añadida de su inactivación a moderada-alta temperatura o pH básico.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso de la proteína de la invención como biocatalizador en reacciones químicas. En una realización preferida de este aspecto de la invención, se refiere al uso de la proteína de la invención como biocatalizador de reacciones que transcurren a temperaturas de entre 0 y 50°C. En otra realización aún más preferida, se usa como biocatalizador de reacciones que transcurren a temperaturas de entre 0 y 10°C. Más preferiblemente, la reacción transcurre a temperaturas de entre 2 y 6°C. En otra realización preferida, la reacción transcurre a un pH de entre 2,5 y 7,5, y más preferiblemente a un pH de entre 5 y 6. Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la proteína de la invención o de la composición de la invención para inhibir el crecimiento de un hongo.

En esta memoria se entiende por “hongo” cualquier organismo unicelular o pluricelular perteneciente al superreino Eucariota, y al reino Fungi.

Como se ha dicho, el uso de la proteína o la composición de la invención para inhibir el crecimiento de los hongos es útil en campos como la alimentación, la agricultura y la medicina. Así, en alimentación, la proteína o las composiciones de la invención pueden emplearse como conservantes, para prevenir o retrasar el crecimiento de hongos. La proteína de la invención puede ser utilizada sola o mezclada con otros aditivos, en diferentes matrices para la conservación de alimentos sanos pudiendo ser ingerida al ser de origen natural y activa a muy bajas concentraciones. Además, su aislamiento es compatible con su inocuidad como aditivo alimentario.

En el campo de la agricultura, la proteína endoquitinasa de la invención, o las composiciones que la comprendan, pueden actuar frente a hongos parásitos de plantas (Lorito *et al.*, 1998. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95: 7860-7865), aplicándose sobre las semillas, las hojas, las raíces o los frutos de la planta a ser protegida, o sobre el suelo que rodea dicha planta, o directamente sobre el hongo. Normalmente la aplicación es tópica, pero pueden emplearse otras estrategias de administración. Enzimas como endoquitinasas permiten la degradación de los componentes de la pared celular del fitopatógeno y se considera como uno de los mecanismos importantes del control biológico frente a hongos fitopatógenos. En este campo la proteína o las composiciones de la invención también pueden emplearse para biodegradación de otros materiales que contengan quitina.

La proteína endoquitinasa o las composiciones de la invención pueden ser útiles en el campo de la medicina. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso de la proteína de la invención, o de la composición de la invención, para la elaboración de un medicamento. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de la proteína de la invención, o de la composición de la invención, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de micosis.

El término “medicamento”, tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. Incluye, por tanto, no solo su actividad como antifúngico, sino también el empleo de la enzima para el diagnóstico de las micosis, como se describe para una enzima similar, pero sin limitarnos, en el documento de patente US 6,093,552.

En esta memoria se entiende por “micosis” las infecciones en el cuerpo humano o animal provocadas por un hongo u otro organismo del reino Fungi. Pueden ser superficiales (como la dermatofitosis o tineas o tiñas, candidiasis superficiales, la pitiriasis versicolor y las onicomicosis), intermedias o cutáneas, cuando hay afección de las mucosas y capacidad de difusión, o micosis profundas o sistémicas, que se presentan en circunstancias muy especiales (inmunodeficiencia - candidiasis diseminada). Estas últimas llegan a afectar a órganos internos, siendo la mayoría de las veces adquiridas por inhalación y el pulmón es el órgano diana (por ejemplo, las infecciones por *Aspergillus*, *Coccidioides*, *Blastomyces* o *Histoplasma*).

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición o el medicamento comprende excipientes farmacológicamente aceptables. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la composición o el medicamento comprende, además, otro principio activo. Preferiblemente, la composición o el medicamento comprende además una enzima glucanasa.

Como se emplea aquí, el término “principio activo”, “sustancia activa”, “sustancia farmacéuticamente activa”, “ingrediente activo” ó “ingrediente farmacéuticamente activo” significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

Tanto las composiciones de la presente invención, así como la preparación combinada pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse, en disolución acuosa estéril o en fluidos biológicos, tal como suero. Las disoluciones acuosas pueden estar tamponadas o no tamponadas y tienen componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y similares, y nutrientes incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Alternativamente, las composiciones pueden prepararse para su administración en forma sólida. Las composiciones pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a; aglutinantes tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes tales como ácido algínico o almidón de maíz; lubricantes tales como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes tales como menta o salicilato de metilo.

Tales composiciones y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse a, intraperitoneal, intravenoso, intramuscular, subcutáneo, intracecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmico. En el caso de las micosis superficiales la administración es, preferiblemente, tópica.

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo, tolerancia,... del mamífero, incluyendo al hombre. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de proteína endoquitinasa (o de las composiciones) de la invención, profármacos, derivados o análogos de dicha endoquitinasa que produzcan el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichos profármacos, derivados o análogos y el efecto terapéutico a conseguir, esto es, aquella capaz de inhibir el crecimiento de los hongos. Los "adyuvantes" y "vehículos farmacéuticamente aceptables" que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Fig. 1. *Análisis electroforético e inmunológico de la proteína purificada de 48.500 Da con actividad endoquitinasa.* (A) Análisis electroforético (SDS-PAGE). Las líneas 2 y 3 fueron cargadas con 2 μ g de proteína purificada no reducida y reducida con 1,25% (v/v) de β -mercaptoetanol. La línea 1 fue cargada con las proteínas de referencia de masa molecular. El gel fue teñido con azul de Coomassie. (B) Inmunoensayo de un gel similar al mostrado en A con la enzima de la invención purificada, en su forma no reducida, e incubado con anticuerpos policlonales frente a proteínas PRQ de tabaco (dilución 1:7000).

Fig. 2. *Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la proteína endoquitinasa.* El resultado obtenido fue expresado como porcentaje de actividad relativa respecto al máximo de actividad obtenida. (A) Relación entre el pH de la reacción y la actividad relativa de la enzima de la invención medida bajo condiciones de ensayo estándar (37°C, 10 minutos) usando tampones 0,1 M (pH 2,0 a 13,0). (B) Estabilidad de la enzima de la invención respecto al pH. La solución enzimática fue mezclada con tampón 0,1 M (pH 2,0 a 13,0) y mantenida a 37°C durante 2 horas. La actividad residual de la enzima tratada se ensayó bajo condiciones estándar. (C) Relación entre la temperatura (5°C a 80°C) de la reacción y la actividad relativa de la enzima de la invención medida tras la incubación en tampón acetato sódico 0,1 M, pH 5,0. (D) Estabilidad de la enzima de la invención respecto a la temperatura. El efecto de la temperatura fue examinado después de pre-incubar a diferentes temperaturas (5°C a 80°C) en tampón acetato sódico 0,1 M, pH 5,0, durante 2 horas. La actividad residual de la enzima tratada se ensayó bajo condiciones estándar. Las barras de error representan el ES (n = 3).

Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que describen la obtención y características de la endoquitinasa ácida de la invención.

Ejemplo 1

Obtención de la proteína con actividad endoquitinasa aislada de chirimoya

1.1 Etapa de Extracción y Ultrafiltración

Se pesaron 250 g de la pulpa de chirimoya que fueron congelados en nitrógeno líquido para favorecer la trituración y homogeneización de este material. La homogeneización se realizó en tampón acetato sódico 0,1 M pH 5,0 conteniendo ácido ascórbico 20 mM, 1,5% de polivinilpirrolidona soluble y ácido etilendiaminotetra-acético sal disódica 2-hidrato (EDTA) 10 mM.

ES 2 352 924 A1

Después de la homogeneización la parte soluble fue separada del residuo sólido por centrifugación (35.000 x g durante 30 minutos). El residuo sólido resultante fue sometido a dos ciclos más de lavado, homogeneización y centrifugación en las disoluciones anteriores. Los sobrenadantes de estas fracciones se mezclaron constituyendo el extracto crudo.

5

Ultrafiltración

El extracto crudo obtenido en la etapa anterior se filtró utilizando un sistema de ultrafiltración Amicon Diaflo 80200 (Millipore) con una membrana Biomax PBHK de un poro de corte de 100.000 MW (Millipore). Los carbohidratos poliméricos, especialmente sustancias pécticas y almidón, y otras moléculas de gran tamaño quedaron así retenidas en la parte superior mientras que las proteínas de interés se recuperaron en la fracción filtrada. El material retenido fue lavado con dos fracciones de tampón Tricina 50 mM, pH 8,0 antes de concentrar la fracción filtrada diez veces en el mismo equipo de ultrafiltración, utilizando para ello una membrana YM-10 con un tamaño de poro de 10.000 MW (Millipore). Después de este proceso más del $92 \pm 5\%$ de las unidades de enzima con actividad quitinasa se encuentra en esta fracción.

15

1.2 Fraccionamiento

20

El filtrado proteico obtenido en la etapa anterior fue saturado al 20% de saturación con sulfato amónico. Después de 1 hora en agitación a 4°C, el extracto se centrifugó a 12.000 x g durante 15 minutos y el precipitado, carente de actividad quitinasa, fue desechado. El sobrenadante se llevó al 85% de saturación con sulfato amónico y se dejó 1 hora en agitación a 4°C. Después fue centrifugado a 15.000 x g durante 20 minutos a 4°C y el precipitado obtenido se guardó como fuente de la proteína con actividad quitinasa. Este precipitado se disolvió en tampón Tricina 20 mM pH 8,0 conteniendo glicerol al 10%. La disolución resultante se desaló por ultrafiltración utilizando una membrana con un tamaño de poro de 10.000 MW a 4°C. Este extracto final obtenido presenta una mezcla de isoenzimas con actividad quitinasa que contiene el $73 \pm 5\%$ de las unidades de actividad iniciales.

25

30

1.3 Aislamiento y Purificación a homogeneidad

A partir del extracto obtenido en la etapa anterior se aisló una proteína con actividad endoquitinasa, con un elevado grado de pureza, mediante un protocolo que comprende las siguientes etapas:

35

1.3.1 Cromatografía de intercambio aniónico

Se utilizó una columna Mono-Q HR 5/5 (Amersham Biosciences) acoplada a un sistema de FPLC (Amersham Biosciences) y fue equilibrada con un tampón Tricina 20 mM pH 8,0 conteniendo glicerol al 10%. Se aplicó la muestra en la columna, tras filtrarla a través de un filtro de PVDF de 0,22 μm . Ésta fue eluída utilizando el tampón de equilibrado con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 1 M de 25 minutos y una velocidad de flujo de 1 ml·min⁻¹. Se monitorizó la absorbancia del eluido a 280 nm, recogiendo fracciones de 1 ml en las que posteriormente se valoró la actividad quitinasa mediante un ensayo colorimétrico usando CM-quitina-RBV (Loewe Biochemica) como sustrato. Las fracciones que mostraban actividad quitinasa, eluídas con NaCl entre 0,08 y 0,60 M, fueron concentradas y desaladas por ultrafiltración con una membrana YM10, denominándose fracción ácida.

45

1.3.2 Cromatografía de afinidad

50

La fase estacionaria utilizada en la cromatografía de afinidad fue quitina regenerada, un sustrato sintético preparado mediante una reacción de reacetilación de quitosano (Sigma, EE.UU.). Una vez obtenida la quitina ésta se disolvió en 250 ml de tampón MES 20 mM, pH 6,3, incorporando la mezcla a una columna de vidrio de 15 x 3 cm (424 cm³). Una vez equilibrada y compactada la fase estacionaria se incorporó un disco de celulosa en la parte superior del lecho de la columna.

55

La fracción ácida fue aplicada directamente a la columna de quitina regenerada. Una vez pasada toda la muestra, se cerró la columna, almacenándola durante 30 minutos a 10°C. La columna se lavó con dos fracciones de 1 litro de tampón de acetato sódico 20 mM, pH 5,5 en un régimen de flujo por gravedad, concentrando el volumen lavado por ultrafiltración (membrana YM10). Las proteínas quitinasas fueron posteriormente eluídas con 4 volúmenes de 500 ml de NaCl 2,0 M. Esta fracción se concentró y desaló mediante ultrafiltración con tampón 20 mM, pH 8,0 conteniendo glicerol al 10%.

60

1.3.3 Cromatografía de intercambio aniónico

65

Se utilizó una columna Mono-Q HR 5/5 acoplada a un sistema de FPLC y fue equilibrada con un tampón Tricina 20 mM pH 8,0 conteniendo glicerol al 10%. Se aplicó la muestra en la columna, tras filtrarla a través de un filtro de

ES 2 352 924 A1

PVDF de 0,22 μm . Ésta fue eluída utilizando el tampón de equilibrado con un gradiente lineal de NaCl de 0 a 1,0 M de 25 minutos y una velocidad de flujo de 1 ml·min⁻¹. Se monitorizó la absorbancia del eluído a 280 nm, recogiendo fracciones de 1 ml en las que posteriormente se valoró la actividad quitinasa mediante un ensayo colorimétrico usando CM-quitina-RBV como sustrato. El análisis electroforético e inmunológico reveló que la fracción eluída con NaCl 0,35 M contenía aislada la enzima de la invención la cual se desaló y se liofilizó. Con el procedimiento de purificación descrito se obtuvo 0,23 \pm 0,1 mg de enzima de la invención con un factor de purificación de 54 \pm 12 y una recuperación del 6,35 \pm 1,5%.

10 Ejemplo 2

Caracterización de la proteína con actividad endoquitinasa aislada de chirimoya

15 2.1. Determinación de la pureza, masa molecular y punto isoeléctrico

La determinación de la pureza de la proteína purificada se llevó a cabo mediante técnicas de electroforesis sobre geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) con proteína no reducida y proteína reducida con 1,25% de β -mercaptoetanol. La presencia de una sola banda electroforética revela la pureza de la proteína de la invención purificada (Figura 1A). La presencia de una única banda en condiciones reductoras muestra la naturaleza monomérica de la proteína. La masa molecular de la proteína purificada se determinó por electroforesis desnaturalizante con un porcentaje de acrilamida de 13,5%, utilizando un patrón preteñido de proteínas de baja masa molecular: lisozima de huevo (18.800 Da), inhibidor de tripsina de soja (28.200 Da), anhidrasa carbónica bovina (37.200 Da), ovoalbúmina de huevo (52.300 Da), seroalbúmina bovina (93.600 Da) y fosforilasa B de músculo de conejo (106.900 Da). Posteriormente se construyó una curva de calibrado representando los valores del logaritmo de la masa molecular de cada proteína frente a sus movilidades electroforéticas relativas (Rf). El cálculo de la masa molecular en condiciones no reductoras revelan que la enzima de la invención presenta una masa molecular de aproximadamente 48.500 \pm 1.000 Da.

La inmunodetección con anticuerpos policlonales frente a proteínas PR-Q de tabaco establece que esta proteína purificada de chirimoya está serológicamente ligada con quitinasas de tabaco (véase Figura 1B). La detección se hizo mediante un ensayo de quimioluminiscencia (ECL System, GE-Healthcare), utilizando una dilución para el anticuerpo primario de 1:7000 y para el secundario de 1:5000.

La determinación del *pI* de la proteína de la invención se realizó por cromatografía utilizando una columna Mono-P HR 5/20 (Amersham Biosciences) acoplada a un sistema de FPLC (Amersham Biosciences) equilibrada con tampón piperazina-HCl 25 mM, pH 5,5 con glicerol al 10%. Se preparó una disolución filtrada de 0,03 mg de la proteína purificada en 2 ml del tampón de la columna. La elución se llevó a cabo mediante un gradiente de pH de 5 a 4 de 56 minutos utilizando tampón Polybuffer 74-HCl (Amersham Biosciences) 10% (v/v), pH 4,0, con una velocidad de flujo de 0,8 ml·min⁻¹ y recogiendo fracciones de 1 ml. El punto isoeléctrico se calculó midiendo la absorbancia a 280 nm de las diferentes fracciones y su pH respectivo con un pH-metro Micro-pH 2000 (Crison). Los resultados revelan que la proteína de la invención es una proteína ácida con un *pI* < 5, concretamente de 4,43 \pm 0,09.

45 2.2. Identificación de la proteína

La identificación se llevó a cabo mediante el análisis del mapa de la huella peptídica o *peptide mass fingerprint* (PMF) y posterior secuenciación *de novo* de dos péptidos de la digestión con tripsina por espectrometría de masas acoplada en serie (EM/EM), usando un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems).

Para la determinación de la huella peptídica, se aisló la proteína en un gel SDS-PAGE, digiriéndola con tripsina desde la propia banda. El extracto digerido, compuesto por péptidos de diferente tamaño, fue adicionado a la matriz y cristalizado. Se trabajó con la muestra en modo reflectrón positivo y promediando los espectros obtenidos a partir de 500 disparos por espectro en el rango de *m/z* de 750 a 4500. Los espectros se calibraron internamente utilizando los iones derivados de los péptidos de autodigestión de la tripsina (*Mr*: 842,5100; 1045,5642; 2011,1046; 2807,3145; 3337,7577). Los criterios utilizados para la detección de los picos fueron; relación S/N mínima de 8 y anchura de la ventana de ruido en la coordenada del parámetro masa/carga (*m/z*) de 200.

Para la secuenciación *de novo* se seleccionó el precursor/péptido adecuado con la información de la huella peptídica. Como paso previo, las muestras digeridas se desalaron utilizando un ZipTip C-18 (Millipore, EE.UU.). El precursor, seleccionado por el espectrómetro automáticamente, se fragmentó activando el sistema de disociación inducida por colisión (CID). La energía de colisión fue de 1 keV y el gas utilizado aire atmosférico a una presión de 2-3·10⁶ kPa con un intervalo de masa para el ión precursor de \pm 10 kDa. Los criterios utilizados para la detección de los picos fueron; relación S/N mínima de 20 y resolución > 6000.

Dos péptidos fueron caracterizados mediante un análisis de la secuencia *de novo* para la enzima de la invención (*m/z* = 1435,7369, 2028,9387), obteniendo las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEO ID NO: 2. Las secuencias resultantes de estos péptidos fueron utilizadas para caracterizar la proteína de la invención a través de las búsquedas de homología

con los algoritmos MS-BLAST y FASTS. El resultado de esta exploración fue la asociación significativa de estos dos péptidos con una quitinasa ácida (*pl* 7,52 y M_r 27.300 Da) de la familia 19 de una gramínea *Cynodon dactylon* L. (número de acceso base de datos NCBI para la proteína homóloga gi:4008072, SEQ ID NO: 3) sin especificar en la base de datos NCBI la clase a la que pertenece.

5

Por sus características bioquímicas, y en especial por su capacidad de unión a una matriz de quitina regenerada (probable presencia de un dominio de unión a quitina, CBD, en la estructura de la proteína), junto a su elevada masa molecular indican que la enzima de la invención puede catalogarse como una enzima quitinasa de clase I, concretamente a la subclase clase Ib o I*, que engloba un grupo de enzimas quitinasa definidas por un *pl* ácido y presentes en el medio extracelular.

10

2.3. Determinación de la actividad enzimática

La proteína con actividad quitinasa aislada de chirimoya, proporcionada por esta invención, cataliza la hidrólisis de varios compuestos.

15

La actividad enzimática de esta quitinasa se determinó por el siguiente método en el que CM-quitina-RBV se utilizó como sustrato (Wirth & Wolf. 1990. *Journal of Microbiological Methods*, 12: 197-205).

20

En primer lugar, 200 μ l de sustrato CM-quitina-RBV 2 mg·ml⁻¹ y 530 μ l de tampón acetato sódico 0.1 M pH 5,0 fueron llevados a un volumen final de reacción de 730 μ l. Después de atemperar la reacción a 37°C, se añadieron 70 μ l de la disolución enzimática y la reacción fue incubada 10 minutos en agitación continua.

25

La reacción se paró con la adición de 200 μ l de HCl 1N y se almacenó en hielo 10 minutos. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas para precipitar la fracción no degradada del sustrato. El sobrenadante fue diluido con agua ultrapura (1:1) y se midió su absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro convencional frente a un blanco que contenía la muestra enzimática inactivada con HCl 1N. Una unidad (U) de actividad quitinasa se definió como el incremento de absorbancia a 550 nm en un ml y por minuto. La concentración de proteína (mg·ml⁻¹) fue determinada con el método de Bradford. La combinación de ambas técnicas permitió calcular los valores de actividad específica (U·mg⁻¹) de la proteína con actividad quitinasa. La enzima de la invención purificada presenta una actividad total de 1196 U y una actividad específica de 5146,13 U·mg⁻¹. Los datos cinéticos (K_m , k_{cat} y k_{cat}/K_m) obtenidos frente al derivado de quitina soluble (CM-Chitin-RBV) revelan que la enzima de la invención presenta una constante de afinidad (K_m) de $0,17 \pm 0,01$ mg·ml⁻¹, similar a la descrita para otras quitinasas de la bibliografía con sustratos poliméricos semejantes, un valor para la constante catalítica (k_{cat}) de $1,20 \pm 0,01 \cdot 10^5 \Delta A_{550} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$, y una alta eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) de $6,86 \pm 0,36 \cdot 10^5 \Delta A_{550} \cdot \text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Además, el valor estimado de la k_{cat} para la enzima de la invención a una temperatura de 5°C es del orden del 50% ($0,64 \pm 0,05 \cdot 10^5 \Delta A_{550} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$) del valor estimado en el ensayo estándar a 37°C, siendo por ello una enzima quitinolíticamente activa a bajas temperaturas.

30

35

2.4. Mecanismo de hidrólisis

Una forma de distinguir entre las diferentes clases de quitinasas es determinar su mecanismo de hidrólisis comparando sus actividades frente a diferentes oligosacáridos sintéticos de N-acetilglucosamina asociados a grupos con actividad fluorescente, como el 4-metilumbelliferil (4-MU). Se utilizaron tres sustratos muy sensibles que generan un producto fluorescente tras su hidrólisis enzimática. Estos compuestos funcionan como dímeros, trímeros o tetrameros, en donde el grupo 4-MU se encuentra unido con un enlace β -(1-4) a los oligosacáridos de N-acetilglucosamina presentando únicamente el compuesto 4-MU libre hidrolizado de los oligosacáridos actividad fluorescente.

40

Se prepararon soluciones madre de los sustratos 4-MU- β -GlcNAc, 4-MU- β -(GlcNAc)₂ y 4-MU- β -(GlcNAc)₃ con una concentración de 50 μ M de tampón acetato sódico 50 mM a pH 5,0. Se incubaron muestras de 5 ng de la proteína quitinasa purificada disueltas en 2,25 ml de tampón acetato sódico 50 mM, pH 5,0 durante 30 minutos a 37°C en agitación con 0,75 ml de la disolución madre de sustrato.

50

A continuación a reacción se detuvo con 0,25 ml de tampón carbonato/bicarbonato sódico 1 M, pH 10,7 y se midió su fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 355 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm frente a un blanco que contiene los anteriores reactivos sin la enzima.

55

Los datos de intensidad de fluorescencia se tradujeron a concentraciones de 4-MU usando los parámetros de una curva de calibración construida previamente usando concentraciones crecientes, de 10 a 150 nM, de 4-MU disuelto en tampón carbonato/bicarbonato sódico 100 mM, con pH 10,4.

60

Los datos cinéticos (K_m , k_{cat} y k_{cat}/K_m) obtenidos frente a cada sustrato fluorescente demostraron que la proteína de la invención es una endoquitinasa, al hidrolizar 4-MU desde el trímero (k_{cat} $22,86 \pm 1,23$ s⁻¹ y K_m $0,19 \pm 0,02$ mM) y el tetramero (k_{cat} $10,07 \pm 0,51$ s⁻¹ y K_m $0,21 \pm 0,02$ mM), no teniendo actividad con el dímero. Además estos datos demostraron que esta enzima presenta una alta eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m $116,32 \pm 8,96$ s⁻¹·mM⁻¹ para el trímero y $48,06 \pm 3,36$ s⁻¹·mM⁻¹ para el tetramero).

65

ES 2 352 924 A1

2.5 Determinación del pH óptimo

El intervalo de pH óptimo al cual la proteína endoquitinasa muestra su máxima actividad fue examinado usando el mismo medio de reacción que el utilizado en el Ejemplo 2.3. pero se utilizaron diferentes tampones para los diferentes intervalos de pH:

Tampón ácido fosfórico 100 mM para pH 2,0

Tampón glicina-HCl 100 mM para pH 3,0

Tampón acetato sódico 100 mM para pH 4,0-6,0

Tampón fosfato sódico 100 mM para pH 6,5-7,0

Tampón Tris-HCl 100 mm para pH 9,0

Tampón glicina-NaOH para pH 11,0-13,0.

El resultado obtenido fue expresado como porcentaje de actividad relativa respecto al máximo de actividad obtenida. La enzima de la invención tiene un pH óptimo de $5,5 \pm 0,5$ y una actividad relativa superior al 50% entre pH 3,5 y 6,5 aproximadamente (Figura 2A).

2.6 Ensayo de Estabilidad frente al pH

Para el ensayo de la estabilidad frente al pH de la proteína purificada en la invención se midió la actividad quitinasa residual después de la incubación durante 2 horas a diferentes valores de pH y se utilizaron para ello los tampones descritos en el Ejemplo 2.5, a 37°C en tampón acetato sódico 100 mM, pH 5,0, siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 2.3. El resultado fue expresado como porcentaje de actividad relativa respecto al máximo de actividad obtenida. La enzima de la invención es muy estable en un margen de pH ácido, mostrando después de 2 horas cerca de un 100% de actividad relativa entre pH 3,0 y 7,0 aproximadamente, siendo rápidamente inactivada a pH fuera de dicho margen (Figura 2B).

2.7. Determinación de Temperatura óptima

La actividad de la enzima de la invención se midió en un intervalo de temperatura comprendido entre 5°C y 80°C siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 2.3. El resultado fue expresado como porcentaje de actividad relativa respecto al máximo de actividad obtenida. La enzima de la invención presenta una temperatura óptima a aproximadamente $35 \pm 2^\circ\text{C}$, desarrollando una actividad relativa superior al 50% entre 5°C y 50°C aproximadamente (Figura 2C). La estimación de los parámetros termodinámicos de activación para la enzima de la invención purificada estableció que presenta valores bajos de entalpía activación (ΔH^*) ($3,98 \pm 0,25$ a 37°C y $4,25 \pm 0,21$ a 5°C expresados en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), de entropía de activación (ΔS^*) ($-134,6 \pm 3,4$ a 37°C y $-137,0 \pm 8,6$ a 5°C expresados en $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) y de energía libre de Gibbs (ΔG^*) ($27,6 \pm 1,6$ a 37°C y $33,8 \pm 2,4$ a 5°C expresados en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). La determinación del valor de energía de activación (E_a) entre 5°C y 37°C estableció que la enzima de la invención presenta un valor bajo, del orden de $6,56 \pm 0,41 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ comparada con la mayor parte de las hidrolasas (Dicko *et al.*, 2001. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 94, 225-241).

2.8. Ensayo de Estabilidad térmica

Para el ensayo de la estabilidad térmica de la proteína purificada en la invención se midió la actividad quitinasa residual después de la incubación durante 2 horas a diferentes temperaturas, entre 5°C y 80°C, siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 2.3. El resultado fue expresado como porcentaje de actividad relativa respecto al máximo de actividad obtenida. La enzima de la invención es termosensible a partir de aproximadamente 50°C, manteniendo una actividad relativa de más del 90% después de 2 h entre 5°C y 45°C (Figura 2D).

2.9. Determinación de Actividad antifúngica

El bioensayo de la actividad antifúngica de la enzima de la invención se realizó según el método descrito por Mauch *et al.* 1988 (*Plant Physiology*, 88, 936-942) utilizando para ello el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* (cepa 20518, C.E.C.T. Valencia, España) crecido en medio sólido de agar dextrosa de patata (PDA) a 25°C durante 7 días en oscuridad. Las esporas fueron recogidas de las placas Petri con 5 ml de una solución de 1% Tween-20 en agua ultrapura y ajustada su concentración hasta obtener $1,5 \cdot 10^6$ esporas- ml^{-1} . Todo el trabajo se realizó bajo estrictas condiciones de esterilidad con el fin de evitar contaminaciones exteriores.

ES 2 352 924 A1

Para el ensayo se añadió 10 μ l de la solución de esporas en el centro de placas Petri de 100 mm x 15 mm con 20 ml de PDA, incubándolas durante 24 horas a 25°C en oscuridad. Cuando el tamaño de la colonia fue de 1 cm, se colocaron filtros de celulosa blancos y estériles de 0,7 cm a un 1 cm de distancia del borde del micelio de la colonia. Se añadieron cantidades crecientes de la enzima de la invención purificada a homogeneidad (10-40 μ g), o extractos semi-purificados (60-300 μ g) disueltos en 30 μ l de tampón acetato sódico 20 mM, pH 5,5. Todas las muestras ensayadas fueron filtradas a través de un filtro estéril de PVDF de 0,22 μ m (Millipore, EE.UU.). En todos los ensayos se incorporó un disco control, el cual solo contenía tampón acetato sódico 20 mM, pH 5,5. A continuación se incubaron las placas Petri durante 35 horas más y se fotografiaron. De esta manera, si la proteína, o mezcla de ellas, presentase actividad antifúngica, se observaría una zona de inhibición de crecimiento del micelio alrededor de los discos. La actividad antifúngica de la enzima de la invención purificada se expresó como “distancia de inhibición fúngica”, en cm, siendo ésta la relación entre la superficie de inhibición en presencia de la proteína purificada con respecto a la zona de crecimiento del micelio de *Botrytis cinerea* del disco control. La distancia de inhibición fúngica de la enzima de la invención purificada fue de unos $0.45 \pm 0,07$ cm.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 352 924 A1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proteína endoquitinasa monomérica aislada de clase I ácida y extracelular (clase Ib), derivada de la pulpa de especies de la familia *Annonaceae*, que presenta alta actividad catalítica a bajas temperaturas y capacidad antifúngica *in vitro* frente a *Botrytis cinerea*, con la capacidad de hidrolizar tanto sustratos poliméricos como oligoméricos solubles, **caracterizada** por las siguientes propiedades fisicoquímicas:
- 10 a. masa molecular de entre 47.500 Da y 49.500 Da, determinada mediante análisis electroforético en geles de poliacrilamida que se realiza en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE),
- b. punto isoeléctrico (*pI*) de entre 4,34 y 4,52 determinado por cromatoenfoco, e
- 15 c. incluye dos péptidos cuya secuencia aminoacídica se recoge en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2.
- 20 2. Proteína endoquitinasa monomérica según la reivindicación anterior, que presenta frente a sustratos poliméricos solubles, (CM-Chitin-RBV), un valor de la constante de afinidad (K_m) de 0,16 y 0,18 mg·ml⁻¹, para la constante catalítica (k_{cat}) un valor de entre 1,19·10⁵ y 1,21·10⁵ ΔA₅₅₀·min⁻¹·mM⁻¹, y un valor de la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) de entre 6,5·10⁵ y 7,22·10⁵ ΔA₅₅₀·ml·min⁻¹·mM⁻¹·mg⁻¹.
3. Proteína endoquitinasa monomérica según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que presenta frente al oligómero soluble 4-MU-β-(GlcNAc)₃, un valor para la constante catalítica (k_{cat}) de entre 9,56 y 10,58 s⁻¹, un valor para la constante de afinidad (K_m) de entre 0,19 y 0,23 mM y una eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) de entre 44,7 y 51,42 s⁻¹·mM⁻¹.
- 25 4. Proteína endoquitinasa monomérica según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, estable en un rango de pH de entre 2,5 y 7,5.
- 30 5. Proteína endoquitinasa monomérica según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que mantiene más de un 40% de actividad a una temperatura de 5°C.
6. Proteína endoquitinasa monomérica según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que presenta una temperatura óptima de entre 33 y 37°C.
- 35 7. Proteína endoquitinasa monomérica según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que presenta un valor de E_a de entre 6,15 y 6,97 kJ·mol⁻¹ entre 5 y 37°C, de entalpía de activación (ΔH^*) de entre 3,73 y 4,23 a 37°C y de entre 4,04 y 4,46 a 5°C expresados en kJ·mol⁻¹, de entropía de activación (ΔS^*) (de entre -138 y -131,2 a 37°C y de entre -145,6 y -128,4 a 5°C expresados en J·mol⁻¹·K⁻¹) y de energía libre de Gibbs (ΔG^*) (de entre 26 y 29,2 a 37°C y de entre 31,4 y 36,2 a 5°C expresados en kJ·mol⁻¹).
- 40 8. Proteína endoquitinasa monomérica según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, aislada de la especie *Annona cherimola* Mill.
9. Proteína endoquitinasa monomérica según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que se encuentra en forma soluble.
- 45 10. Proteína endoquitinasa monomérica según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que se encuentra inmovilizada.
- 50 11. Composición que comprende una proteína endoquitinasa monomérica según cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
12. Procedimiento de aislamiento y purificación de la proteína endoquitinasa monomérica según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende:
- 55 a. pretratar, por un periodo comprendido entre 3 y 10 días y a temperaturas de entre 4 y 10°C el material vegetal de partida, que taxonómicamente pertenece a la familia *Annonaceae*,
- b. extraer las proteínas del material vegetal, mediante su triturado y homogeneización en un medio acuoso constituido por una disolución acuosa salina, tamponada en un pH comprendido entre 3,0 y 10,0 y a una temperatura comprendida entre 4 y 30°C,
- 60 c. ultrafiltración,
- d. separación de la proteína endoquitinasa monomérica según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 del resto de proteínas de la fracción soluble mediante técnicas de precipitación, y
- 65 e. purificación de la proteína endoquitinasa monomérica separada en el paso (d).

ES 2 352 924 A1

13. Procedimiento de aislamiento y purificación según la reivindicación 12, donde la recuperación de la proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 es de entre el 4,85 y el 7,85%.

5 14. Procedimiento de aislamiento y purificación según cualquiera de las reivindicaciones 12-13, donde el factor de purificación de la proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 es de entre 42 y 66.

15. Procedimiento de aislamiento y purificación según cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en la que extracción de las proteínas del material vegetal del paso (b) se realiza a un pH comprendido entre 4 y 6.

10 16. Procedimiento de aislamiento y purificación según cualquiera de las reivindicaciones 12-15, en la que extracción de las proteínas del material vegetal del paso (b) se realiza a una temperatura de entre 3 y 5°C.

15 17. Procedimiento de aislamiento y purificación según cualquiera de las reivindicaciones 12-16, en la que en el paso (b) se añaden agentes antioxidantes.

18. Procedimiento de aislamiento y purificación según cualquiera de las reivindicaciones 12-17, en la que en el paso (b) se añaden agentes quelantes de cationes.

20 19. Uso de una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o de la composición según la reivindicación 11, como biocatalizador en reacciones químicas.

20. Uso de una proteína o de una composición según la reivindicación anterior, donde la reacción transcurre a temperaturas de entre 0 y 50°C.

25 21. Uso de una proteína o de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 19-20, donde la reacción transcurre a temperaturas de entre 0 y 10°C.

30 22. Uso de una proteína o de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 19-20, donde la reacción transcurre a un pH de entre 2,5 y 7,5.

23. Uso de una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o de la composición según la reivindicación 11, para inhibir el crecimiento de un hongo.

35 24. Uso de una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o de la composición según la reivindicación 11, para la elaboración de un medicamento.

25. Uso de una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o de la composición según la reivindicación 11, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de micosis.

40

45

50

55

60

65

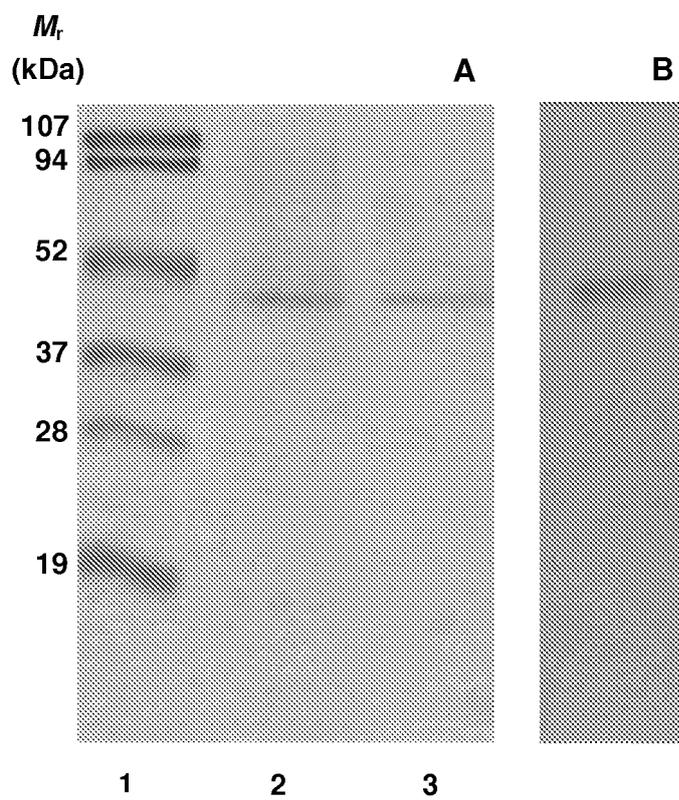


FIG. 1

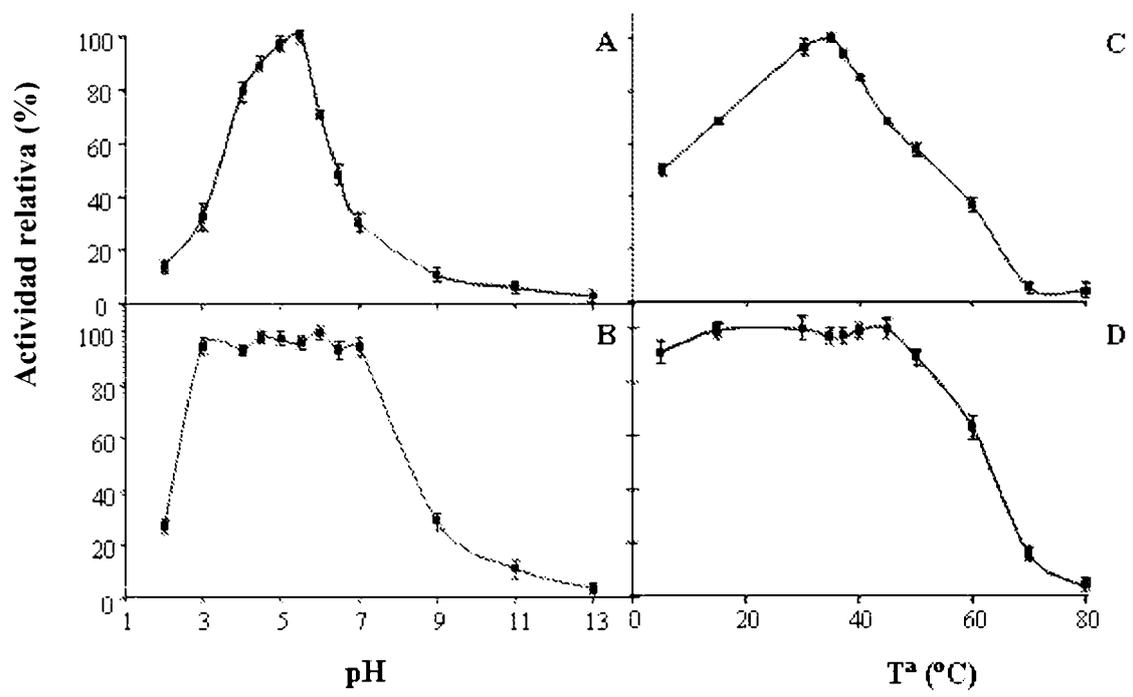


FIG. 2

ES 2 352 924 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

5 <120> Endoquitinasa ácida activa a bajas temperaturas, procedimiento de obtención y usos.

<130> ES1641.414

10 <160> 3

<170> PatentIn version 3.4

15 <210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> *Annona cherimola*

20

<400> 1

Leu Gly Glu Asp Ala Tyr Glu Gly Glu Leu Val Leu Lys
1 5 10

25

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

30

<213> *Annona cherimola*

<400> 2

35

Arg Gly Gly Ala Ala Phe Phe Ala Gln Ile Ser His Glu Thr Gly Phe
1 5 10 15

40

Gly Gly Ala Arg
20

<210> 3

<211> 249

<212> PRT

45

<213> *Cynodon dactylon*

<400> 3

50

Met Ala Tyr Ser Asp Ala Leu Leu Phe Ala Val Thr Ala Val Ala Ser
1 5 10 15

55

Leu Val Thr Ser Gly Gly Phe Phe Ala Glu Ala Arg Trp Tyr Gly Pro
20 25 30

Gly Gly Lys Cys Ser Ser Val Glu Ala Leu Ala Ala Arg Ala Phe Pro
35 40 45

60

Lys Phe Ala Gly Thr Gly Asp Leu Ala Thr Arg Lys Arg Glu Leu Ala
50 55 60

65

Ala Phe Phe Ala Gln Ile Ser His Glu Thr Thr Gly Gly Trp Ala Thr
65 70 75 80

ES 2 352 924 A1

	Ala	Pro	Asp	Gly	Pro	Tyr	Ser	Trp	Gly	Leu	Cys	Tyr	Lys	Glu	Glu	Ile
					85					90					95	
5	Ser	Pro	Ala	Ser	Asn	Tyr	Cys	Asp	Ala	Thr	Asp	Lys	Gln	Trp	Pro	Cys
			100						105					110		
10	Tyr	Pro	Gly	Lys	Ser	Tyr	His	Gly	Arg	Gly	Pro	Ile	Gln	Leu	Ser	Trp
			115					120					125			
15	Asn	Phe	Asn	Tyr	Gly	Pro	Ala	Gly	Gln	Ala	Leu	Gly	Phe	Asp	Gly	Leu
		130					135					140				
20	Arg	Asn	Pro	Glu	Ile	Val	Ala	Asn	Cys	Ser	Asp	Thr	Ala	Phe	Arg	Thr
	145					150					155					160
25	Ala	Leu	Trp	Phe	Trp	Met	Thr	Pro	Arg	Arg	Pro	Lys	Pro	Ser	Cys	His
					165					170					175	
30	Glu	Val	Met	Val	Gly	Glu	Tyr	Arg	Pro	Thr	Ala	Thr	Asp	Val	Ala	Gly
				180					185					190		
35	Asn	Arg	Met	Pro	Gly	Phe	Gly	Leu	Val	Thr	Asn	Ile	Val	Asn	Gly	Gly
			195					200					205			
40	Leu	Glu	Cys	Asn	Arg	Thr	Asp	Asp	Ala	Arg	Val	Asn	Asn	Arg	Ile	Gly
		210					215					220				
45	Phe	Tyr	Arg	Arg	Tyr	Cys	Gln	Ile	Phe	Asn	Val	Asp	Thr	Gly	Pro	Asn
	225					230					235					240
50	Leu	Asp	Cys	Ala	His	Gln	Gln	Pro	Tyr							
					245											



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930266

②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.06.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	GOÑI, O. et al. Regulation of defense and cryoprotective proteins by high levels of CO ₂ in <i>Annona</i> fruit stored at chilling temperature. <i>Journal of Plant Physiology</i> . 15.02.2009. Vol.166, páginas 246-258.	1-25
A	GOÑI, O. et al. Inducción de proteínas con funcionalidad crioprotectora por altas concentraciones de CO ₂ en chirimoya. Simposio Postcosecha. 2006. Orihuela. Publicado en Horticom News, 18.12.2006. [en línea], [recuperado el 09.02.2011]. Recuperado de Internet http://www.horticom.com/pd/search.php?author=&topic=&min=10&query=chirimoya&type=&category=&nt=&id=	1-25

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
09.02.2011

Examinador
I. Rueda Molins

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N9/24 (01.01.2006)

C07K14/415 (01.01.2006)

A23B4/22 (01.01.2006)

A23B7/155 (01.01.2006)

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

C12N, C07K, A23B

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.02.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-25	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-25	SI
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	GOÑI, O. et al. Regulation of defense and cryoprotective proteins by high levels of CO ₂ in Annona fruit stored at chilling temperature. Journal of Plant Physiology. Vol.166, páginas 246-258.	15.02.2009
D02	GOÑI, O. et al. Inducción de proteínas con funcionalidad crioprotectora por altas concentraciones de CO ₂ en chirimoya. Simposio Postcosecha. 2006. Orihuela. Publicado en Horticom News, [en línea], [recuperado el 09.02.2011]. Recuperado de Internet http://www.horticom.com/pd/search.php?author=&topic=&min=10&query=chirimoya&type=&category=&nt=&id=	18.12.2006

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

La solicitud de patente divulga una proteína endoquitinasa ácida, derivada de la pulpa de especies de la familia *Annonaceae*, que presenta alta actividad catalítica a bajas temperaturas y capacidad antifúngica *in vitro* frente a *Botrytis cinerea* caracterizada por una serie de propiedades fisicoquímicas. También se divulga, en la solicitud de patente, el método de aislamiento y purificación de dicha proteína.

El documento D01, que es el que refleja el estado de la técnica más cercano, muestra quitinasas procedentes de *Annona cherimola* Mill.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Artículos 6 y 8 LP11/1986)

El documento D01 divulga (en la página 255) diferentes quitinasas ácidas procedentes de *Annona cherimola* Mill. que presentan actividad antifúngica *in vitro* frente a *Botrytis cinerea*. Dicho documento también refleja (en las páginas 247 y 248) el método de aislamiento y purificación de estas proteínas. Este método coincide con el método reivindicado en la solicitud de patente, en cambio, las propiedades fisicoquímicas de las quitinasas purificadas difieren de las propiedades que caracterizan a la proteína reivindicada en la solicitud de patente. Por tanto, las reivindicaciones 1-25 presentan novedad y actividad inventiva, según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP11/1986.