



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 334 743**

② Número de solicitud: 200801931

⑤ Int. Cl.:

C12N 9/24 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

A23B 4/22 (2006.01)

A23B 7/155 (2006.01)

A01N 1/00 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **27.06.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **15.03.2010**

Fecha de la concesión: **07.02.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **17.02.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
17.02.2011

⑰ Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

⑱ Inventor/es: **Escribano Garaizabal, María Isabel;**
Merodio Moreno, Carmen y
Goñi Ramos, Óscar

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Proteína crioprotectora con actividad 1-3- β -glucanasa a bajas temperaturas, procedimiento para su obtención y sus aplicaciones.**

㉑ Resumen:

Proteína crioprotectora con actividad 1-3- β -glucanasa a bajas temperaturas, procedimiento para su obtención y sus aplicaciones.

La presente invención describe una nueva proteína 1-3- β -glucanasa biológicamente activa a bajas temperaturas, en un rango de pH ácido-neutro, estable a pH ácidos y altamente crioprotectora. Además, se incluye el método para la producción, el aislamiento y purificación de dicha proteína y su uso en la crioprotección de proteínas sensibles a la congelación-descongelación y en procesos de degradación o modificación de materiales que contienen β -glucanos en condiciones que requieran bajas temperaturas. Esta proteína glucanasa puede utilizarse en la crioprotección de proteínas sensibles a la congelación-descongelación para su almacenamiento y distribución en forma congelada o liofilizada, así como para la degradación o modificación de materiales que contienen glucanos en condiciones que requieran bajas temperaturas o inactivación a moderada-alta temperatura.

ES 2 334 743 B1

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

ES 2 334 743 B1

DESCRIPCIÓN

Proteína crioprotectora con actividad 1,3- β -glucanasa a bajas temperaturas, procedimiento para su obtención y sus aplicaciones.

5 Sector de la técnica

10 La presente invención se encuadra en el sector Biotecnológico, más concretamente en la crioprotección de proteínas sensibles a la congelación-descongelación y su aplicación en la industria alimentaria (proteínas estructurales o solubles), médica (crioconservación de células y tejidos vivos) y farmacéutica (proteínas con actividad biológica), así como en biocatálisis, bioremediación, biocontrol, fermentación y conservación de alimentos.

15 Estado de la técnica

15 Las 1,3- β -glucanasas incluyen el grupo de proteínas glucano 1,3- β -D-glucosidasas también llamadas laminarinasas. Estas proteínas catalizan la ruptura hidrolítica de enlaces 1,3- β -D-glucosídicos entre residuos de D-glucosa de los homopolímeros 1,3- β -glucanos. Las 1,3- β -glucanasas son proteínas abundantes y altamente reguladas presentes en especies de plantas con semillas e implicadas en diferentes procesos metabólicos como estrés, infección y procesos de desarrollo. Existen múltiples isoenzimas estructurales que difieren en su tamaño, punto isoeléctrico, estructura primaria, localización celular y patrón de regulación. Las 1,3- β -glucanasas de clase I son básicas y están localizadas en la vacuola. Las clases II y III son ácidas, con ausencia de la extensión C-terminal presente en la clase I y son secretadas al espacio intracelular (Leubner-Metzger G, Meins F. 1999. Functions and regulation of plant β -1,3-glucanases (PR-2), In: Pathogenesis-related Proteins in Plants. Datta, S.K., Muthukrishnan, S. (Eds.). Boca-Raton, Florida, CRC Press, 25 pp. 49-76.).

Las glucanasas con conocida actividad antifúngica son mayoritariamente endo-1,3-glucanasas de clase I capaces de hidrolizar enlaces β -1,3-glicosídicos. Estas proteínas muestran, además, un significativo efecto sinérgico junto a endoquitinasas o exoglucanasas sobre la degradación de la pared celular de hongos.

30 Los β -glucanos son la clase más abundante de polisacáridos, siendo componentes estructurales esenciales de la pared celular de plantas, principalmente en el endospermo de cereales, de la de hongos y bacterias, así como material de reserva citoplásmico, vacuolar y extracelular.

35 Un hecho importante referente al uso de β -glucanasas en productos alimenticios es que la mayor parte del material derivado de plantas contiene diferentes tipos de β -glucanos. Éstos pueden ser importantes en el mantenimiento de las propiedades organolépticas tales como textura, viscosidad y apariencia de los alimentos conteniendo paredes celulares vegetales.

40 Las proteínas 1,3- β -glucanasas son aplicadas en procesos de biorremediación para degradar o modificar materiales conteniendo 1,3- β -glucanos. Así mismo, las glucanasas junto con proteasas, quitinasas y celulasas son frecuentemente consideradas críticas en el biocontrol de hongos fitopatógenos (Fuglsang CC, Johansen C, Christgau S, Adler-Nissen J. 1995. Antimicrobial enzymes: applications and future potential in the food industry. Trends in Food Science & Technology, December, 6, 390-396). Las glucanasas ocupan una posición única en la agricultura biotecnológica por su acción antifúngica ya que su actividad lítica inhibe el desarrollo de hongos puesto que degrada componentes clave de la pared celular. Por todo lo anterior las glucanasas juegan una función vital en la industria relacionada con la agricultura, en el campo médico y en la composición de los detergentes. Asimismo, son fundamentales en la industria alimentaria para mejorar la textura y digestibilidad de los alimentos frescos y procesados, ejerciendo su efecto sobre hongos y bacterias que contaminan y deterioran alimentos conservados a bajas temperaturas y en la producción de alimentos fermentados, como cerveza y vino, así como en la elaboración de piensos de animales. En la industria de alimentos fermentados el uso de tales proteínas p.e. disminuye la viscosidad causada por los compuestos β -glucanos incrementando la obtención de extracto, acelerando la clarificación natural y disminuyendo el número de filtraciones, evitando precipitados gelatinosos en el producto final. Para su aplicación en estos procesos se requieren 1,3- β -glucanasas termoestables, pero también es necesario que retengan un alto porcentaje de su actividad en un rango de pH de 4 a 5, y que sean estables durante la incubación a estos pH ácidos característicos de la etapa de trituración. Por tanto se requieren proteínas biológicamente activas adecuadas para su uso en los procedimientos industriales, ampliando así su gama de aplicación.

60 Por tanto, la actividad y estabilidad de estas enzimas en diferentes condiciones de pH y temperatura son parámetros esenciales que determinan su viabilidad económica en procesos industriales. Así, una alta estabilidad está generalmente considerada como una ventaja económica porque reduce la cantidad de enzima mínima catalíticamente útil (turnover).

65 Con el fin de aumentar la estabilidad de las enzimas se han empleado múltiples y diferentes estrategias tales como: mutaciones, modificación química del centro activo, introducción de puentes disulfuro, inmovilizaciones, estabilización entrópica, cambio de condiciones del pH y el uso de diferentes sales. Por otro lado, el conocer los datos termodinámicos de las enzimas y su reacción de catálisis es esencial para predecir el ámbito de la reacción y la po-

sición de cualquier proceso en el cual la reacción se produce. Por lo que para conocer la estabilidad un paso previo es determinar su actividad residual y el valor de energía libre de estabilización a una temperatura definida, a fin de asegurar la viabilidad económica y técnica para su uso en procesos industriales.

5 Recientemente se están estudiando un nuevo grupo de enzimas llamadas “enzimas adaptadas al frío” (cold-adapted enzymes), las cuales muestran una alta eficiencia catalítica a bajas temperaturas, presentan un valor bajo de energía de activación (E_a) y se encuentran en general, si no siempre, asociadas a una alta termosensibilidad, lo que permiten el control de la reacción enzimática a través de su inactivación por calor. Esta propiedad ofrece la ventaja adicional de poder ser inactivadas fácilmente durante el proceso, a relativa moderada temperatura, y de esa manera ejercer un control sobre el mismo. Estas enzimas ofrecen un considerable potencial para su aplicación en diferentes procesos industriales relacionados con la formulación de detergentes, en industrias alimentarias, en la síntesis de productos químicos de alta pureza y en biorremediación (Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M, Chessa J, Claverie P, Collins T, D’Amico S, Dumont J, Garsoux G, Georgette D, Hoyoux A, Lonhienne T, Meuwis M, Feller G. 2000. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. Trends in Biotechnology, 18, 103-107).

15 A pesar de su potencial aplicación biotecnológica, pocas enzimas activas a baja temperatura están siendo utilizadas comercialmente, entre ellas una lipasa, una lisozima, una celulasa y varias proteasas (Cavicchioli R, Siddiqui KS, Andrews D, Sowers KR. 2002. Low-temperature extremophiles and their applications. Current Opinion in Biotechnology, 13, 253-261.). En relación a las patentes sobre estas enzimas hay tres documentos sobre proteasas: una proteasa alcalina para su uso como detergente procedente de un actinomiceto (WO 9,743,406; 1996), dos proteasas procedentes de bacterias CP-58 (WO 9,730,172; 1997) y CP-70 (U.S. 6,200,793; 1998), y una β -galactosidasa activa por debajo de 8°C procedente de una bacteria Antártica (Patente U.S. 6,727,084; 2001). Este tipo de proteínas son 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 y las estrategias utilizadas hasta ahora para al obtención de este tipo de enzimas han sido el clonaje y la expresión en *E. coli* creciendo a baja temperatura de genes que codifican enzimas adaptadas al frío procedente de bacterias Antárticas.

30 Además de sus enzimas, la utilización de microorganismos psicrófilos en los alimentos podría reemplazar a los conservantes químicos al disminuir o eliminar aquellos metabolitos requeridos por otros microorganismos. Al no ser aceptable la presencia de éstos en los alimentos, una alternativa a este problema sería la adición de enzimas activas a baja temperatura de origen natural, procedentes de un alimento como son los frutos, como es la proteína de la invención. Así mismo, la proteína de la invención puede ser utilizada como agente fitopatogénico, evitando enfermedades en las plantas y cultivos a baja temperatura ya que son enzimas digestivas de la pared celular y el producto de su hidrólisis induce resistencia.

35 El gran interés industrial que despierta este tipo de proteínas con alta actividad a bajas temperaturas, las llamadas enzimas adaptadas al frío, ha dado lugar a la búsqueda de nuevas fuentes naturales de proteínas más resistentes a la inactivación por bajas temperaturas.

40 Sin embargo, estas enzimas adaptadas al frío son un caso excepcional dentro de las proteínas, ya que en general todas las clases de proteínas, y especialmente las enzimas, pierden su actividad biológica fuera de un relativamente estrecho rango de temperatura.

45 Las enzimas son polipéptidos producidos por las células de los seres vivos y que catalizan una específica reacción bioquímica a la temperatura del cuerpo. Las proteínas no sólo son importantes para la función y regulación de los organismos vivos si no que también son útiles agentes farmacéuticos, por lo que es necesario su refrigeración en forma soluble para mantener su actividad biológica hasta el momento de ser administrada a los pacientes o para pruebas de diagnóstico clínico. Sin embargo, un problema que plantea la refrigeración de las proteínas es que se vuelven inestables y llegan a perder alguna de sus actividades. La opción de congelación y posterior descongelación para dotarlas de una más extensa vida útil normalmente disminuye la actividad biológica de las mismas.

50 Para solucionar el problema de pérdida de actividad biológica de las proteínas debido a su refrigeración o congelación los esfuerzos se han dirigido hacia la búsqueda de vías de protección después de ser congeladas o liofilizadas. En la actualidad se utilizan varios tipos de sustancias crioprotectoras como: dimetilsulfóxido, glicerol, soluciones salino/glucosadas (glucosa, manitol, sorbitol), hidroxietilalmidón y proteínas (como seroalbúmina). En la patente U.S. 4,806,343 se describe un método para proteger la actividad biológica de proteínas después de la congelación exponiéndola previamente a carbohidratos y cationes no metálicos. Por otro lado se ha patentado una sustancia crioprotectora procedente de un microorganismo (JP 2001139599; 2001). Las proteínas crioprotectoras, de forma individual o mezcladas con otros crioprotectores, son empleadas en la crioconservación de material biológico vivo a bajas temperaturas. En la patente WO 2007/033488 se describe el uso de un extracto vegetal conteniendo proteínas para la crioconservación de moléculas, orgánulos, células, tejidos y órganos. Además, las proteínas con actividad crioprotectora pueden ser de gran utilidad al proteger a otras proteínas sensibles de la desnaturalización en el proceso de congelación-descongelación dentro de los alimentos. En este campo, el principal inconveniente derivado del uso de nuevas proteínas crioprotectoras en alimentos congelados 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.

ES 2 334 743 B1

Son escasas las fuentes conocidas de proteínas con actividad crioprotectora. En vegetales, son pocas las clases de proteínas que presentan actividad crioprotectora, siendo principalmente proteínas inducidas por frío, sin actividad biológica, mayoritariamente dehidrinas como P-80 y DHN5 en hojas de cebada, PCA60 en tejidos de la corteza de melocotón, CuCOR19 en hojas de cítricos, etc. y alguna proteína de la familia de proteínas PRs como una taumatina (PR5) en hojas de cacahuete (Bravo LA, Gallardo J, Navarrete A, Olave N, Martínez J, Alberdi M, Close TJ, Corcuera LJ. 2003. Cryoprotective activity of a cold-induced dehydrin purified from barley. *Physiolia Plantarum*, 118, 262-269), siendo todas ellas del orden de 4 a 30 veces más activas como proteínas crioprotectoras que la seroalbúmina bovina (BSA) utilizada como proteína crioprotectora control. También se han descrito dos 1,3- β -glucanasas (PR2) básicas de clase I, una recombinante procedente de uvas con una actividad crioprotectora similar al BSA (Romero I, Fernández-Caballero C, Goñi O, Escribano MI, Merodio C, Sánchez-Ballesta MT. 2008. Functionality of class I beta-1,3-glucanase from skin of table grapes berries. *Plant Science*, 174, 641-648) y la otra procedente de cultivos de hojas de tabaco crioactiva en ensayos *in vitro* con tilacoides (Hincha DK, Meins F, Schmitt JM 1997. β -1,3-Glucanase is cryoprotective *in vitro* and is accumulated in leaves during cold acclimation. *Plant Physiology*, 114:1077-1083).

Consecuentemente, hay una creciente demanda de proteínas crioprotectoras efectivas que sean, o que pueda considerarse que son, naturales. Si tales materiales derivan de fuentes que históricamente han sido consumidas por el ser humano, hay credibilidad razonable de que, muy probablemente, son seguros. Esto puede reducir la necesidad de ensayos extensos y caros de toxicidad.

Actualmente es muy difícil proporcionar a la Industria alimentaria, médica y farmacéutica nuevas fuentes naturales de proteínas que actúen a muy baja concentración como crioprotector para, por ejemplo, el almacenamiento y distribución de proteínas con actividad biológica en forma congelada o liofilizada y que una vez descongelada o rehidratada la proteína pueda ser administrada directamente a un animal o paciente sin remover el crioprotector. Además, en biocatálisis, bioremediación, biocontrol y conservación de alimentos sanos en condiciones que requieran bajas temperaturas son requeridas proteínas que desarrollen una alta actividad hidrolítica a bajas temperaturas y con control de su inactivación a moderada-alta temperatura.

Por ello la presente invención pretende solucionar estos problemas como son proporcionar nuevas fuentes naturales de proteínas biológicamente activas a bajas temperaturas, estables en un rango de pH ácido-neutro y crioprotectoras. La solución proporcionada por esta invención se concreta en la identificación de una nueva 1,3- β -glucanasa ácida, de baja masa molecular, con una alta actividad hidrolítica a bajas temperaturas, funcional en un rango de pH ácido-neutro y que actúa como crioprotector a muy baja concentración, de origen natural, en un método para producir dicha proteína, particularmente inducida en la pulpa de chirimoya por un corto tratamiento gaseoso a bajas temperaturas, junto con el procedimiento para el aislamiento y purificación de dicha proteína y al empleo de dicha proteína crioprotectora con actividad 1,3- β -glucanasa activa a bajas temperaturas y preparaciones proteicas que contienen dicha proteína en la crioprotección de proteínas sensibles a la congelación-descongelación para su almacenamiento y distribución en forma congelada o liofilizada, así como para la degradación o modificación de materiales que contienen 1,3- β -glucanos en condiciones que requieran bajas temperaturas o inactivación a moderada-alta temperatura.

40 Descripción de la invención

Descripción breve

Un aspecto de la invención lo constituye una proteína 1,3- β -glucanasa con actividad crioprotectora, en adelante proteína de la invención, aislada de la pulpa de chirimoya (*Annona cherimola* Mill) constituida por una proteína monomérica con una masa molecular de 19.200 Da, y un punto isoelectrónico (pI) mayor o igual a 5,25, siendo una glicoproteína endo-1,3- β -glucanasa con una constante catalítica (k_{cat}) mayor de 2, preferentemente mayor de 3,1 s⁻¹, una constante de afinidad (K_m) mayor de 70, preferentemente de 80 μ M, una eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) mayor de 35 preferentemente mayor 38,3 s⁻¹ mM⁻¹, catalíticamente activa en un rango de pH ácido-neutro, de 3,0 a 7,0, y estable en un rango de pH ácido, de 2,0 a 6,0, termosensible a temperaturas superiores a 50°C y con una energía de activación (E_a) de 7,0 kJ·mol⁻¹ además de ser hidrolíticamente activa a bajas temperaturas con un valor para la k_{cat} de 2,5 s⁻¹ a 5°C y presentando un valor C_{50} de actividad crioprotectora de 8,7 μ g·ml⁻¹.

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 las siguientes etapas:

a) pretratamiento gaseoso del material vegetal de partida, preferentemente tejidos de frutos tropicales, subtropicales y/o subproductos agrícolas, como por ejemplo, sin que ello suponga un límite del alcance de la invención la pulpa de chirimoyas (*Annona cherimola* Mill.), es conservado en una atmósfera enriquecida con 10% a 30% de CO₂, entre 60 y 75 horas a bajas temperaturas, unos 5 a 7°C, siendo posteriormente mantenido a condiciones atmosféricas durante un periodo de 3 a 10 días,

b) extracción de las proteínas (Ejemplo 1) del material vegetal, se tritura y homogeneiza en un medio acuoso constituido por una disolución acuosa salina, opcionalmente tamponada en un pH comprendido entre 3,0 y 10,0, preferentemente pH 5,0, y a una temperatura entre 4 y 30°C, preferentemente a una temperatura de 4°C, y opcionalmente adicionando secuestradores de fenoles, por ejemplo polivinilpirrolidona soluble al medio acuoso. La fracción soluble resultante es fraccionada y concentrada mediante ultrafiltración,

ES 2 334 743 B1

c) etapa de separación de la proteína de la invención del resto de proteínas de la fracción soluble mediante el fraccionamiento con sulfato amónico por saturación progresiva:

- 5 - El fraccionamiento comienza con una primera precipitación de proteínas a baja concentración de sulfato amónico entre 10% y 30%, preferentemente con 20%, obteniéndose un sobrenadante enriquecido en actividad glucanasa,
- saturándose progresivamente con sulfato amónico hasta llegar a una concentración del 80% y 90%, preferentemente del 85%,
- 10 - lavado y ultrafiltrado del precipitado, por ejemplo, por una membrana de 10.000 MW,

y

15 d) purificación mediante cualquier técnica convencional de purificación de proteínas.

Así, una realización particular de la invención es el procedimiento de la invención en el que la extracción de b) se realiza mediante la adición de antioxidantes y agentes quelantes de cationes, preferentemente, a título ilustrativo 20 se realice el alcance de la invención, ácido ascórbico y ácido etilendiamino-tetraacético sal disódica 2-hidrato (EDTA).

Una realización particular de la invención es el procedimiento de la invención en el que la purificación de d) se realiza mediante técnicas cromatográficas (Ejemplo 1), más concretamente cromatografía de intercambio aniónico, se realiza a un pH comprendido entre 7,0 y 9,0, preferentemente a pH 8,0 debido a la naturaleza aniónica de la proteína de la invención, cromatografía realizada en un gradiente de pH de 6,0 a 4,0 y un segundo cromatograma realizado en un gradiente de pH de 6,0 a 5,0.

El procedimiento de aislamiento de la proteína de la invención descrito manifiesta un alto rendimiento reflejado 30 en una recuperación del 1,5% y un factor de purificación de 18, de manera que partiendo de una pequeña cantidad de material vegetal (250 gramos) se obtienen alrededor de 0,2 mg de una proteína pura a homogeneidad y con elevada actividad específica. Si se extrapolan estos datos a escala industrial supone la obtención de una gran cantidad de 1-3- β -glucanasa 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.

Por último, la proteína de la invención puede ser utilizada en cualquier aplicación propia de las proteínas con actividad 1-3- β -glucanasa.

Debido a sus características cinéticas (alto valor para la constante catalítica a 5°C) y termodinámicas (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 y biocontrol y 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.

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 biorreactores de membranas, acoplados por ejemplo a sistemas de filtración, intercambio iónico o pH.

Otra aplicación de la proteína de la invención es su empleo en la crioprotección de proteínas sensibles a la congelación-descongelación y su aplicación en la industria alimentaria (proteínas estructurales o solubles), médica (crioconservación de células y tejidos vivos) y farmacéutica (proteínas con actividad biológica).

Por todo lo anterior la proteína de la invención puede ser utilizada sola o mezclada con otros crioprotectores, en diferentes matrices para la conservación de alimentos u otras proteínas con actividad biológica de uso terapéutico, siendo factible de ser ingerida por los pacientes al ser de origen natural y activa a muy bajas concentraciones. Además, su aislamiento es compatible con su inocuidad como aditivo alimentario.

Más concretamente, otro aspecto de la invención lo constituye el uso de la proteína de la invención en la elaboración de una composición biotecnológica o farmacéutica útil para la criopreservación de principios activos.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una proteína de origen natural biológicamente activa a bajas temperaturas, estables en un amplio rango de pH y altamente crioprotectora.

ES 2 334 743 B1

La presente invención se basa en que los inventores han identificado una proteína 1-3- β -glucanasa con actividad crioprotectora de pulpa de chirimoya (*Annona cherimola* Mill), que mediante técnicas electroforéticas, cromatográficas y espectrométricas han sido estimadas sus propiedades tanto cinéticas como termodinámicas, de tal manera que se trata de una proteína monomérica con una masa molecular de 19.200 Da, y un punto isoelectrico (pI) mayor o igual a 5,25, aproximadamente.

Además la proteína de la invención es una glicoproteína determinada por tinción mediante el reactivo de Schiff y la naturaleza glucanasa de la proteína de la invención ha sido determinada por inmunodetección con anticuerpos policlonales frente a proteínas PR-2 de tabaco viéndose que está serológicamente ligada a 1,3- β -glucanasas del tabaco y posteriormente ha sido identificada mediante el análisis del mapa de la huella peptídica utilizando para ello espectrometría de masas.

La proteína de la invención presenta una constante de afinidad (K_m) de 80 μ M y un valor estimado para la constante catalítica (k_{cat}) a una temperatura de 5°C es 2,5 $s^{-1} mM^{-1}$, del orden del 80% del valor estimado en el ensayo estándar *in vitro* a 37°C, siendo por ello una enzima hidrolíticamente activa a bajas temperaturas. Adicionalmente la proteína de la invención muestra una alta eficiencia catalítica (38,7 $s^{-1} mM^{-1}$) y tiene como ventajas adicionales que es catalíticamente activa en un margen de pH ácido-neutro de 3,0 a 7,0, altamente estable a pH ácidos, y termosensible a temperaturas moderadamente altas (superiores a 50°C) presentando un valor bajo de energía de activación (E_a) de aproximadamente 7,0 $kJ \cdot mol^{-1}$, aunque las condiciones óptimas de la proteína de la invención son un pH de 5,0 y una temperatura de 40°C.

Otra característica de la proteína de la invención es la actividad crioprotectora que presenta, ya que protege a otras proteínas sensibles a la congelación durante dos ciclos de congelación-descongelación. Su actividad crioprotectora es muy superior a la de azúcares osmoprotectores como la sacarosa y a otras proteínas crioprotectoras como la seroalbúmina (BSA), ya que es activa a concentraciones más bajas. La concentración de la proteína de la invención necesaria para proteger un 50% de la actividad de la enzima lactato deshidrogenada (LDH) en el ciclo congelación-descongelación (valor C_{50}) es 9 veces menor que la concentración requerida de BSA, 8,7 $\mu g \cdot ml^{-1}$ frente a 80,3 $\mu g \cdot ml^{-1}$.

Así, un aspecto de la invención se refiere a una proteína 1,3- β -glucanasa con actividad crioprotectora, en adelante proteína de la invención, aislada de la pulpa de chirimoya (*Annona cherimola* Mill) constituida por una proteína monomérica con una masa molecular de 19.200 Da, y un punto isoelectrico (pI) mayor o igual a 5,25, siendo una glicoproteína endo-1,3- β -glucanasa con una constante catalítica (k_{cat}) mayor de 2, preferentemente mayor de 3,1 s^{-1} , una constante de afinidad (K_m) mayor de 70, preferentemente de 80 μ M, una eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) mayor de 35 preferentemente mayor 38,3 $s^{-1} mM^{-1}$, catalíticamente activa en un rango de pH ácido-neutro, de 3,0 a 7,0, y estable a pH ácidos, de 2,0 a 6,0, termosensible a temperaturas superiores a 50°C y con una energía de activación (E_a) de 7,0 $kJ \cdot mol^{-1}$, además de ser hidrolíticamente activa a bajas temperaturas con un valor para la k_{cat} de 2,5 s^{-1} a 5°C y presentando un valor C_{50} de actividad crioprotectora de 8,7 $\mu g \cdot ml^{-1}$.

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 las siguientes etapas:

a) pretratamiento gaseoso del material vegetal de partida, preferentemente tejidos de frutos tropicales, subtropicales y/o subproductos de la manipulación y comercialización de frutos, como por ejemplo, sin que ello suponga un límite del alcance de la invención la pulpa de chirimoyas (*Annona cherimola* Mill.), es conservado en una atmósfera enriquecida con 10% a 30% de CO_2 , entre 60 y 75 horas a bajas temperaturas, unos 5 a 7°C, siendo posteriormente mantenido a condiciones atmosféricas durante un periodo de 3 a 10 días,

b) extracción de las proteínas (Ejemplo 1) del material vegetal, se tritura y homogeneiza en un medio acuoso constituido por una disolución acuosa salina, opcionalmente tamponada en un pH comprendido entre 3,0 y 10,0 preferentemente pH 5,0, y a una temperatura entre 4 y 30°C, preferentemente a una temperatura de 4°C, y opcionalmente adicionando sequestradores de fenoles, por ejemplo polivinilpirrolidona soluble, al medio acuoso,

c) etapa de separación de la proteína de la invención del resto de proteínas de la fracción soluble mediante el fraccionamiento con sulfato amónico por saturación progresiva:

- El fraccionamiento comienza con una primera precipitación de proteínas a baja concentración de sulfato amónico entre 10% y 30%, preferentemente con 20%, obteniéndose un sobrenadante enriquecido en actividad glucanasa,
- 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,

y

d) purificación mediante cualquier técnica convencional de purificación de proteínas.

ES 2 334 743 B1

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 1-3- β -glucanasa, se ultrafiltra por medio de discos de membrana 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 protéico es fraccionado y concentrado mediante ultrafiltración empleando discos de membrana de 10.000 MW obteniendo finalmente un rendimiento o factor de purificación de alrededor de 3.

Durante la etapa de extracción b) del procedimiento de la invención se observaron inicialmente por parte de los inventores dificultades para obtener altos rendimientos de la proteína 1-3- β -glucanasa de la invención, por lo que se añadió antioxidantes y agentes quelantes de cationes al medio acuoso que facilitaron una extracción más eficaz de la proteína de la invención debido a que solubilizan y despolimerizan las pectinas de la matriz vegetal. Así, una realización particular de la invención es el procedimiento de la invención en el que la extracción de b) se realiza mediante la adición de antioxidantes, preferentemente, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, ácido ascórbico y agentes quelantes de cationes, por ejemplo, ácido etilendiamino-tetraacético sal disódica 2-hidrato (EDTA).

Tras la etapa de extracción (b) se lleva a cabo la etapa de separación (c) de la proteína de la invención del resto de proteínas de la fracción soluble ya que en las plantas en general, y en el caso de la pulpa de chirimoya en particular, existen otras muchas proteínas que interfieren en la purificación de la proteína de la invención. Para ello, el extracto protéico obtenido en la etapa (b) se somete a fraccionamiento con sulfato amónico por saturación puesto que las proteínas con actividad 1-3- β -glucanasa son estables a bajas concentraciones de dicha sal y precipitan. Por lo tanto se va aumentando las concentraciones de saturación con sulfato amónico para su separación del resto de las proteínas presentes. El fraccionamiento comienza con una primera precipitación de proteínas a baja concentración de sulfato amónico entre 10% y 30%, preferentemente con 20%, con lo que al precipitar otras proteínas no glucanasas obtenemos un sobrenadante enriquecido en actividad glucanasa. Esta fracción de proteínas soluble, que contiene actividad 1-3- β -glucanasa, se lleva a saturación con sulfato amónico entre 80% y 90%, preferentemente a 85%, obteniéndose un precipitado que, lavado y ultrafiltrado por la membrana de 10.000 MW, tiene actividad 1-3- β -glucanasa y comprende una mezcla de isoenzimas con actividad 1-3- β -glucanasa que contiene más del 64% de la actividad total y el 80% de la actividad específica contenida en la etapa anterior.

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 actividad glucanasa-crioprotectora 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 diálisis, técnicas de ultrafiltración, cromatográficas, cromatografía de intercambio iónico (DEAE-Celulosa, DEAE-Sepharosa, Mono S; Mono Q; Source S; Source Q; CM-Sepharose) y de cromatoenfoco (Mono P).

Una realización particular de la invención es el procedimiento de la invención en el que la purificación de d) se realiza mediante técnicas cromatográficas (Ejemplo 1), más concretamente mediante cromatografía de intercambio aniónico realizado a un pH entre 7,0 y 9,0, preferentemente a pH 8,0 debido a la naturaleza aniónica de la proteína de la invención, cromatoenfoco realizado en un gradiente de pH de 6,0 a 4,0 y un segundo cromatoenfoco realizado en un gradiente de pH de 6,0 a 5,0.

El procedimiento de aislamiento de la proteína de la invención descrito manifiesta un alto rendimiento reflejado en una recuperación del 1,5% y un factor de purificación de 18. Concretamente se pueden obtener valores de alrededor de 1,2-1,5 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 1-3- β -glucanasa 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.

Por último, la proteína de la invención puede ser utilizada en cualquier aplicación propia de las proteínas con actividad 1,3- β -glucanasa.

Debido a sus características cinéticas (alto valor para la constante catalítica a 5°C) y termodinámicas (bajos valores de energía de activación) la proteína 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 y biocontrol y 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. Debido a que es catalíticamente activa en un rango de pH ácido-neutro y altamente estable a pH ácidos, siendo rápidamente desnaturalizada a pH básicos, es factible de ser utilizada en industrias fermentativas.

La proteína de la invención puede utilizarse, de manera soluble o inmovilizada, ya que debido a su carácter glicoprotéico facilita su anclaje, por ejemplo puede estar inmovilizada mediante distintos procedimientos como el enlace a soportes sólidos (magnetita o la concavalina-A), 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.

ES 2 334 743 B1

Otra aplicación de la proteína de la invención es su empleo en la crioprotección de proteínas sensibles a la congelación-descongelación y su aplicación en la industria alimentaria (proteínas estructurales o solubles), médica (crioconservación de células y tejidos vivos) y farmacéutica (proteínas con actividad biológica).

5 Por todo lo anterior la proteína de la invención puede ser utilizada sola o mezclada con otros crioprotectores, en diferentes matrices para la conservación de alimentos u otras proteínas con actividad biológica de uso terapéutico (por ejemplo, insulina e IGF-I) o biotecnológico (por ejemplo enzimas de restricción), siendo factible de ser ingerida por los pacientes al ser de origen natural y activa a muy bajas concentraciones. Además, su aislamiento es compatible con su inocuidad como aditivo alimentario.

10

Así, otro aspecto de la invención lo constituye el uso de la proteína de la invención en la elaboración de una composición biotecnológica o farmacéutica útil para la criopreservación de principios activos.

15 **Descripción de las figuras**

Figura 1

20 *Análisis electroforético e inmunológico de la proteína purificada de 19.200 Da con actividad 1,3-β-glucanasa-crioprotectora*

(A) Análisis electroforético (SDS-PAGE). Las líneas 2 y 3 fueron cargadas con 2 μg 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.

25

(B) Inmunoensayo de un gel similar al mostrado en A con la proteína de la invención purificada, en su forma no reducida, e incubado con anticuerpos policlonales frente a proteínas PR2 de tabaco.

(C) Tinción con reactivo de Schiff (PAS) de un gel similar al mostrado en A con la proteína de la invención purificada en su forma no reducida.

30

Figura 2

35 *Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la proteína 1,3-β-glucanasa-crioprotectora*

El resultado obtenido fue expresado como porcentaje de actividad relativa respecto al máximo de actividad obtenida.

40 A- Relación entre el pH de la reacción y la actividad relativa de la proteína de la invención medida bajo condiciones de ensayo estándar (37°C, 10 min.) usando tampones 0.1 M (pH 2.0 a 13.0).

B- Estabilidad de la proteína 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 h. La actividad residual de la enzima tratada se ensayó bajo condiciones estándar.

45

C- Relación entre la temperatura (5°C a 80°C) de la reacción y la actividad relativa de la proteína de la invención medida tras la incubación en tampón acetato sódico 0.1 M, pH 5.0.

50 D- Estabilidad de la proteína 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 h. La actividad residual de la enzima tratada se ensayó bajo condiciones estándar.

Las barras de error representan el ES (n = 3).

55

Figura 3

60 *Actividad crioprotectora de la proteína 1,3-β-glucanasa purificada*

La solución de LDH fue congelada en presencia de diferentes concentraciones (C) de la proteína de la invención (a), seroalbúmina bovina (b) o sacarosa (c). Las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente y medida la actividad LDH. La actividad relativa representa la cantidad de actividad LDH remanente después de dos ciclos de congelación-descongelación expresada en porcentaje con respecto a la actividad de LDH inicial. Las barras de error representan el ES (n=3).

65

Ejemplos de realización de la invención

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

5 Ejemplo 1

Obtención la proteína con actividad 1,3-β-glucanasa-crioprotectora aislada de chirimoya

10 1.1 Etapa de Extracción y Ultrafiltración

Se pesaron 150 g de 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 100 mM pH 5,0 conteniendo ácido ascórbico 20 mM, 1,5% de polivinilpirrolidona soluble y ácido etilendiaminotetra-acético sal disódica 2-hidrato (EDTA) 10 mM.

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.

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 pectídicas 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). Este proceso permite obtener un rendimiento o factor de purificación de cerca de 3 para esta proteína.

1.2 Fraccionamiento

El filtrado protéico obtenido en la etapa anterior se llevó 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 1,3-β-glucanasa, 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 1,3-β-glucanasa. 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 1,3-β-glucanasa que contiene el 64% de la actividad total y el 80% de la actividad específica contenida en la etapa anterior.

1.3 Aislamiento y Purificación a homogeneidad de la proteína

A partir del extracto obtenido en la etapa anterior se aisló una proteína con actividad 1,3-β-glucanasa, con un elevado grado de pureza, mediante un protocolo que comprende las siguientes etapas:

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 min 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 1,3-β-glucanasa utilizando como sustrato laminarina (Sigma, EE.UU.). Las fracciones que presentaron actividad hidrolítica fueron reunidas, concentradas y disueltas en tampón BisTris-HCl 20 mM, pH 6,3 conteniendo glicerol al 10% mediante ultrafiltración (membrana YM10), denominándose fracción ácida.

1.3.2 Cromatoenfoco pH 6-4

En esta etapa se utilizó una columna Mono-P HR 5/20 (Amersham Biosciences) acoplada a un sistema de FPLC (Amersham Biosciences) y fue equilibrada con un tampón BisTris-HCL 25 mM, pH 6,3, conteniendo glicerol al 10%. La separación de proteínas se llevó a cabo mediante un gradiente de pH de 6 a 4 durante de 49 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, recogiendo fracciones de 1 ml y valorando su pH con un pHmetro MicropH-2000 (Crison). Se midió la absorbancia del eluído a 280 nm y se examinó la presencia de isoformas 1,3-β-glucanasa ácidas mediante la determinación de su actividad enzimática utilizando laminarina (Sigma) como sustrato y por técnicas electroforéticas e inmunológicas.

ES 2 334 743 B1

1.3.3 Cromatografía de intercambio iónico a pH 6-5

Las fracciones activas fueron reunidas y concentradas y purificadas posteriormente utilizando una columna Mono P HR 5/20 (Amersham Biosciences) acoplada a un sistema de FPLC (Amersham Biosciences), equilibrada con tampón BisTris-HCl 25 mM pH 6,3, mediante un gradiente isocrático de tampón Polybuffer 74-HCl (Amersham Biosciences, Suecia) 10% (v/v), pH 5.0 de 26 min 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 1,3-β-glucanasa utilizando como sustrato laminarina (Sigma, EE.UU.). El análisis electroforético e inmunológico reveló la fracción que contenía aislada la proteína de la invención la cual se desaló y se liofilizó. Con el procedimiento de purificación descrito se obtuvo 0,18 mg de proteína de la invención con un factor de purificación de 17,8 y una recuperación del 1,4%.

Ejemplo 2

Caracterización de la proteína con actividad 1,3-β-glucanasa-crioprotectora aislada de chirimoya

2.1. Determinación de la Pureza, masa molecular y punto isoeléctrico de la proteína

La determinación de la pureza de la proteína se llevó a cabo mediante técnicas de electroforesis sobre geles de poli-acrilamida en condiciones disociantes 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). Los resultados muestran la naturaleza monomérica de la proteína y revelan que presenta una masa molecular de aproximadamente 19.200 Da (SDS-PAGE). La masa molecular de la proteína purificada se determinó por electroforesis desnaturante con un porcentaje de acrilamida de 13,5%, utilizando un patrón preteñido de proteínas de baja masa molecular: lisozima de huevo (18800 Da), inhibidor de tripsina de soja (28200 Da), anhidrasa carbónica bovina (37200 Da), ovoalbúmina de huevo (52300 Da), seroalbúmina bovina (93600 Da) y fosforilasa B de músculo de conejo (106900 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 (R_f).

Los ensayos de inmunodetección con anticuerpos policlonales frente a proteínas PR-2 de tabaco establecen que la proteína de la invención purificada de chirimoya está serológicamente ligada con 1,3-β-glucanasas de tabaco (véase Figura 1 B). La determinación de la presencia de glicoproteínas, basado en el protocolo de tinción PAS (ácido periódico-reactivo Schiff) usando concentraciones conocidas de la enzima peroxidasa de rábano (Sigma, EE.UU) como control positivo, reveló que la proteína de la invención es una glicoproteína (véase Figura 1C).

El análisis por cromatografía de intercambio iónico a pH 6-5 según se describe en el apartado 1.3.3. reveló que la proteína de la invención es una proteína ácida con un pI < 6, concretamente de 5,25.

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), utilizando para ello espectrometría de masas, usando un MALDI-TOF/TOF 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems). Una vez obtenido el espectro de masas de los péptidos tripticos de la enzima 1,3-β-glucanasa ácida purificada, se compararon los datos de masa/carga de los péptidos resultantes con los descritos en las bases de datos. Esta identificación de las proteínas mediante la búsqueda de secuencias homólogas con el algoritmo MOWSE dio lugar a una serie de parámetros que reflejan la fiabilidad de la identificación como: el número de masas de péptidos obtenidos con MALDI-TOF y su correspondencia con las masas de los péptidos resultantes de digestiones teóricas de proteínas en las bases de datos (péptidos identificados), la probabilidad asociada a cada búsqueda (score) de homología con el algoritmo MOWSE en la base de datos NCBI (P ≤ 0,05) y el porcentaje de secuencia de la proteína candidata que cubren las masas de los péptidos que se han podido identificar (cobertura de secuencia). De acuerdo al valor de estos parámetros, entre ellos 9 péptidos identificados, una probabilidad de homología de 82 y un porcentaje de cobertura de secuencia del 36%, la proteína purificada de chirimoya, con actividad 1,3-β-glucanasa-crioprotectora y reconocida por anticuerpos para esta enzima fue identificada con una endo-1,3-β-glucanasa básica (pI 9,68 y M_r 38.000 Da) de clase III procedente de *Solanum lycopersicum* L. (número de acceso base de datos NCBI para la proteína homóloga gi:498926).

2.3. Determinación de la actividad enzimática

La actividad de la proteína 1,3-β-glucanasa-crioprotectora aislada de chirimoya, proporcionada por esta invención, se determinó por el siguiente método, modificado a partir del desarrollado por Dygert *et al.* (Dygert S, Li LH, Florida D, Thoma JA. 1965. Determination of reducing sugar with improved precision. Analytical Biochemistry, 13, 367-74) de determinación de azúcares reductores, utilizando como sustrato laminarina, un β-poliglucano con enlaces β-(1-3) y ramificaciones β-(1-6) procedente de *Laminarina digitata* (Sigma, EE.UU.).

El sustrato se preparó en tampón acetato sódico 100 mM, pH 5,0 a 0,167% (p/v), almacenando la mezcla a 4°C. La mezcla de reacción, en tampón acetato sódico 100 mM, pH 5,0, contenía 300 μl de sustrato y 50 μl de muestra, llevándola a un volumen total de 500 μl. Las muestras se incubaron a 37°C en agitación durante 6 h, deteniendo la reacción con la adición de 40 μl de NaOH 2 N y mantenidas en hielo durante 10 min. Los azúcares reductores

ES 2 334 743 B1

hidrolizados desde el sustrato fueron determinados al añadir a la mezcla 5 ml de reactivo A (4,0 g Na₂CO₃, 1,6 g glicina y 45 mg CuSO₄·5H₂O disueltos en 100 ml de agua ultrapura) y 5 ml de reactivo B (0,12% [p/v] neocuproino-HCl [Sigma, EE.UU.]). La solución resultante fue hervida al baño maría durante 10 minutos, registrándose la absorbancia a 450 nm de la mezcla tras su dilución con agua ultrapura hasta un volumen total de 25 ml. La cantidad de azúcares reductores liberados se estimó a partir de una curva de calibrado realizada con cantidades crecientes de glucosa (Sigma, EE.UU.). Una unidad (U) de actividad 1,3-β-glucanasa fue establecida como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de glucosa 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 enzima con actividad 1,3-β-glucanasa-crioprotectora. La proteína de la invención purificada presenta una actividad total de 3,5 U y una actividad específica de 19,0 U·mg⁻¹.

Los datos cinéticos (K_m, k_{cat} y k_{cat}/K_m) obtenidos frente a laminarina mostraron que la proteína purificada de la invención presenta un valor para la constante de afinidad (K_m) de 80 μM y para la constante catalítica (k_{cat}) de 3,1 s⁻¹, con un valor de eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) de 38,3 s⁻¹ mM⁻¹ en ensayos estándar *in vitro*. Además, el valor estimado de la k_{cat} para la proteína de la invención a una temperatura de 5°C es 2,5 s⁻¹ mM⁻¹ del orden del 80% del valor estimado en el ensayo estándar *in vitro* a 37°C, siendo por ello una enzima hidrolíticamente activa a bajas temperaturas.

2.4. Mecanismo de hidrólisis

Una forma de distinguir entre las diferentes clases de 1,3-β-glucanasa es determinar su mecanismo de hidrólisis comparando sus actividades frente a diferentes sustratos como laminarina oxidada con periodato potásico, sustrato de glucanasas y *p*-nitrofenil-β-D-glucósido, sólo hidrolizado por exo-1,3-β-glucanasas. Además se utilizó δ-gluconolactona, un eficaz inhibidor de ciertas exo-1,3-β-glucanasas y β-glucosidasas.

El ensayo con laminarina oxidada con periodato potásico se realizó en las mismas condiciones que las reflejadas en el apartado 2.3., utilizando 50 ng de la enzima purificada. El ensayo con *p*-nitrofenil-β-D-glucósido (Sigma, EE.UU.) se efectuó incubando a 37°C durante 6 h una mezcla de reacción que contiene 0,25% (p/v) del sustrato y 50 ng de la enzima en un volumen total de 0,5 ml de tampón acetato sódico 100 mM, pH 5,0. La reacción se paró con la adición de 200 μl de Na₂CO₃ 0,2 M, midiendo la absorbancia a 410 nm frente a preparó una curva de calibrado con *p*-nitrofenol (Sigma, EE.UU.) disuelto en un blanco externo con el fin de cuantificar el *p*-nitrofenol liberado al medio. Se tampón glicina-NaOH 100 mM, pH 11,5 para 0, 20, 40, 60, 80 y 100 μM. Para el ensayo con β-gluconolactona (Sigma) tanto las condiciones de reacción como el sustrato utilizado fueron las establecidas en el ensayo estándar, añadiendo concentraciones crecientes del sustrato entre 0,5 y 30 mM.

Los datos obtenidos en los que se determinó que la actividad específica presentada por la proteína purificada de la invención era del orden del 98% de la obtenida con laminarina para laminarina oxidada y del 0,2% para *p*-nitrofenil-β-D-glucósido, no siendo inhibida por β-gluconolactona, permiten concluir que la proteína de la invención degrada moléculas que contienen enlaces 1,3-β-glicosídicos mediante un mecanismo endohidrolítico.

2.5 Determinación del pH óptimo

El intervalo de pH óptimo al cual la proteína 1,3-β-glucanasa-crioprotectora 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 proteína de la invención tiene un pH óptimo de 5,0 aproximadamente, una actividad relativa superior al 50% entre pH 3,0 y 7,0 aproximadamente, reteniendo más de un 20% de su actividad máxima a pH 2 (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 1,3-β-glucanasa 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

ES 2 334 743 B1

descrito en el Ejemplo 2.3. El resultado fue expresado como porcentaje de actividad relativa respecto al máximo de actividad obtenida. La proteína de la invención es muy estable a valores de pH ácidos-neutros, mostrando después de 2 horas más del 80% de actividad relativa entre pH 2,0 y 6,0 aproximadamente (Figura 2B).

5 2.7. Determinación de Temperatura óptima

La actividad de la proteína 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 proteína de la invención presenta una temperatura óptima a
10 aproximadamente 40°C y una actividad relativa superior al 40% entre 5°C y 50°C aproximadamente, siendo inactivada rápidamente a moderada-alta temperatura (Figura 2C). La determinación del valor de energía de activación (E_a) entre 5 y 37°C estableció que la proteína de la invención presenta un valor muy bajo, del orden de $6,99 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, comparada con la mayor parte de las hidrolasas (Dicko MH, Searle-van Leeuwen MJ, Traore AS, Hilhorst R, Beldman G. 2001. Polysaccharide hydrolases from leaves of *Boscia senegalensis*: properties of endo(1,3)-beta-D-glucanase. Applied
15 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 1,3- β -
20 glucanasa 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 proteína de la invención mantiene una actividad relativa de más del 80% después de 2 h entre 5°C y 60°C, perdiendo rápidamente su estabilidad a temperaturas superiores (Figura 2D).

25 Ejemplo 3

Estudio de la Funcionalidad de la proteína

30 3.1. Actividad crioprotectora *in vitro* de la proteína

El ensayo de la actividad crioprotectora *in vitro* se realizó según el método descrito por Lin y Thomashow (Lin C, Thomashow MF. 1992. A cold-regulated *arabidopsis* gen encodes a polypeptide having potent cryoprotective activity. Biochemical and Biophysical Research Communications, 183, 1103-1108.) utilizando una proteína sensible a la
35 congelación-descongelación como la enzima lactato deshidrogenasa V-S de músculo de conejo (LDH, EC 1.1.1.23; Sigma). Para ello se preparó una solución madre de la enzima LDH comercial $0,02 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ que fue dializada toda la noche frente a 20 mM de tampón fosfato sódico pH 7,5. Se utilizaron mezclas con $3,2 \mu\text{g}$ de LDH de la solución madre y cantidades crecientes de la proteína de la invención purificada a homogeneidad ($0,04$ - $50 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) o extractos semipurificados (20 - $80 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$), de la proteína crioprotectora control seroalbúmina bovina V ($0,04$ - $205 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, Sigma) o
40 sacarosa ($0,04$ - $205 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) y un volumen final de $250 \mu\text{l}$. La disolución resultante fue congelada en nitrógeno líquido durante 30 segundos y dejada descongelar a temperatura ambiente durante 5 minutos. El proceso de congelación-descongelación fue llevado a cabo dos veces, midiendo posteriormente la actividad LDH residual.

La actividad LDH fue ensayada añadiendo $50 \mu\text{l}$ de las muestras anteriores al tampón de ensayo (80 mM Tris-
45 HCl pH 7,5, 100 mM KCl; 2 mM ácido pirúvico y 0,3 mM NADH) a temperatura ambiente y en un volumen final de 2 ml. La aparición de NAD^+ fue cuantificada registrando el descenso de absorbancia a 340 nm a temperatura ambiente durante 3 minutos en un espectrofotómetro convencional. Así mismo se midió la actividad enzimática de dos controles con LDH en tampón 20 mM fosfato potásico, y a pH 7,5: uno sometido al proceso de congelación-descongelación y otro que no. Los datos de actividad crioprotectora se mostraron como el porcentaje de actividad
50 residual frente al control no congelado. Cuando la LDH fue sometida a dos procesos de congelación-descongelación perdió aproximadamente más del 95% de la actividad.

El ensayo con extractos semipurificados de la proteína de la invención (20 - $80 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) obtenidos como de describe
55 en el Ejemplo 1.2. o 1.3.1. (fracción ácida) reveló que son aproximadamente 2 veces más activos como crioprotectores que la proteína control BSA, hallándose una proporcionalidad entre la capacidad crioprotectora del extracto semipurificado y la concentración de proteína añadida.

Cuando el ensayo fue realizado con diferentes concentraciones de la proteína de la invención purificada, la actividad crioprotectora incrementó, siendo muy superior a la actividad crioprotectora de BSA en el rango de concentraciones
60 ensayado (Figura 3). La determinación de la concentración de proteína crioprotectora necesaria para alcanzar un porcentaje de actividad LDH residual del 50% (valor C_{50}) se obtiene con la representación semilogarítmica del porcentaje de actividad LDH residual frente a la concentración de la proteína de la invención con actividad crioprotectora. Usando este procedimiento, LDH retiene un 50% de sus propiedades catalíticas cuando $8,7 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ de la proteína 1,3- β -glucanasa-crioprotectora de la invención fue añadida frente a los $80,3 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ de BSA necesarios. Siendo del orden
65 de 9 veces más crioprotectora la proteína de la invención que la proteína crioprotectora control BSA.

REIVINDICACIONES

1. Proteína 1-3- β -glucanasa **caracterizada** porque presenta actividad crioprotectora aislada de la pulpa de chirimoya (*Annona cherimola* Mill), constituida por una proteína monomérica con una masa molecular de 19.200 Da, y un punto isoeléctrico (pI) mayor o igual a 5,25, siendo una glicoproteína endo-1,3- β -glucanasa con una constante catalítica (k_{cat}) mayor de 2, preferentemente mayor de $3,1 \text{ s}^{-1}$, una constante de afinidad (K_m) mayor de 70 preferentemente de $80 \mu\text{M}$ y una eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) mayor de 35 preferentemente mayor $38,3 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, catalíticamente activa en un rango de pH ácido-neutro de 3,0 a 7,0, estable en un rango de pH ácido, de 2,0 a 6,0, termosensible a temperaturas superiores a 50°C y con una energía de activación (E_a) de $7,0 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, además de ser hidrolíticamente activa a bajas temperaturas, presentando un valor C_{50} de actividad crioprotectora de $8,7 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

2. Procedimiento de obtención de la proteína 1-3- β -glucanasa según la reivindicación 1 **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

a) pretratamiento gaseoso del material vegetal de partida, preferentemente tejidos de frutos tropicales, subtropicales y/o subproductos agrícolas, como por ejemplo sin que ello suponga un límite del alcance de la invención la pulpa de chirimoyas (*Annona cherimola* Mill.), es conservado en una atmósfera enriquecida con 10% a 30% de CO_2 , entre 60 y 75 horas a bajas temperaturas, unos 5 a 7°C , siendo posteriormente mantenido a condiciones atmosféricas durante un periodo de 3 a 10 días,

b) extracción y ultrafiltración de las proteínas del material vegetal, se tritura y homogeneiza en un medio acuoso constituido por una disolución acuosa salina, opcionalmente tamponada en un pH comprendido entre 3,0 y 10,0, preferentemente a pH 5,0, y a una temperatura entre 4 y 30°C , preferentemente a una temperatura de 4°C , y opcionalmente adicionando antioxidantes, agentes quelantes de cationes y secuestradores de fenoles al medio acuoso.

c) etapa de separación de la proteína de la invención del resto de proteínas de la fracción soluble mediante el fraccionamiento con sulfato amónico por saturación progresiva:

- El fraccionamiento comienza con una primera precipitación de proteínas a baja concentración de sulfato amónico entre 10% y 30%, preferentemente con 20%, obteniéndose un sobrenadante enriquecido en actividad 1-3- β -glucanasa,
- 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,

y opcionalmente

d) purificación mediante cualquier técnica convencional de purificación de proteínas.

3. Procedimiento según la reivindicación 2 **caracterizado** porque la extracción de b) se realiza mediante la adición de antioxidantes y/o agentes quelantes de cationes.

4. Procedimiento según la reivindicación 3 **caracterizado** porque el antioxidante al siguiente grupo: ácido ascórbico, y/o secuestradores de fenoles, por ejemplo polivinilpirrolidona soluble.

5. Procedimiento según la reivindicación 3 **caracterizado** porque el agente quelante de cationes es, por ejemplo, ácido etilendiamino-tetraacético sal disódica 2-hidrato (EDTA).

6. Procedimiento según la reivindicación 2 **caracterizado** porque la purificación de d) se realiza mediante técnicas cromatográficas.

7. Procedimiento según la reivindicación 6 **caracterizado** porque las técnicas cromatográficas son cromatografía de intercambio aniónico y/o cromatoenfoque.

8. Procedimiento según la reivindicación 7 **caracterizado** porque la cromatografía de intercambio aniónico se realiza a un pH entre 7,0 y 9,0, preferentemente a pH 8.

9. Procedimiento según la reivindicación 7 **caracterizado** porque se realizan dos cromatoenfoces consecutivos a un pH entre 6,0 a 4,0.

10. Uso de la proteína según la reivindicación 1 en procedimientos de biocatálisis, bioremediación o como agentes biocontrol y conservación de alimentos que requieran actividad 1-3- β -glucanasa.

ES 2 334 743 B1

11. Empleo de la proteína según la reivindicación 1 en la producción de alimentos fermentados y en la industria alimentaria para mejorar la textura y digestibilidad de los alimentos.

5 12. Uso de la proteína según la reivindicación 1 en la industria alimentaria, médica y farmacéutica como conservante o aditivo alimentario o en la protección de proteínas, células, tejidos u órganos a bajas temperaturas, refrigerados, congelados o liofilizados.

10 13. Uso de la proteína según la reivindicación 1 en la elaboración de una composición biotecnológica o farmacéutica útil para la criopreservación de principios activos.

14. Uso de la proteína según las reivindicaciones 10 a 12 en forma soluble y/o inmovilizada.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

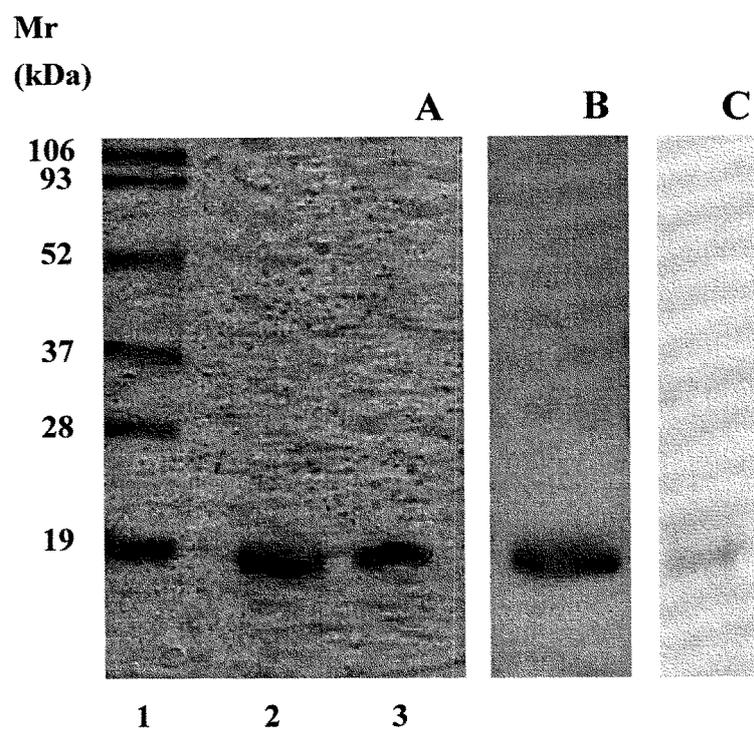


FIG. 1

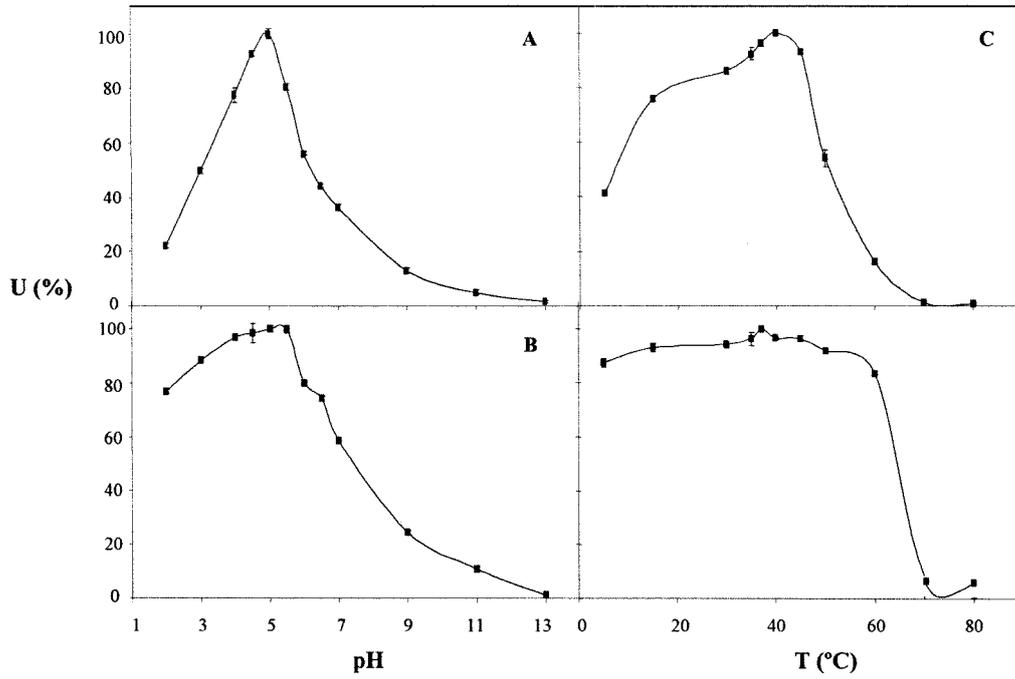


FIG. 2

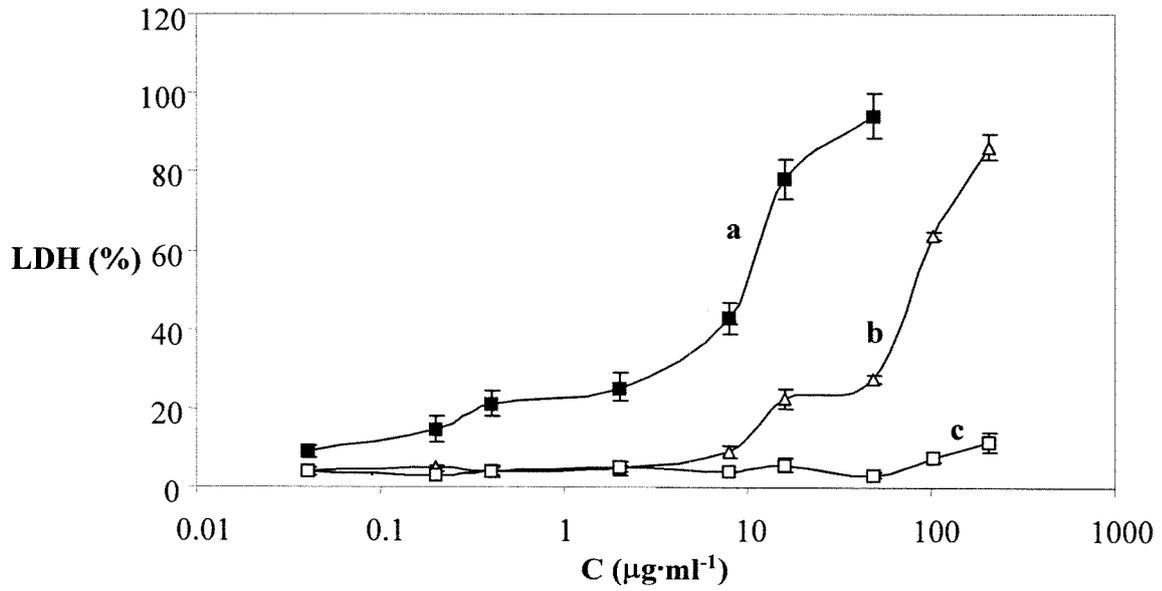


FIG. 3



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 334 743

② Nº de solicitud: 200801931

③ Fecha de presentación de la solicitud: 27.06.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GOÑI, O. et al. "Inducción de proteínas con funcionalidad crioprotectora por altas concentraciones de CO2 en chirimoya". SIMPOSIO POSTCOSECHA. 2006. ORIHUELA. Publicado en HORTICOM NEWS, 18.12.2006. [en línea], [recuperado el 18.02.2010]. Recuperado de Internet <URL:http://horticom.com/pd/imagenes/66/160/66160.pdf>; todo el documento.	1-14
A	ANTIKAINEN, M. et al. "Immunolocalization of antifreeze proteins in winter rye leaves, crowns, and roots by tissue printing". PLANT PHYSIOL. 1996. Vol. 110, Nº. 3, páginas 845-857; resumen	1-14
A	HINCHA, D.K. et al. "Beta-1,3-glucanase is cryoprotective in vitro and is accumulated in leaves during cold acclimation". PLANT PHYSIOL. 1997. Vol. 114, Nº. 3, páginas 1077-1083; resumen.	1-14
A	WO 9906565 A2 (ICE BIOTECH INC) 11.02.1999, reivindicaciones.	1-14

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

25.02.2010

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 9/24 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

A23B 4/22 (2006.01)

A23B 7/155 (2006.01)

A01N 1/00 (2006.01)

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

C12N, C07K, A23B, A01N

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

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.02.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-14	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-14	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 ha sido publicada.

Consideraciones:

La invención consiste en una proteína crioprotectora que presenta actividad beta-1,3-glucanasa a bajas temperaturas, aislada de chirimoya. La invención también incluye el procedimiento de obtención de la proteína y su utilización para criopreservar alimentos y productos biológicos.

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. "Inducción de proteínas con funcionalidad crioprotectora por altas concentraciones de CO2 en chirimoya". SIMPOSIO POSTCOSECHA. 2006. ORIHUELA. Publicado en HORTICOM NEWS, 18.12.2006. [en línea], [recuperado el 18.02.2010]. Recuperado de Internet <URL:http://horticom.com/pd/imagenes/66/160/66160.pdf>.	18-12-2006
D02	ANTIKAINEN, M. et al. "Immunolocalization of antifreeze proteins in winter rye leaves, crowns, and roots by tissue printing". PLANT PHYSIOL. 1996. Vol. 110, N°. 3, páginas 845-857.	1996
D03	HINCHA, D.K. et al. "Beta-1,3-glucanase is cryoprotective in vitro and is accumulated in leaves during cold acclimation". PLANT PHYSIOL. 1997. Vol. 114, N°. 3, páginas 1077-1083.	1997
D04	WO 9906565 A2 (ICE BIOTECH INC)	11-02-1999

Observaciones sobre documentos:

El documento D01, es una publicación del contenido de la presente solicitud, en una fecha anterior a la fecha de presentación de la misma.

El documento D02, describe la identificación de proteínas crioprotectoras en centeno, una de las cuales tiene actividad beta-1,3-glucanasa. El documento D03, describe la identificación de proteínas crioprotectoras en espinacas, una de las cuales también tiene actividad beta-1,3-glucanasa.

El documento D04, describe la identificación de la secuencia de ADN que codifica una beta-1,3-glucanasa obtenida del centeno que tiene propiedades crioprotectoras. También se describe la utilización de dicha beta-1,3-glucanasa para aumentar la tolerancia a la congelación de plantas y proteger de la congelación material biológico y productos alimenticios.

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

El contenido de la presente solicitud, ha sido publicado en el documento D01 en una fecha anterior a la fecha de solicitud de patente; por tanto, las reivindicaciones 1-14 no cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo a los Art. 6 y 8 de la LP.

Los documentos D02-D04, solo muestran el estado general de la técnica relacionado con proteínas con actividad beta-1,3-glucanasa y propiedades crioprotectoras, aisladas de vegetales. Estos documentos no se consideran de particular relevancia en relación a la novedad y actividad inventiva de las reivindicaciones de la solicitud.