



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 334 741**

② Número de solicitud: 200801914

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: **26.06.2008**

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 Garaizábal, María Isabel;**
Merodio Moreno, Carmen y
Goñi Ramos, Óscar

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Proteína crioprotectora con actividad quitinasa a bajas temperaturas, procedimiento para su obtención y sus aplicaciones.**

㉑ Resumen:

Proteína crioprotectora con actividad quitinasa a bajas temperaturas, procedimiento para su obtención y sus aplicaciones.

La presente invención describe una nueva proteína quitinasa biológicamente activa a bajas temperaturas, estable en un amplio rango de pH 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 quitina en condiciones que requieran bajas temperaturas. Esta proteína quitinasa 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 quitina en condiciones que requieran bajas temperaturas o inactivación a moderada-alta temperatura.

ES 2 334 741 B1

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

DESCRIPCIÓN

Proteína crioprotectora con actividad quitinasa a bajas temperaturas, procedimiento para su obtención y sus aplicaciones.

5

Sector de la técnica

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, biorremediación, biocontrol y conservación de alimentos.

10

Estado de la técnica

Las proteínas quitinasas hidrolizan quitina, un polisacárido lineal que consiste en unidades de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) unidas por enlaces β (1-4) glucosídicos. Cuando la quitina está desacetilada recibe el nombre de quitosan.

15

La quitina es el polímero más abundante que contiene nitrógeno y el segundo biopolímero más abundante de la tierra, siendo una fuente vital de nitrógeno esencial para el crecimiento y supervivencia de ecosistemas marinos y terrestres. Es un polímero natural constituyente principal de la pared celular de los hongos, del exoesqueleto de insectos y otros artrópodos, y en algunos otros animales. Por tanto las quitinasas, son esenciales para los organismos que contienen en sus estructuras quitina (hongos, insectos, crustáceos, etc.) y así mismo son utilizadas por muchas bacterias que utilizan la quitina como una fuente de carbono y de energía (Neuhaus J. 1999. Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11), In: Pathogenesis-related Proteins in Plants. Datta, S.K., Muthukrishnan, S. (Eds.). Boca-Raton, Florida, CRC Press, pp. 77-105).

20

25

Existen múltiples formas de quitinasas en la naturaleza producidas con el fin de degradar el polímero de quitina para su completa degradación en *N*-acetil-D-glucosamina. En el caso de las bacterias, éstas cuando se encuentran en presencia de quitina producen y secretan enzimas quitinolíticas que digieren la quitina reduciéndola en azúcares simples y amonio. Las bacterias contienen receptores específicos para los azúcares simples procedentes de la degradación de la quitina, de tal manera que éstas proliferan en aquellos lugares donde hay quitina, por lo que al descender su concentración o los organismos que la producen disminuyen por tanto su carga bacteriana.

30

Las plantas a su vez producen enzimas quitinolíticas como proteínas de defensa frente a patógenos, especialmente frente a hongos. Las enzimas quitinolíticas con conocida actividad antifúngica son mayoritariamente endoquitinasas (Kasprzewska, A. 2003. Plant chitinases. Regulation and function. Cellular and Molecular Biology Letters, 8, 809-824).

35

Además de su interés académico y fisiológico, las quitinasas son ampliamente utilizadas en procesos de biorremediación y son frecuentemente consideradas críticas, junto con proteasas, glucanasas y celulasas, en el biocontrol de hongos fitopatógenos (Deshpande MV. 1986. Enzymatic degradation of chitin & its biological applications. Journal of Scientific and Industrial Research, 45, 273-281., 1986; 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. *et al.*, 1995). Las quitinasas ocupan una posición única en la agricultura biotecnológica por su acción antifúngica ya que su actividad lítica inhibe el desarrollo de hongos al degradar componentes clave de la pared celular.

40

45

Por todo lo anteriormente expuesto las quitinasas juegan una función vital en la industria relacionada con la agricultura y en el campo médico, además, también son fundamentales en la industria de alimentos marinos para la degradación de desechos quitinosos de crustáceos o ejerciendo su efecto sobre hongos y bacterias que contaminan y deterioran alimentos conservados a bajas temperaturas.

50

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). 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 las enzimas y su reacción de catálisis es esencial para predecir el ámbito de la reacción y la posición de cualquier proceso en el cual la reacción se produce.

60

Para conocer la estabilidad de una enzima es esencial previamente 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. Recientemente se están estudiando un nuevo grupo de enzimas llamadas "enzimas adaptadas al frío" (cold-adapted enzymes) las cuales son muy interesantes para la industria porque muestran una alta eficiencia catalítica a bajas temperaturas presentando además un valor bajo de energía de activación (E_a). Otra peculiaridad que tienen es que se encuentran en general, si no siempre, asociadas a una alta termosensibilidad, lo

65

que permite el control de la reacción enzimática a través de su inactivación por calor fácilmente, a relativa moderada temperatura. Así mismo, este nuevo grupo de enzimas ofrecen un considerable espectro de aplicación en diferentes procesos industriales, como por ejemplo, en la elaboración de detergentes, en la industria alimentaria, 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 *et al.*, 2000).

A pesar de su potencial aplicación biotecnológica, muy pocas enzimas activas a baja temperatura están siendo utilizadas comercialmente, tan sólo una lipasa, una lisozima, una celulasa, varias proteasas, entre otras (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 solicitudes de patentes sobre estas enzimas hay tres documentos sobre proteasas adaptadas a bajas temperaturas: 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), 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 la 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.

La utilización de microorganismos psicrófilos en los alimentos podría reemplazar a los conservantes químicos al disminuir o eliminar aquellos metabolitos requeridos por 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 y debido al gran interés industrial que despierta este tipo de proteínas con alta actividad a bajas temperaturas, ha dado lugar a la búsqueda de nuevas fuentes naturales de proteínas más resistentes a la inactivación por bajas temperaturas.

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.

Las enzimas son polipéptidos producidos por las células de los seres vivos 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 sino que también son útiles agentes farmacéuticos, por lo que es necesaria 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.

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). Entre las patentes relacionadas con el tema existe una patente americana U.S. 4,806,343 que describe un método para proteger la actividad de biológica de proteínas después de la congelación exponiéndola previamente a carbohidratos y cationes no metálicos. Por otro lado, la patente japonesa JP 2001139599 reivindica una sustancia crioprotectora procedente de un microorganismo.

Las proteínas crioprotectoras, de forma individual o mezclada con otros crioprotectores, son empleadas en la conservación 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.

En general son escasas las fuentes conocidas de proteínas con actividad crioprotectora. En vegetales, son pocas las clases de proteínas que presentan esta actividad, 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 L.A, 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. *Physiologia 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)

básica 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, Sanchez-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 y además se permite reducir la necesidad de ensayos extensos y caros de toxicidad.

Actualmente es muy difícil proporcionar a la Industria alimentaria, médica y farmacéutica de 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, biorremediación, biocontrol y conservación de alimentos sanos en condiciones que requieran bajas temperaturas son requeridas proteínas que desarrollen una alta actividad hidrolítica a bajas temperaturas, que sean estables en un amplio rango de pH y con control de su inactivación a moderada alta temperatura.

Descripción de la invención

Descripción breve

Un aspecto de la invención lo constituye una proteína quitinasa 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 14.500 Da, y un punto isoelectrico (pI) mayor o igual a 8,26, de naturaleza endoquitinasa con una constante catalítica (k_{cat}) mayor de 5, preferentemente mayor de $6,8 \text{ s}^{-1}$ y una eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m) mayor de 35 preferentemente mayor $38,7 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, catalíticamente activa en un rango de pH de 4 a 9, estable en un amplio rango de pH, de 2,0 a 11,0, termosensible a temperaturas superiores a 45°C y con una energía de activación (E_a) de $11,32 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, además de ser quitinolíticamente activa a bajas temperaturas y presentando un valor C_{50} de actividad crioprotectora de $6,4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

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 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 6 a 10 días,

b) extracción y ultrafiltración, 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 a 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.

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 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,

y

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 y sin que limite el alcance de la invención, ácido ascórbico y ácido etilendiamino-tetraacético sal disódica 2-hidrato (EDTA).

ES 2 334 741 B1

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, y mediante cromatoenfoco en un rango de pH de 9,0 a 7,0.

5 El procedimiento de aislamiento de la proteína de la invención descrito manifiesta un alto rendimiento reflejado en una recuperación del 3,29% y un factor de purificación de 36,21, 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 quitinasa a partir un material desechable y económico como el caso de un subproducto procedente de Cooperativas
10 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 quitinasa, incluso en reacciones que requieran una alta eficiencia catalítica puesto que presenta una constante catalítica 70 veces superior a otras quitinasas.
15

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.
20

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.
25

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).
30

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 activo a muy bajas concentraciones. Además, su aislamiento es compatible con su inocuidad como aditivo alimentario.
35

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.

40 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.

45 La presente invención se basa en que los inventores han identificado una proteína quitinasa 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 14.500 Da, y un punto isoeléctrico (pI) mayor o igual a 8,26, aproximadamente.

50 Asimismo, la naturaleza quitinasa de la proteína de la invención ha sido determinada por inmunodetección con anticuerpos policlonales frente a proteínas PR-Q de tabaco viéndose que está serológicamente ligada a quitinasas del tabaco y posteriormente ha sido identificada mediante el análisis del mapa de la huella peptídica utilizando para ello espectrometría de masas.

55 La proteína de la invención presenta una constante de afinidad similar a otras quitinasas de la bibliografía pero sin embargo su valor para la constante catalítica (k_{cat}) es mucho mayor, siendo del orden de más de 70 veces superior ($6,93 \text{ s}^{-1}$). El valor estimado de su k_{cat} a una temperatura de 5°C es del orden del 70% del valor estimado en el ensayo estándar *in vitro* a 37°C siendo por ello una enzima quitinolíticamente activa a bajas temperaturas.

60 Adicionalmente la proteína de la invención muestra una alta eficiencia catalítica ($38,7 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) y tiene como ventajas adicionales que es catalíticamente activa en un amplio margen de pH (4,0 a 9,0), altamente estable a: pH básicos, bajas temperaturas y termosensible a temperaturas moderadamente altas (superiores a 45°C) presentando un valor bajo de energía de activación (E_a) de aproximadamente $11,32 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, aunque las condiciones óptimas de la
65 proteína de la invención son un pH de 7,0 y una temperatura de 35°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 2 334 741 B1

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 13 veces menor que la concentración requerida de BSA, $6,4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ frente a $80,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Así, un aspecto de la invención lo constituye una proteína quitinasa, en adelante proteína de la invención, con actividad crioprotectora aislada de la pulpa de chirimoya (*Annona cherimola* Mill) constituida por una proteína monomérica con una masa molecular de 14.500 Da, y un punto isoeléctrico (pI) mayor o igual a 8,26, que es una endoquitinasa con una constante catalítica (k_{cat}) mayor de 5, preferentemente mayor de $6,8 \text{ s}^{-1}$ y una eficiencia catalítica mayor de 35 preferentemente mayor $38,7 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, catalíticamente activa en un rango de pH de 4 a 9, estable en un amplio rango de pH, de 2,0 a 11,0, termosensible a temperaturas superiores a 45°C y con una energía de activación (E_a) de $11,32 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, además de ser quitinolíticamente activa a bajas temperaturas presentando un valor C_{50} de actividad crioprotectora de $6,4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Asimismo, la presente invención describe un procedimiento de aislamiento de la proteína de la invención con una recuperación del 3,29% y un factor de purificación de 36,21 de la proteína, de manera que si se parte 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.

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 si 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 6 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 a 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 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,

y

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

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 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% de las unidades de enzima con actividad quitinasa contenido en esta fracción.

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 quitinasa 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 de 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

ES 2 334 741 B1

extracto proteico obtenido en la etapa (b) se somete a fraccionamiento con sulfato amónico por saturación puesto que las proteínas con actividad quitinasa 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 quitinasas obtenemos un sobrenadante enriquecido en actividad quitinolítica. Esta fracción de proteínas soluble, que contiene actividad quitinasa, 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 quitinasa y comprende una mezcla de isoenzimas con actividad quitinasa que contiene más del 73% 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 actividad quitinasa-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 debido a la naturaleza catiónica de la proteína de la invención y una segunda etapa mediante cromatoenfoco realizado en un gradiente de pH de 9,0 a 7,0.

El procedimiento de aislamiento de la proteína de la invención descrito manifiesta un alto rendimiento reflejado en una recuperación del 3,29% y un factor de purificación de 36,21. Concretamente se pueden obtener valores de alrededor de 0,8-1,0 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 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 quitinasa, incluso en reacciones que requieran una alta eficiencia catalítica puesto que presenta una constante catalítica 70 veces superior a otras quitinasas.

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.

Asimismo, la proteína de la invención puede ser utilizada como agentes fitopatógenos, evitando enfermedades en las plantas y cultivos a baja temperatura ya que son enzimas digestivas de pared celular y el producto de su hidrólisis induce resistencia.

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 (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.

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.

65 Descripción de las figuras

Figura 1 Análisis electroforético e inmunológico de la proteína purificada de 14.500 Da con actividad quitinasa-crioprotectora (A) Análisis electroforético (SDS-PAGE). Las líneas 2 y 3 fueron cargadas con 2 µg de proteína pu-

ES 2 334 741 B1

rificada 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 proteína de la invención purificada, en su forma no reducida, e incubado con anticuerpos policlonales frente a proteínas PRQ de tabaco.

5

Figura 2 Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad y estabilidad de la proteína quitinasa-crioprotectora. 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 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. (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. (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).

10

15

Figura 3 Actividad crioprotectora de la proteína quitinasa 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).

20

25

Ejemplos de realización de la invención

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

25

Ejemplo 1

30

Obtención de la proteína con actividad quitinasa-crioprotectora aislada de chirimoya

1.1 Etapa de Extracción y Ultrafiltración

35

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 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.

40

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.

45

1.1.1 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% de las unidades de enzima con actividad quitinasa se encuentra en esta fracción.

55

1.2 Fraccionamiento

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% de las unidades de actividad iniciales.

65

ES 2 334 741 B1

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 quitinasa, 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 una velocidad de flujo de $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, y la fracción no adsorbida, o volumen muerto de la columna, se denominó fracción básica. Ésta fue concentrada y desalada por ultrafiltración en tampón dietanolamina-HCl 25 mM, pH 9,5 conteniendo glicerol al 10% con un sistema Centriplus YM3 (Millipore, EE.UU.).

La elución de quitinasas básicas se detectó por incremento de absorbancia a 280 nm y su actividad se determinó mediante un ensayo colorimétrico usando CM-quitina-RBV (Loewe Biochemica) como sustrato. Las fracciones que mostraban actividad quitinasa se unieron y se desalaron posteriormente.

1.3.2 Cromatografía de afinidad

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 dietanolamina-HCl 25 mM, pH 9,5, conteniendo glicerol al 10%. La separación de proteínas se llevó a cabo mediante un gradiente de pH de 9 a 7 de 43 minutos utilizando tampón Polybuffer 96-HCl (Amersham Biosciences) 10% (v/v), pH 7,0, con una velocidad de flujo de $0,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, recogiendo fracciones de 1 ml y valorando su pH con un pHmetro MicropH-2000 (Crison). Tras evaluar aquellas fracciones que presentaban absorbancia a 280 nm, se examinó la presencia de quitinasas básicas mediante la determinación colorimétrica de su actividad enzimática utilizando CM-quitina-RBV como sustrato. 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 36,2 y una recuperación del 3,3%.

Ejemplo 2

Caracterización de la proteína con actividad quitinasa-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 purificada se llevó a cabo mediante técnicas de electroforesis sobre geles de poliacrilamida 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 reveló 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 14.500 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), ovoalbumina de huevo (52300 Da), seroalbumina 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).

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).

El análisis por cromatografía de afinidad a pH 9-7 según se describe en el apartado 1.3.2. reveló que la proteína de la invención es una proteína básica con un $pI > 8$, concretamente de 8,26.

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 proteína quitinasa básica purificada, se compararon los datos de masa/carga de los péptidos resultantes con los descritos en las bases de datos. En 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 \leq 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 7 péptidos identificados, una probabilidad de homología de 97 y un porcentaje de cobertura de secuencia del 31%, la proteína purificada de chirimoya, con actividad quitinasa-crioprotectora y reconocida por anticuerpos para esta proteína fue identificada con una quitinasa básica (pI 9,54 y M_r 30.900 Da) de clase I procedente de *Arabidopsis thaliana* Heynh (número de acceso base de datos NCBI para la proteína homóloga gi:15224319).

2.3. Determinación de la actividad enzimática

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

La actividad enzimática de esta quitinasa-crioprotectora se determinó por el siguiente método en el que CM-quitina-RBV se utilizó como sustrato (Wirth SJ, Wolf GA. 1990. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. Journal of Microbiological Methods, 12, 197-205.).

En primer lugar, 200 μ l de sustrato CM-quitina-RBV 2 mg·ml⁻¹ y 530 μ l de tampón acetato sódico 100 mM 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.

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 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-crioprotectora. La proteína de la invención purificada presenta una actividad total de 620 U y una actividad específica de 3458,3 U·mg⁻¹.

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 tetrámeros, 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.

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.

A continuación la reacción se detuvo con 0,25 ml de tampón carbonato/bicarbonato sódico 1M, 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.

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.

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 tetrámero (k_{cat} 6,93 s⁻¹ y K_m 0,18 mM) y el trímero (k_{cat} 2,87 s⁻¹ y K_m 0,09 mM), no teniendo actividad con el dímero. Además estos datos demostraron que esta enzima presenta un valor de afinidad similar a otras pero el valor de su constante catalítica es mucho mayor, del orden de más de 70 veces superiores, teniendo por tanto una alta eficiencia catalítica (k_{cat}/K_m 38,67 s⁻¹ mM⁻¹ para el tetrámero y 33,23 s⁻¹ mM⁻¹ para el trímero) 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 del orden del 70% del valor estimado en el ensayo estándar *in vitro* a 37°C, siendo por ello una enzima quitinolíticamente activa a bajas temperaturas.

2.5 Determinación del pH óptimo

El intervalo de pH óptimo al cual la proteína quitinasa-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:

ES 2 334 741 B1

tampón ácido fosfórico 100 mM para pH 2,0

tampón glicina-HCl 100 mM para pH 3,0

5 tampón acetato sódico 100 mM para pH 4,0-6,0

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

10 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 7,0 aproximadamente y una actividad relativa superior al 50% entre pH 4,0 y 9,0 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 proteína de la invención es muy estable en un amplio margen de pH, mostrando después de 2 horas más del 80% de actividad relativa entre pH 2,0 y 11,0 aproximadamente (Figura 2B).

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 presentó una temperatura óptima a aproximadamente 35°C, desarrollando una actividad relativa superior al 50% entre 15°C y 50°C aproximadamente y reteniendo más del 25% de la actividad enzimática a bajas temperaturas, unos 5°C (Figura 2C). La determinación del valor de energía de activación (E_a) entre 5°C y 37°C estableció que la proteína de la invención presenta un valor bajo, del orden de 11,32 kJ·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 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 proteína de la invención es termosensible a partir de aproximadamente 45°C, manteniendo una actividad relativa de más del 90% después de 2 h entre 5°C y 45°C (Figura 2D).

Ejemplo 3

Estudio de la Funcionalidad de la proteína

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 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 µg·µl⁻¹ que fue dializada toda la noche frente a 20 mM de tampón fosfato sódico pH 7,5. Se utilizaron mezclas con 3,2 µg de LDH de la solución madre y cantidades crecientes de la proteína de la invención purificada a homogeneidad (0,04-50 µg·µl⁻¹) o extractos semi-purificados (20-80 µg·µl⁻¹), de la proteína crioprotectora control seroalbúmina bovina V (0,04-205 µg·µl⁻¹, Sigma) o sacarosa (0,04-205 µg·µl⁻¹) y un volumen final de 250 µl. 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 µl de las muestras anteriores al tampón de ensayo (80 mM Tris-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

ES 2 334 741 B1

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 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.

5

El ensayo con extractos semipurificados de la proteína de la invención ($20-80 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) obtenidos como se describe en el Ejemplo 1.2. o 1.3.1. (fracción básica) 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.

10

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 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 obtuvo 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 $6,4 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ de la proteína quitinasa-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 de 13 veces más crioprotectora la proteína de la invención que la proteína crioprotectora control BSA.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Proteína quitinasa **caracterizada** porque presenta actividad crioprotectora, aislada de la pulpa de chirimoya (*Annona cherimola* Mill), constituida por una proteína monomérica con una masa molecular de 14.500 Da, y un punto isoeléctrico (pI) mayor o igual a 8,26, es una endoquitinasa con una constante catalítica (k_{cat}) mayor de 5, preferentemente mayor de $6,8 \text{ s}^{-1}$ y una eficiencia catalítica mayor de 35 preferentemente mayor $38,7 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, catalíticamente activa en un rango de pH de 4 a 9, estable en un rango de pH de 2,0 a 11,0, termosensible a temperaturas superiores a 45°C y con una energía de activación (E_a) de $11,32 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, además de ser quitinolíticamente activa a bajas temperaturas, presentando un valor C_{50} de actividad crioprotectora de $6,4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

2. Procedimiento de obtención de la proteína quitinasa 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 6 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,

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 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,

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 pertenece 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 el cromatoenfoque se realiza a un gradiente de pH de 9,0 a 7,0.

9. Uso de la proteína según la reivindicación 1 en procedimientos de biocatálisis, bioremediación o como agentes biocontrol y conservación de alimentos que requieran actividad quitinasa.

10. 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.

ES 2 334 741 B1

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

5 12. Uso de la proteína según las reivindicaciones 9 a 11 en forma soluble y/o inmovilizada.

13. Uso de la proteína según las reivindicaciones 9 a 11, sola o acompañada con otros crioprotectores.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

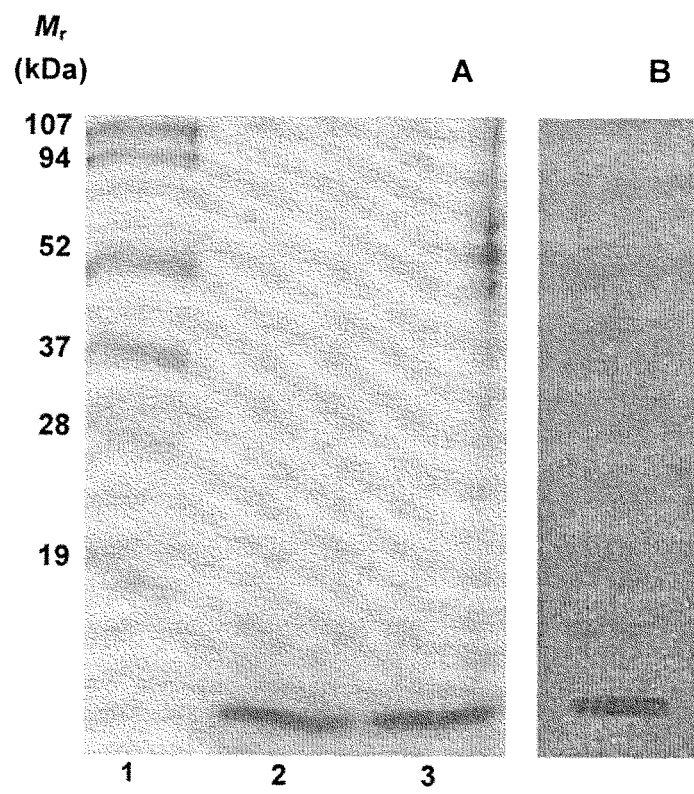


FIG. 1

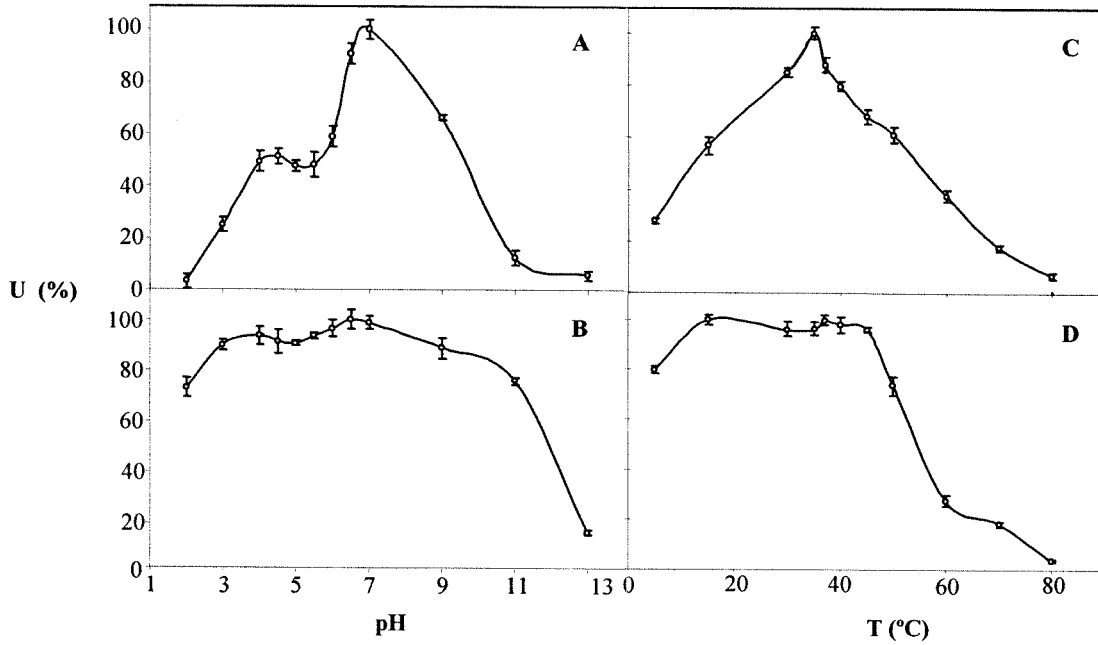


FIG. 2

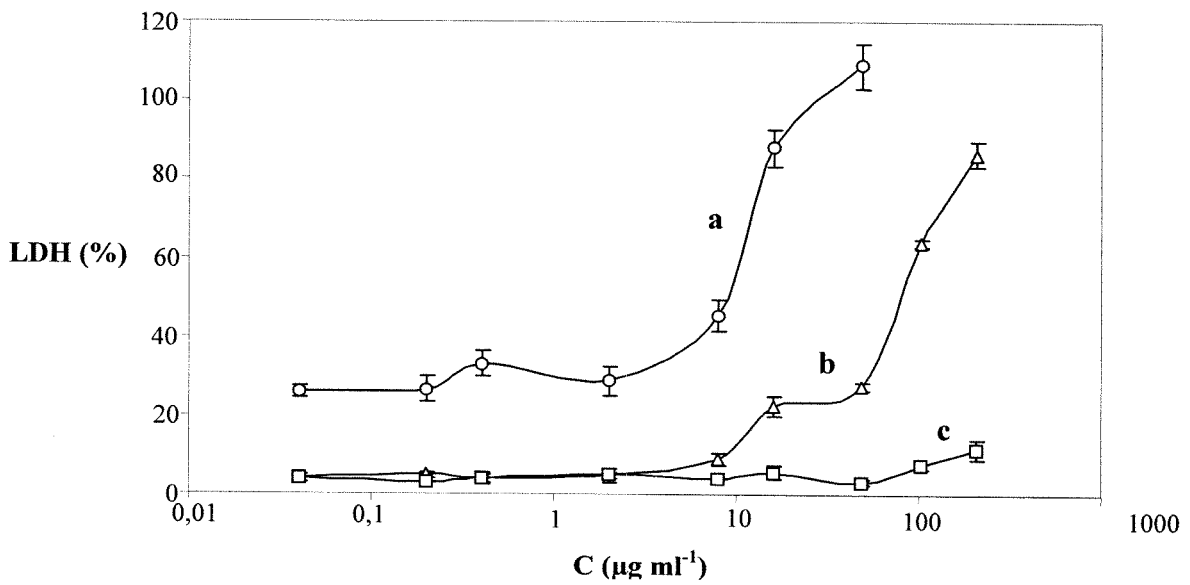


FIG. 3



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 334 741

② Nº de solicitud: 200801914

③ Fecha de presentación de la solicitud: 26.06.2008

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.	1-13
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	1-13
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; resum	1-13 n.
A	WO 9906565 A2 (ICE BIOTECH INC) 11.02.1999, reivindicaciones.	1-13

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, WPI, BIOSIS, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.02.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-13	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-13	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 quitinasa a bajas temperaturas, aislada de la 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 CO ₂ 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 BIOTEC 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 quitinasa. El documento D03, describe la identificación de proteínas crioprotectoras en espinacas, una de las cuales también tiene actividad quitinasa.

El documento D04, describe la identificación de la secuencia de ADN que codifica una quitinasa obtenida del centeno que tiene propiedades crioprotectoras. También se describe la utilización de dicha quitinasa 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 una fecha anterior a la fecha de solicitud de patente en el documento D01; por tanto, las reivindicaciones 1-13 no cumplen los requisitos de novedad y de actividad inventiva de los Art. 6 y 8 de la LP.

Los documentos D02-D04, solo muestran el estado general de la técnica en relación a proteínas con actividad quitinasa 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.