(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 167 278**

(21) Número de solicitud: 200002553

(51) Int. Cl.[7]: C12N 9/08
C12N 9/02

(12) PATENTE DE INVENCION B1

(22) Fecha de presentación: **24.10.2000**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2002**

Fecha de concesión: **15.07.2003**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **16.08.2003**

(45) Fecha de publicación del folleto de patente: **16.08.2003**

(73) Titular/es: **UNIVERSIDAD DE MURCIA**
Avda. Teniente Flomesta
Edf. de la Convalecencia
30003 Murcia, ES

(72) Inventor/es: **Rodríguez López, José Neptuno;**
López Molina, Dorotea;
Tudela Serrano, José Bautista y
García Cánovas, Francisco

(74) Agente: **Fernández Prieto, Angel**

(54) Título: **Enzima con actividad peroxidasa aislada de la alcachofa (*Cynara scolymus*, L.), procedimiento para su aislamiento y purificación y aplicaciones.**

(57) Resumen:
Enzima con actividad peroxidasa aislada de la alcachofa (*Cynara scolymus*, L.), procedimiento para su aislamiento y purificación y aplicaciones.
La enzima con actividad peroxidasa aislada a partir de alcachofa (*Cynara scolymus*, L.) es una proteína glicosilada que puede obtenerse mediante un procedimiento que comprende la extracción de dicha enzima con actividad peroxidasa a partir de tejidos de alcachofa, la separación de dicha enzima de otras enzimas con actividad oxidasa eventualmente presentes en el material vegetal, y, opcionalmente, la purificación parcial o a homogeneidad de dicha enzima con actividad peroxidasa. Esta enzima puede utilizarse en la oxidación de sustratos reductores, como reactivo clínico o de diagnóstico, como enzima marcadora en inmunoensayos, para la elaboración de biosensores, como biocatalizador para la obtención de productos de interés biotecnológico e industrial y en aplicaciones medioambientales.

ES 2 167 278 B1

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

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 – 28036 Madrid

DESCRIPCION

Enzima con actividad peroxidasa aislada de la alcachofa (*Cynara scolymus*, L.), procedimiento para su aislamiento y purificación y aplicaciones.

Campo de la invención

La invención se refiere a una enzima con actividad peroxidasa aislada de la alcachofa (*Cynara scolymus*, L.), a un procedimiento para su aislamiento y purificación y a sus aplicaciones.

Antecedentes de la invención

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7) son óxidorreductasas que se encuentran ampliamente distribuidas en toda la escala filogenética y que catalizan la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el poder oxidante del peróxido de hidrógeno. Además de su interés académico y fisiológico, estas enzimas son ampliamente utilizadas en laboratorios clínicos y en la industria. De entre ellas la extraída de la raíz del rábano picante (HRP) es la más usada.

La peroxidasa es utilizada ampliamente en bioquímica clínica. Así, los ensayos para la determinación y cuantificación de metabolitos como glucosa, ácido úrico, colesterol o triglicéridos en fluidos biológicos usan peroxidasa como enzima acoplada. También se utiliza en inmunoensayos para la detección de virus tan conocidos como el virus de la imunodeficiencia humana (VIH) causante del SIDA o herpesvirus. Las peroxidasas también se utilizan como biocatalizadores para la generación de productos de interés biotecnológico e industrial como resinas fenólicas, adhesivos, antioxidantes, antiestáticos y protectores de radiación magnética, colorantes alimentarlos y componentes bioactivos de detergentes.

Otra propiedad de las peroxidasas ha hecho que la Comisión Científica de la Unión Europea las defina como una de las proteínas con mayor interés biotecnológico para el siglo XXI, y consiste en su aplicación para conservar el medio ambiente. En esta línea las peroxidasas pueden sustituir a algunos reactivos y catalizadores químicos usados hoy en día en cierto tipo de industrias. A modo de ejemplo, algunas peroxidasas pueden sustituir al cloro en el proceso de blanqueamiento del papel durante su reciclaje (patente norteamericana US 5.370.770) y también al formaldehído (mutagénico y cancerígeno) utilizado en la fabricación de resinas fenólicas (patente norteamericana US 5.112.752). Otra aplicación de las peroxidasas en este apartado, es su uso para el tratamiento de residuos líquidos o suelos contaminados con fenoles, aminas aromáticas, compuestos clorados y/o metales pesados (patente norteamericana US 5.178.762).

El gran interés industrial de esta enzima ha dado lugar a la búsqueda de nuevas fuentes de peroxidasa que catalicen con mayor eficacia un determinado proceso y que sean más resistentes a la inactivación. Así, se ha patentado el aislamiento y empleo de una peroxidasa de soja para la formación de resinas fenólicas (patente norteamericana US 5.491.085). Esta enzima tiene una alta resistencia a la temperatura lo que permite una gran eficacia en este proceso, siendo un sustituto del formaldehído. Nuevas peroxidasas han sido también aisladas del microorganismo *Coprinus cinereus* (patente norteamericana US 5.116.751).

Compendio de la invención

La invención se enfrenta, en general, con el problema de proporcionar nuevas fuentes de peroxidasa.

La solución proporcionada por esta invención se basa en que los inventores han identificado una enzima con actividad peroxidasa en alcachofa, en particular, en tallos, hojas y brácteas de alcachofa. En el Ejemplo 1 se describe el aislamiento y purificación de una enzima a partir de las brácteas de alcachofa que presenta actividad peroxidasa [véase el Ejemplo 3.2].

En una realización particular dichos tallos, hojas y brácteas de alcachofa proceden de los desechos de la industria conservera de alcachofas, la cual origina una gran cantidad de desechos. Por ejemplo, el 70 % en peso de la flor de la alcachofa corresponde a desechos no destinados al consumo humano. Sin embargo, éstos son útiles para la alimentación animal y están destinados a la elaboración de forrajes ensilados. La invención proporciona, en este caso, una valorización de dicho desecho.

Por tanto, un objeto de esta invención lo constituye una enzima con actividad peroxidasa aislada de alcachofa.

Un objeto adicional de esta invención lo constituye un procedimiento para el aislamiento de dicha enzima con actividad peroxidasa a partir de alcachofas.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye un procedimiento para la purificación de dicha enzima con actividad peroxidasa.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye el empleo de dicha enzima con actividad peroxidasa en la oxidación de sustratos reductores, en Biomedicina e investigación, en procesos industriales, en la elaboración de biosensores y en aplicaciones medioambientales.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el espectro de absorción de una enzima con actividad peroxidasa aislada de alcachofa purificada mediante un procedimiento proporcionado por esta invención.

La Figura 2 es una gráfica que muestra la relación entre el pH de la reacción y la actividad relativa de una enzima con actividad peroxidasa aislada de alcachofa purificada mediante un procedimiento proporcionado por esta invención.

La Figura 3 es una gráfica que muestra la relación entre la temperatura de la reacción y la actividad relativa de una enzima con actividad peroxidasa aislada de alcachofa purificada mediante un procedimiento proporcionado por esta invención.

La Figura 4 es una gráfica que muestra la estabilidad de una enzima con actividad peroxidasa aislada de alcachofa purificada mediante un procedimiento proporcionado por esta invención, respecto al tiempo, a la temperatura óptima.

La Figura 5 es un esquema de las aplicaciones de una enzima con actividad peroxidasa aislada de alcachofa proporcionada por esta invención [POD: peroxidasa].

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona una enzima con actividad peroxidasa aislada de alcachofa (*Cynara scolymus*, L.), en ocasiones denominada en esta descripción "enzima de la invención". Dicha enzima puede ser aislada a partir de tallos, hojas y brácteas de alcachofa mediante un procedimiento que se describirá más adelante y, si se desea, purificada parcialmente o a homogeneidad. Se pueden utilizar fracciones conteniendo la enzima de la invención parcialmente purificada en múltiples ensayos clínicos y de diagnóstico, así como en procesos industriales y biotecnológicos y en aplicaciones medio-ambientales, mientras que las fracciones conteniendo una enzima de la invención más purificada se pueden utilizar para técnicas más especializadas e investigación básica.

En una realización particular, dicha enzima de la invención es una enzima aislada a partir de brácteas de alcachofa, purificada a homogeneidad, que corresponde a la isoenzima mayoritaria presente en la brácteas de alcachofa. Dicha isoenzima ha sido caracterizada mediante los ensayos descritos en el Ejemplo 3. Como puede apreciarse, dicha enzima es una enzima glicosilada que, aunque tiene actividad peroxidasa, no es una ascorbato peroxidasa, tiene especificidad por sustratos reductores. Además, se ha observado que tiene un peso molecular de aproximadamente 42.000 dalton, determinado por electroforesis, y un punto isoeléctrico (pI) mayor de 9,5 aproximadamente.

También se ha encontrado que dicha enzima tiene una actividad superior al 40 % entre pH 3,5 y 7 aproximadamente, y un pH óptimo a 4,5 aproximadamente (véase la Figura 2). Asimismo, se ha observado que dicha enzima tiene una actividad relativa superior al 40 % entre 40°C y 85°C aproximadamente, una temperatura óptima a aproximadamente 70°C (véase la Figura 3) y es estable a la temperatura óptima a lo largo del tiempo (véase la Figura 4).

Dicha enzima ha mostrado su capacidad para oxidar numerosos sustratos reductores utilizando el poder oxidante del peróxido de hidrógeno, de acuerdo con la. definición de las peroxidasas (EC 1.11.1.7).

La enzima de la invención puede obtenerse a partir de tejidos de alcachofa, en particular, tallos, hojas y brácteas de alcachofa, mediante un procedimiento que comprende las etapas de extracción de dicha enzima con actividad peroxidasa a partir de dichos tejidos de alcachofa, la separación de dicha enzima de otras enzimas con actividad oxidasa eventualmente presentes en el material vegetal, y, opcionalmente, la purificación parcial o a homogeneidad de dicha enzima con actividad peroxidasa, que se describirán detalladamente más adelante.

En una realización particular del procedimiento de obtención de la enzima de la invención, dichos tallos, hojas y brácteas de alcachofa forman parte de los desechos de alcachofa generados por la industria conservera, por lo que el procedimiento proporcionado por esta invención supone la extracción y purificación de un producto de gran interés (enzima con actividad peroxidasa) a partir de un desecho industrial que constituye una fuente nueva y económica de enzima con actividad peroxidasa. Además, el residuo sólido obtenido tras la extracción de dicha enzima con actividad peroxidasa se puede utilizar como material enriquecido en fibra para el consumo animal y/o humano, o bien como fuente para la obtención de otros bioproductos con aplicaciones sanitarias, agroalimentarias o industriales.

1. *Extracción*

Material vegetal de alcachofa, incluyendo hoja, tallo y la parte externa de la flor (brácteas) se somete a trituración y homogeneización en un medio acuoso constituido por agua o por una disolución acuosa salina, opcionalmente tamponado en un intervalo de pH comprendido entre 3,0 y 10. Adicional y opcionalmente, dicho medio acuoso puede contener uno o más aditivos seleccionados entre antioxidantes, secuestradores de fenoles, agentes quelantes de cationes, polímeros para reparto de fases, disolventes orgánicos y/o inhibidores o inactivadores de proteasas que pudieran estar presentes en los tejidos de alcachofa. El conjunto del proceso puede realizarse en un intervalo de temperatura comprendido entre 4 y 30°C. En una realización particular, a 4°C, dicho medio acuoso contiene antioxidantes, por ejemplo, ácido ascórbico, y/o secuestradores de fenoles, por ejemplo polivinilpirrolidona soluble o carbón activo, y/o agentes quelantes de cationes, por ejemplo, ácido etilendiamino-tetraacético sal disódica 2-hidrato (EDTA), polímeros para reparto de fases como polietilénglicol (PEG), dextranos, disolventes orgánicos y/o inhibidores o inactivadores de proteasas como 4-(2-aminoetilbencenosulfonil fluoruro (AEBSF), bestatina, leupeptina, trans-epoxisuccinil-L -leucilamido (4-guanidino)butano (E-64), 1,10-fenantrolina, pepstatina A, benzamidina y/o fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF).

Tras la homogeneización, la parte soluble se separa del residuo sólido por medio de cualquier técnica convencional de separación sólido-líquido, por ejemplo, por centrifugación, para obtener una primera fracción soluble (que contiene actividad peroxidasa) y un primer residuo sólido (que contiene retenido algo de actividad peroxidasa). Dicho primer residuo sólido se somete a uno o más (generalmente dos) ciclos adicionales de lavado, homogeneización en el medio acuoso previamente mencionado y separación sólido-líquido para obtener un segundo residuo sólido, que se retira, y unas segundas fracciones solubles (que contienen actividad peroxidasa). Dichas segundas fracciones solubles, si se desea, se mezclan con dicha primera fracción soluble, constituyendo el extracto crudo. Después de este proceso más del 90 % de las unidades de enzima con actividad peroxidasa se encuentra en la fracción soluble o extracto crudo (la fracción de enzima con actividad peroxidasa unida a membranas celulares constituye sólo un 10 % de la actividad total y puede ser obtenida por extracción asistida con detergentes, entre ellos los detergentes no iónicos como Triton X-100 o Triton X-114).

Si se desea, dicho extracto crudo, que comprende dicha primera fracción soluble, opcionalmente mezclada con dichas segundas fracciones solubles, se somete a un proceso de lavado, desalado y liofilización.

Por otra parte, mediante un simple lavado con agua de dicho segundo residuo sólido se obtiene un material rico en fibra y libre de biomoléculas solubles tales como carbohidratos, grasas, fenoles y proteínas, que puede ser utilizado para la fabricación de piensos compuestos para animales, como fuente de fibra en la alimentación humana o como fuente para la obtención de otros bioproductos con aplicaciones sanitarias, agroalimentarias o industriales. Adicionalmente, si se desea, dicho segundo residuo sólido lavado con agua puede ser desecado.

2. *Fraccionamiento*

En las plantas existen, además de enzimas con actividad peroxidasa, otras enzimas con actividad oxidasa que interfieren con la peroxidasa cuando ésta se pretende usar como reactivo de análisis. Una de dichas enzimas con actividad oxidasa es la polifenol oxidasa, en adelante PPO, que se encuentra ampliamente distribuida en el reino vegetal y, en concreto, en la alcachofa, donde existe una gran concentración de dicha enzima. Por tanto, la separación de PPO y enzimas con actividad peroxidasa es importante para producir fracciones útiles de estas últimas enzimas. El método propuesto en esta invención facilita la separación de dichas enzimas mediante fraccionamiento con sulfato amónico. La PPO precipita a baja concentración de sulfato amónico, mientras que la enzima con actividad peroxidasa es más estable en esa sal a las bajas concentraciones de saturación con sulfato amónico necesarias para precipitar la PPO y precipita a concentraciones más altas de saturación con sulfato amónico, una vez que se ha separado la PPO.

El extracto crudo obtenido en la etapa de extracción se somete a fraccionamiento con sulfato amónico por saturación, en primer lugar, entre 25 % y 35 %, preferentemente con 30 %, con lo que precipita una fracción que contiene la totalidad o la mayor parte de la PPO. La fracción soluble separada, que contiene actividad peroxidasa, se lleva a saturación con sulfato amónico entre 60 % y 80 %, preferentemente a 70 %, obteniéndose un precipitado que, lavado y dializado, tiene actividad peroxidasa y comprende una mezcla de isoenzimas con actividad peroxidasa que contiene más del 80 % de las unidades iniciales y está libre de PPO. El extracto obtenido se puede someter a un proceso de purificación para obtener la enzima con actividad peroxidasa purificada parcialmente o a homogeneidad, o bien dicho extracto se puede desecar o liofilizar y mantenerlo como fuente de enzima con actividad peroxidasa para ensayos que no requieran el empleo de dicha enzima con elevada pureza.

Si se desea, el extracto conteniendo la actividad peroxidasa se puede lavar, desalar y liofilizar.

3. *Purificación*

La enzima de la invención, en particular la isoenzima con actividad peroxidasa mayoritaria presente en los tallos, hojas y brácteas de alcachofa se puede purificar usando cualquier técnica convencional de purificación de proteínas, tales como diálisis, ultrafiltración, cromatografía, etc. En particular, dicha isoenzima se puede purificar parcialmente mediante técnicas cromatográficas, con lecho fijo o expandido, por ejemplo, cromatografía hidrofóbica (Phenyl Shepharose, Butyl Sepharose, Octyl Sepharose, Phenyl Superose, Alkyl Superose), cromatografía de afinidad (Concanavalina A-Sepharose), cromatografía de filtración en gel (Sephadex G- 75, G-100, G-200; Sephacryl S-100 HR, S-200 HR, S-300 HR; Superdex 200; Superose 12), cromatografía de intercambio iónico (DEAE-Celulosa; DEAE-Sepharose; Mono S; Mono Q; Source S; Source Q; CM-Sepharose) o cromatografía de reparto (Source RPC, Resource RPC). Adicionalmente, dicha isoenzima se puede purificar a homogeneidad a partir del extracto obtenido en la etapa de fraccionamiento mediante una combinación de dichas técnicas de purificación de proteínas, en particular de las técnicas cromatográficas (véanse los Ejemplos 1.3 y 2).

En una realización particular, como dicha isoenzima es una glicoproteína y tiene carácter catiónico, para purificarla a homogeneidad, la cromatografía de intercambio canónico se realiza a un pH comprendido entre 4,0 y 6,0, preferentemente a pH 5,0.

En general, todas las tracciones o extractos con actividad peroxidasa obtenidos en cualquier etapa del procedimiento de obtención de la enzima de la invención pueden ser sometidas a un proceso de lavado, desalado y liofilización.

La enzima de la invención puede ser sometida a inmovilización 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. El carácter glicoproteico de la enzima de la invención facilita su anclaje a múltiples polímeros comerciales usados como soportes de inmovilización, como por ejemplo la magnetita o la concanavalina-A. Este hecho supone una ventaja respecto a otras peroxidasas no glicosiladas a la hora de su aplicación biotecnológica. En todo caso, el biorreactor podría estar acoplado a sistemas de filtración, afinidad, interacción hidrofóbica, intercambio iónico, quelatación o reparto.

La enzima de la invención tiene una estructura y actividad similar a la peroxidasa de la raíz del rábano picante, y puede utilizarse en cualquier aplicación propia de las enzimas con actividad peroxidasa tal como se recoge en el esquema mostrado en la Figura 5.

Así, una aplicación general de la enzima de la invención es su empleo en la oxidación de sustratos reductores.

La enzima de la invención puede utilizarse, de manera soluble o inmovilizada, en Biomedicina, por ejemplo, en bioquímica clínica, citoquímica, inmunoquímica e investigación, como reactivo clínico o de diagnóstico, por ejemplo, en ensayos para la determinación y cuantificación de metabolitos tales como glucosa, ácido úrico, colesterol o triglicéridos en fluidos biológicos, y como enzima marcadora en inmunoensayos, por ejemplo, para la detección de virus.

La enzima de la invención también puede utilizarse en aplicaciones industriales, por ejemplo, como biocatalizadores para la obtención de productos de interés biotecnológico e industrial, por ejemplo, resinas fenólicas, adhesivos, antioxidantes, antiestáticos y protectores de radiación magnética, colorantes alimentarios y componentes bioactivos de detergentes.

La enzima de la invención también puede utilizarse en aplicaciones medioambientales, por ejemplo, en el blanqueamiento del papel durante su reciclaje y en el tratamiento de residuos líquidos o suelos contaminados con fenoles, aminas aromáticas, compuestos clorados y/o metales pesados.

La enzima de la invención también puede utilizarse en la elaboración de biosensores para la detección de, por ejemplo, peróxidos, monofenoles, difenoles y polifenoles.

La invención, en la medida en que puede valorizar un desecho de la industria conservera, tiene interés, además, para las Cooperativas Agrarias y para la industria de transformación de la alcachofa ya que supone una salida comercial de un residuo industrial poco utilizado.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma. En los Ejemplos 1 y 2 se describe el aislamiento y purificación a homogeneidad de una isoenzima con actividad peroxidasa mayoritaria en las brácteas de alcachofa, mientras que en el Ejemplo 3 se caracteriza dicha isoenzima.

Ejemplo 1

Obtención de una enzima con actividad peroxidasa aislada de alcachofa

1.1 *Extracción*

150 gramos de brácteas de alcachofa se congelaron en nitrógeno liquido para favorecer la trituración y homogeneización de este material rico en fibra. La homogeneización se realizó en tampón acetato 50 mM pH 4,5 conteniendo ácido ascórbico 30 mM, cloruro sódico 1 M, 1 % (p/v) de polivinilpirrolidona soluble y ácido etilendiaminotetra-acético sal disódica 2-hidrato (EDTA) 10 mM. El tampón de extracción contenía los siguientes inhibidores de proteasas: pepstatina A (0,005 mM), 1,10-fenantrolina (1 mM), PMSF (0,1 mM) y benzamidina (1 mM).

Después de homogeneizar, la parte soluble se separó del residuo sólido por centrifugación (9.000 r.p.m. durante 30 minutos). El residuo sólido se sometió a dos ciclos más de lavado, homogeneización y centrifugación en las disoluciones anteriores. Los sobrenadantes de estas fracciones se juntaron constituyendo el extracto crudo.

1.2 *Fraccionamiento*

El extracto crudo obtenido en la etapa anterior (Ejemplo 1.1) se llevó al 30 % de saturación con sulfato amónico. Después de 1 hora en agitación a 4°C, el extracto se centrifugó a 35.000 r.p.m. durante 30 minutos y el precipitado, carente de actividad peroxidasa, fue desechado. El sobrenadante se llevó al 70 % de saturación con sulfato amónico y se dejó 1 hora en agitación a 4°C. Después de centrifugar a 35.000 r.p.m. durante 30 minutos el precipitado se guardó como fuente de enzima con actividad peroxidasa. Este precipitado se disolvió en tampón acetato 20 mM pH 4,5 conteniendo cloruro sódico 1 M. La disolución resultante se dializó frente al mismo tampón, pero sin cloruro sádico, a 4°C durante toda la noche. Este extracto consiste en una mezcla de isoenzimas con actividad peroxidasa que contiene el 80 % de las unidades iniciales.

1.3 *Purificación a homogeneidad*

A partir del extracto obtenido en la etapa anterior (Ejemplo 1.2) se aisló una enzima con actividad peroxidasa, con un elevado grado de pureza, mediante un protocolo que comprende las siguientes etapas:

1.3.1 *Etapa 1*

Cromatografía hidrofóbica en Phenyl-Shepharose CL-4B

Esta resina cromatográfica fue obtenida de Pharmacia LKB, y equilibrada con tampón fosfato 50 mM pH 7,0 conteniendo sulfato amónico 1,5 M. Las disoluciones ricas en peroxidasa obtenidas en la etapa anterior se dializaron toda la noche frente a 2 litros de este mismo tampón. Aproximadamente 1 ml de resina fue usada por cada 3 mg de proteína. Después de aplicar la muestra a una velocidad de 2 ml/minuto, la columna hidrofóbica se eluyó a la misma velocidad con un gradiente por etapas de sulfato amónico de 1,5 M y 0,4 M en tampón fosfato 50 mM pH 7,0, seguido por agua y 50 % de polietilenglicol. Se recogieron fracciones de 7 ml y se ensayaron frente a su actividad peroxidasa y concentración de proteínas. Las fracciones mayoritarias conteniendo actividad peroxidasa eluyeron con el sulfato amónico 0,4 M, se juntaron y se concentraron en una membrana de microfiltración con un diámetro de poro de 10.000 daltones. Posteriormente, esta disolución se dializó durante toda la noche a 4°C frente a 2 litros de tampón acetato 20 mM pH 5,0.

1.3.2 *Etapa 2*

Cromatografía de filtración en gel Sephacryl S-300

Esta columna fue obtenida de Pharmacia LKB, acoplada a un sistema de FPLC (ÄKTA Explorer 100 de Pharmacia) y equilibrada con tampón acetato 20 mM pH 5,0. Se aplicaron 2 ml de la muestra a una velocidad de 1 ml/minuto y se recogieron fracciones de 5 ml que se ensayaron frente a su actividad peroxidasa. Las fracciones mayoritarias con actividad peroxidasa fluyeron en un pico comprendido entre 38.000 y 46.000 daltones de peso molecular. Estas fracciones fueron unidas y usadas para la siguiente etapa de purificación.

1.3.3 *Etapa 3*

Cromatografía de intercambio canónico Resource S

Esta columna fue obtenida de Pharmacia LKB, acoplada a un sistema de FPLC (KTA Explorer 100 de Pharmacia) y equilibrada con tampón acetato 20 mM pH 5,0. Después de aplicar la muestra a una velocidad de 2 ml/minuto se aplicó un gradiente lineal desde 0 hasta 0,3 M de cloruro sódico en el mismo tampón y se recogieron fracciones de 0,5 ml. Un solo pico de actividad peroxidasa eluyó a 0,14 M de cloruro sódico. La elución de esta peroxidasa se detectó por el incremento de absorbancia a 404 nm (absorbancia debida al grupo hemo) y su actividad se determinó usando ABTS como sustrato. Las fracciones que mostraban actividad peroxidasa se unieron, se desalaron y se liofilizaron. El espectro de absorción de esta enzima con actividad peroxidasa se muestra en la Figura 1.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1, donde se aprecia el alto rendimiento proporcionado por el método de aislamiento y purificación propuesto por esta invención. Además, se observa que partiendo de una pequeña cantidad de material vegetal (150 gramos) se pueden obtener hasta 0,5 mg de una enzima pura a homogeneidad y con elevada actividad específica. Extrapolando estos datos a gran escala supondría la obtención de una gran cantidad de peroxidasa de un material desechable y económico. Además, dependiendo del grado de pureza que se requiera, los pasos de purificación podrían ser reducidos con el correspondiente ahorro económico.

TABLA 1

Purificación de una enzima con actividad peroxidasa aislada de alcachofa

	Volumen (ml)	Peroxidasa (U/ml)	Unidades totales (U)	Proteína (mg/ml)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación
Extracto crudo	230	13,7	3151	4,4	1000	3,2	1,0
Sobrenadante 30 % sulfato amónico	230	14,3	3289	1,1	246	13,4	4,2
Precipitado 70 % sulfato amónico	20	128	2560	9,7	194	13,2	4,2
Diálisis	22	111	2442	8,7	194	12,6	4,0
Phenyl-Sepharose CL-4B	100	6,4	640	0,19	19	33,7	10,7
Sephacryl S-300	44	7,6	334,4	0,07	3,1	108	35
Resource S	3	29,7	89	1,5	0,5	178	56

Ejemplo 2

Purificación a homogeneidad de una enzima con actividad peroxidasa aislada de alcachofa

En este ejemplo se describe otro método para obtener una enzima con actividad peroxidasa pura pero utilizando etapas cromatográficas alternativas.

2.1 *Etapa 1*

Cromatografía en DEAE-Celulosa

Este intercambiador aniónico fue obtenido de Sigma, empaquetado en una columna y equilibrado con tampón Tris-HCl 20 mM pH 8,5. El extracto rico en peroxidasa obtenido en la fase de extracción se inyectó en dicha columna y fue eluido a una velocidad de 2 ml/minuto con un gradiente por etapas de tampón anterior libre de cloruro sódico, 0,1 M y 0,2 M de cloruro sódico en tampón Tris-HCl 20 mM pH 8,5. Se utilizó aproximadamente 1 ml de resina por cada 3 mg de proteína. Se recogieron fracciones de 7 ml y se ensayaron frente a su actividad peroxidasa y concentración de proteínas. Las fracciones mayoritarias conteniendo actividad peroxidasa fluyeron en las fracciones no unidas a la resina (tampón sin cloruro sódico), se juntaron y se concentraron en una membrana de microfiltración con un diámetro de poro de 10.000 dalton. Posteriormente, esta disolución se dializó durante toda la noche a 4°C frente a 2 litros de tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,5 conteniendo cloruro sódico 1 M y cloruro de magnesio 50 mM.

2.2 *Etapa 2*

Cromatografía de afinidad en Concanavalina A-Shepharose

Esta columna fue obtenida de Pharmacia LKB, acoplada a un sistema de FPLC (ÄKTA Explorer 1 00 de Pharmacia) y equilibrada con tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,5 conteniendo cloruro sódico 1 M y cloruro de magnesio 50 mM. Después de aplicar la muestra a una velocidad de 0,5 ml/minuto, la columna se eluyó con un gradiente lineal desde o hasta 0,5 M de metil-α-D-manopiranósido en el mismo tampón y se recogieron fracciones de 1 ml. La elución de esta enzima con actividad peroxidasa se detectó por el incremento de absorbancia a 404 nm (absorbancia debida al grupo hemo) y su actividad se determinó usando ABTS como sustrato. Las fracciones que mostraban actividad peroxidasa fueron unidas y dializadas durante toda la noche a 4°C frente a 2 litros de tampón acetato 20 mM pH 5,4.

2.3 *Etapa 3*

Cromatografía de intercambio catiónico Resource S

Esta etapa cromatográfica se realizó como en el Ejemplo 1.3.3 y el rendimiento fue similar al observado en la Tabla 1.

Ejemplo 3

Caracterización de la isoenzima con actividad peroxidasa mayoritaria en brácteas de alcachofa

3.1 *Pureza de las disoluciones de enzima con actividad peroxidasa aislada de alcachofa y purificada a homogeneidad*

El espectro de absorción visible-UV de la isoenzima mayoritaria con actividad peroxidasa aislada de brácteas de alcachofa y purificada a homogeneidad mediante el procedimiento descrito en cualquiera de los Ejemplos 1 ó 2 se muestra en la Figura 1.

En enzimas con actividad peroxidasa, el cociente entre la absorbancia alrededor de 400 nm (debida al grupo hemo) y 280 nm (debida a la proteína) se conoce como Rz y es una indicación de la pureza de la muestra de enzima con actividad peroxidasa. Así, se consideran puras aquéllas muestras de enzimas con actividad peroxidasa con un Rz comprendido entre 3,0 y 3,6. El Rz de la proteína obtenida mediante el procedimiento de purificación a homogeneidad de la presente invención (Ejemplos 1 ó 2) es de 3,4, lo que indica un alto grado de pureza.

Además, esa elevada pureza también se observó mediante técnicas de electroforesis sobre geles de poliacrilamida en condiciones no disociantes (PAGE) y disociantes en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). De hecho, las disoluciones de enzima con actividad peroxidasa purificada mostraban una sola banda electroforética (PAGE y SDS-PAGE) con un peso molecular de aproximadamente 42.000 daltones (SDS-PAGE). Estos resultados también confirmaban la naturaleza monomérica de dicha enzima.

3.2 *Actividad enzimática*

La enzima con actividad peroxidasa aislada de alcachofa, proporcionada por esta invención, cataliza la oxidación de varios compuestos en presencia de peróxido de hidrógeno. La actividad de esta peroxidasa puede ser determinada por el método que se describe a continuación, en el que el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), por ejemplo, es el sustrato reductor.

En primer lugar, 0,1 ml de ABTS 10 mM, 0,1 ml de peróxido de hidrógeno 5 mM y 0,2 ml de tampón fosfato-citrato 50 mM pH 4,7 fueron llevados a un volumen final de reacción de 0,95 ml, Después de atemperar la reacción a 25°C, se añadieron 0,05 ml de la disolución enzimática y la reacción fue seguida a 414 nm en un espectrofotómetro convencional durante 5 minutos. La actividad enzimática fue calculada considerando un coeficiente de extinción molar de 31.100 $M^{-1}cm^{-1}$ para el catión radical del, ABTS (producto de la reacción), Una unidad (U) de actividad peroxidasa es la cantidad de enzima que oxida 1 micromol de ABTS por minuto. La concentración de proteína (mg/ml) fue determinada con el método de Bradford. La combinación de ambas técnicas permitió calcular los importantes valores de actividad específica (U/mg) de la enzima con actividad peroxidasa proporcionada por esta invención.

3.3 *Especificidad por el sustrato reductor*

Una forma de distinguir entre las diferentes clases de peroxidasas es comparar sus actividades frente a guayacol y ácido ascórbico.

La enzima proporcionada por esta invención es capaz de oxidar guayacol a alta velocidad pero no mostró actividad frente al ácido ascórbico, lo que demuestra que la isoenzima mayoritaria en brácteas de alcachofa no es una ascorbato peroxidasa. Además, mostraba una alta velocidad de catálisis con sustratos reductores como el ABTS, fenol, pirogalol, catecol, 4 -metilcatecol, 4-terc-butilcatecol, 4-hidroxianisol, p-cresol, p -cloro-fenol o 4-amino-antipirina, por lo que puede ser usada como enzima acoplada en ensayos de determinación de metabolitos que incluyan alguno de estos sustratos reductores. Los ensayos se realizaron siguiendo el protocolo descrito en el Ejemplo 3.2 pero utilizando en cada caso el sustrato reductor a ensayar.

3.4 *pH óptimo*

El intervalo de pH óptimo al cual esta enzima con actividad peroxidasa muestra su máxima actividad fue examinado usando el mismo medio de reacción que el utilizado en el Ejemplo 3.2 pero sustituyendo el sustrato reductor ABTS por guayacol y utilizando diferentes tampones para los diferentes intervalos de pH:

tampón acetato 30 mM para pH 3,5-5,5;

tampón fosfato 30 mM para pH 5,5-8,0;

tampón Tris-HCl 30 mM para pH 7,5-9,0; y

tampón glicina 30 mM para pH 8,5-9,0.

Los resultados se muestran en la Figura 2.

3.5 *Temperatura óptima*

La actividad de esta enzima con actividad peroxidasa se midió en un intervalo de temperatura comprendido entre 10°C y 90°C y los resultados se muestran en la Figura 3.

3.6 *Estabilidad térmica*

Se prepararon unas muestras añadiendo 0,1 ml de la disolución enzimática a 1,8 ml de agua destilada previamente calentada a temperaturas comprendidas entre 10°C y 90°C. A cada temperatura y cada 5 minutos, se retiraron alícuotas de 0,05 ml de la disolución enzimática que se utilizaron en ensayos de actividad enzimática siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 3.2. La Figura 4 muestra la estabilidad de esta enzima a su temperatura óptima.

3.7 *Otras propiedades*

La enzima con actividad peroxidasa es una isoenzima básica o catiónica con un pI > 9,5. Además, se encuentra glicosilada como lo pone de manifiesto su unión específica a concanavalina -A. Así, cuando 800 U de dicha enzima se incubaron 1 hora con 1 ml de Shepharose unida a concanavalina-A a 4°C, el 99,9 % de la actividad fue retenida por este soporte. Por tanto, esta unión especifica puede ser utilizada como una etapa alternativa de purificación.

REIVINDICACIONES

1. Una enzima con actividad peroxidasa **caracterizada** porque es obtenible a partir de alcachofa (*Cynara scolymus*, L.).

2. Enzima según la reivindicación 1, **caracterizada** porque es una proteína glicosilada.

3. Enzima según la reivindicación 1, **caracterizada** porque no es una ascorbato peroxidasa.

4. Enzima según la reivindicación 1, **caracterizada** porque tiene un peso molecular de aproximadamente 42.000 dalton, determinado por electroforesis.

5. Enzima según la reivindicación 1, **caracterizada** porque tiene un punto isoeléctrico mayor de 9,5 aproximadamente.

6. Enzima según la reivindicación 1, **caracterizada** porque tiene una actividad superior al 40 % entre pH 3,5 y 7 aproximadamente.

7. Enzima según la reivindicación 6, **caracterizada** porque tiene un pH óptimo a 4,5 aproximadamente.

8. Enzima según la reivindicación 1, **caracterizada** porque tiene una actividad relativa superior al 40 % entre 40°C y 85°C aproximadamente.

9. Enzima según la reivindicación 8, **caracterizada** porque tiene una temperatura óptima a aproximadamente 70°C.

10. Un procedimiento para la obtención de una enzima con actividad peroxidasa según la reivindicación 1, que comprende la extracción de dicha enzima con actividad peroxidasa a partir de tejidos de alcachofa, la separación de dicha enzima de otras enzimas con actividad oxidasa eventualmente presentes en el material vegetal, y, opcionalmente, la purificación parcial o a homogeneidad de dicha enzima con actividad peroxidasa.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que dichos tejidos de alcachofa comprenden tallos, hojas y brácteas de alcachofa.

12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que dichos tallos, hojas y brácteas de alcachofa forman parte de los desechos de alcachofa generados por la industria conservera de alcachofas.

13. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la extracción de dicha enzima se efectúa mediante homogeneización de dichos tejidos de alcachofa en un medio acuoso, en un intervalo de temperatura comprendido entre 4 y 30°C.

14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que dicho medio acuoso está constituido por agua o por una disolución acuosa salina, opcionalmente tamponado en un intervalo de pH comprendido entre 3,0 y 10.

15. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que dicho medio acuoso comprende, además, uno o más aditivos seleccionados entre antioxidantes, secuestradores de fenoles, agentes quelantes de cationes, polímeros para reparto de fases, disolventes orgánicos y/o inhibidores o inactivadores de proteasas y sus mezclas.

16. Procedimiento según la reivindicación 13, que comprende la trituración de dichos tejidos de alcachofa previa a la homogeneización de los mismos.

17. Procedimiento según la reivindicación 13, que comprende la separación, tras la homogeneización, de la parte soluble del residuo sólido, mediante un proceso de separación sólido-líquido convencional, para obtener una primera tracción soluble y un primer residuo sólido.

18. Procedimiento según la reivindicación 17, en el que dicha separación sólido-líquido se realiza por centrifugación.

19. Procedimiento según la reivindicación 17, en el que dicho primer residuo sólido se somete a uno o más ciclos adicionales de lavado, homogeneización en medio acuoso y separación sólido-liquido, para obtener un segundo residuo sólido y unas segundas fracciones solubles que, opcionalmente se mezclan con dicha primera fracción soluble y constituyen un extracto crudo con actividad peroxidasa.

20. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 17 ó 19, en el que dicha primera fracción soluble, opcionalmente mezclada con dichas segundas fracciones solubles, se someten a un proceso de lavado, desalado y liofilización.

21. Procedimiento según la reivindicación 19, en el, que dicho segundo residuo sólido se somete a un lavado con agua para obtener un material rico en fibra y libre de biomoléculas solubles, adecuado para la fabricación de piensos compuestos para animales, como fuente de fibra en la alimentación humana o como fuente para la obtención de otros bioproductos con aplicaciones sanitarias, agroalimentarias o industriales.

22. Procedimiento según la reivindicación 21, que comprende, además, desecar dicho segundo residuo sólido lavado con agua.

23. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que dichas enzimas con actividad oxidasa eventualmente presentes en el material vegetal comprenden la polifenol oxidasa.

24. Procedimiento según la. reivindicación 23, en el que la separación de la enzima con actividad peroxidasa de la polifenol oxidasa se realiza por fraccionamiento con sulfato amónico.

25. Procedimiento según la reivindicación 24, en el que la separación de la polifenol oxidasa se realiza por precipitación con sulfato amónico por saturación, entre 25 % y 35 %.

26. Procedimiento según la reivindicación 25, en el que la separación de la polifenol oxidasa se realiza por precipitación con sulfato amónico por saturación con 30 %.

27. Procedimiento según la reivindicación 24, en el que la separación de la enzima con actividad peroxidasa de la polifenol oxidasa se realiza, una vez separada dicha polifenol oxidasa, por precipitación con sulfato amónico por saturación entre 60 % y 80 %.

28. Procedimiento según la reivindicación 27, en el que la separación de la enzima con actividad peroxidasa de la polifenol oxidasa se realiza, una vez separada dicha polifenol oxidasa, por precipitación con sulfato amónico por saturación con 70 %.

29. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 27 ó 28, que comprende desecar o liofilizar el extracto resultante y mantenerlo como fuente de enzima con actividad peroxidasa para ensayos que no requieran el empleo de dicha enzima con elevada pureza.

30. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 27 ó 28, que comprende lavar, desalar y liofilizar el extracto resultante y mantenerlo como fuente de enzima con actividad peroxidasa.

31. Procedimiento según la reivindicación 10, que comprende la purificación total o parcial de dicha enzima con actividad peroxidasa mediante el empleo de una o más técnicas convencionales de purificación de proteínas.

32. Procedimiento según la reivindicación 31, que comprende la purificación parcial de dicha enzima con actividad peroxidasa mediante técnicas cromatográficas, con lecho fijo o expandido, seleccionadas entre cromatografía hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de reparto.

33. Procedimiento según la reivindicación 32, en el que la purificación parcial de dicha enzima con actividad peroxidasa se realiza mediante cromatografía de afinidad en una columna de Concanavalina A-Sepharose.

34. Procedimiento según la reivindicación 32, en el que la purificación parcial de dicha enzima con actividad peroxidasa se realiza mediante cromatografía de intercambio catiónico a un pH comprendido entre 4,0 y 6,0.

35. Procedimiento según la reivindicación 34, en el que la cromatografía de intercambio catiónico se realiza a un pH de 5,0.

36. Procedimiento según la reivindicación 31, que comprende la purificación a homogeneidad de dicha enzima con actividad peroxidasa mediante una combinación de dos o más técnicas cromatográficas mencionadas en cualquiera de las reivindicaciones 32 a 35.

37. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 36, que comprende lavar, desalar y liofilizar las fracciones con actividad peroxidasa.

38. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 37, que comprende la inmovilización de las fracciones con actividad peroxidasa mediante enlace a un soporte sólido, atrapamiento en geles, encapsulación en vesículas, entrecruzamiento de moléculas de enzima y confinamiento en biorreactores de membranas

39. Procedimiento según la reivindicación 38, en el que el enlace a un soporte sólido se realiza sobre magnetita o concanavalina-A.

40. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 29 a 39, en el que el biorreactor que comprende la enzima soluble o inmovilizada está acoplado a un sistema de filtración, afinidad, interacción hidrofóbica, intercambio iónico, quelatación o reparto.

41. Empleo de una enzima con actividad peroxidasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la oxidación de sustratos reductores.

42. Empleo de una enzima con actividad peroxidasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, como reactivo clínico o de diagnóstico, para la determinación y cuantificación de metabolitos.

43. Empleo de una enzima con actividad peroxidasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, como enzima marcadora en inmunoensayos.

44. Empleo de una enzima con actividad peroxidasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, como biocatalizador para la obtención de productos de interés biotecnológico e industrial.

45. Empleo de una enzima con actividad peroxidasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el blanqueamiento del papel durante su reciclaje.

46. Empleo de una enzima con actividad peroxidasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el tratamiento de residuos líquidos o suelos contaminados con fenoles, aminas aromáticas, compuestos clorados y/o metales pesados.

47. Empleo de una enzima con actividad peroxidasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la elaboración de biosensores para la detección de peróxidos y mono-, di- o polifenoles.

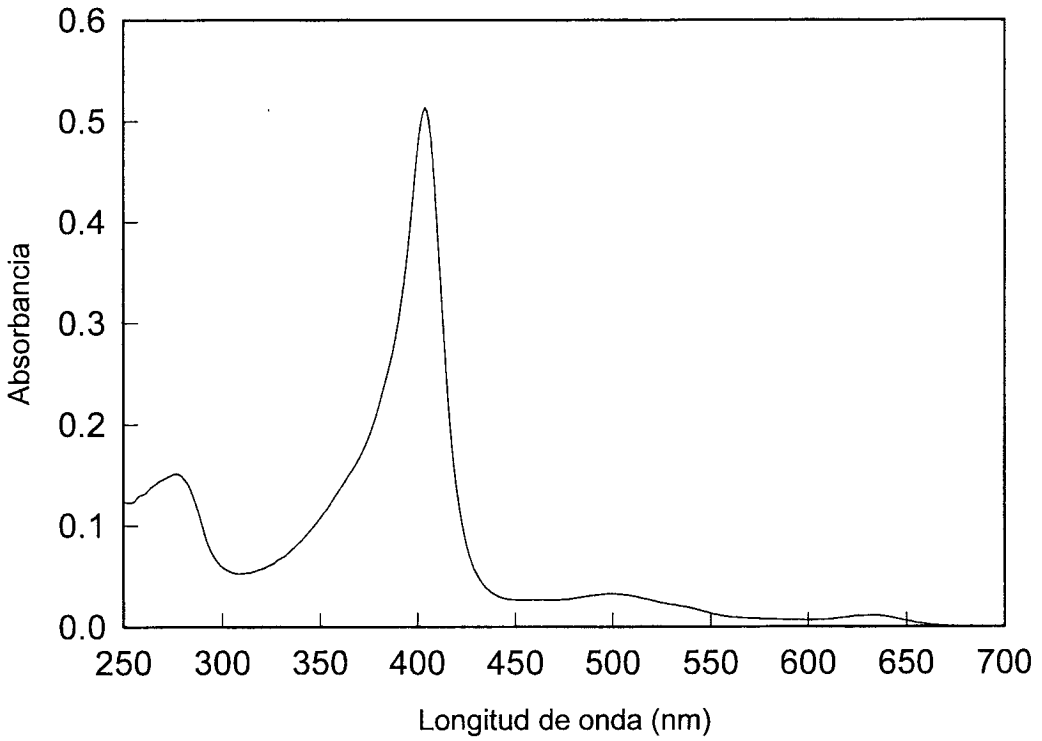
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Absorbancia
250
300
350
400
450
500
550
600
650
700
Longitud de onda (nm)

FIGURA 1

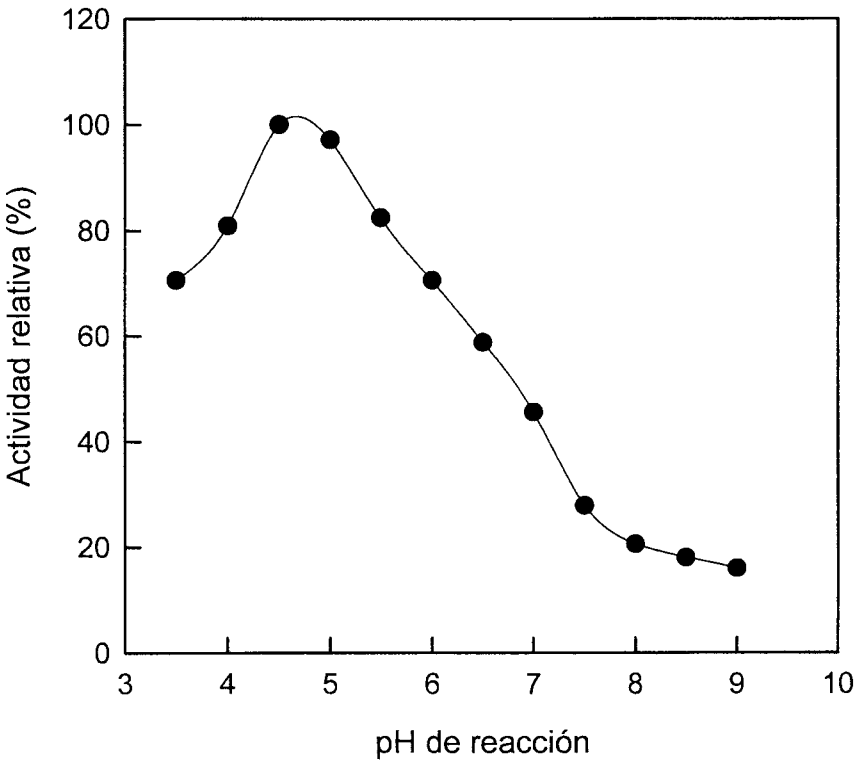
120
100
80
60
40
20
0
Actividad relativa (%)
3
4
5
6
7
8
9
10
pH de reacción

FIGURA 2

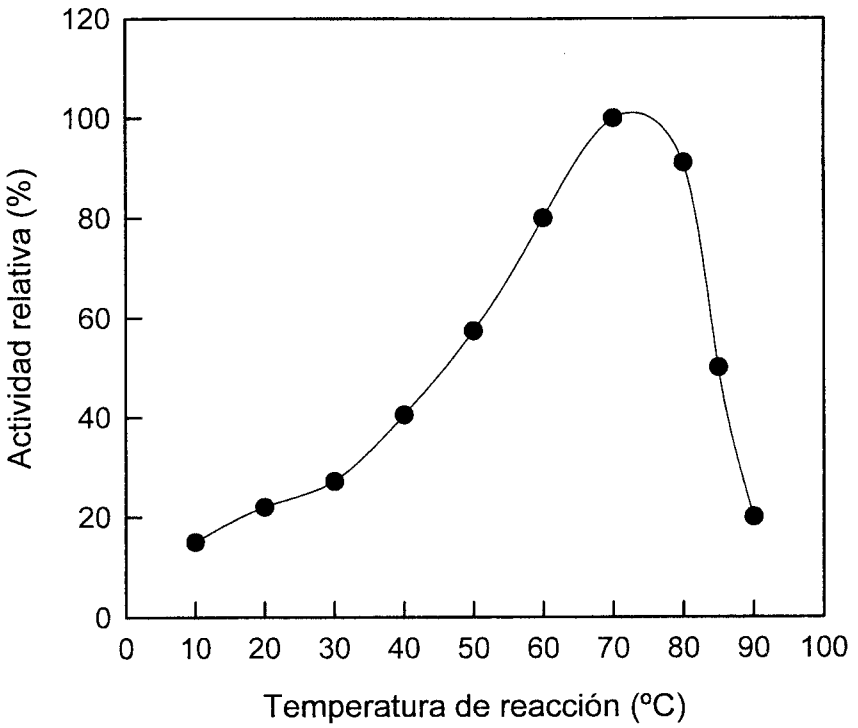
120
100
80
60
40
20
0
Actividad relativa (%)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
Temperatura de reacción (ºC)

FIGURA 3

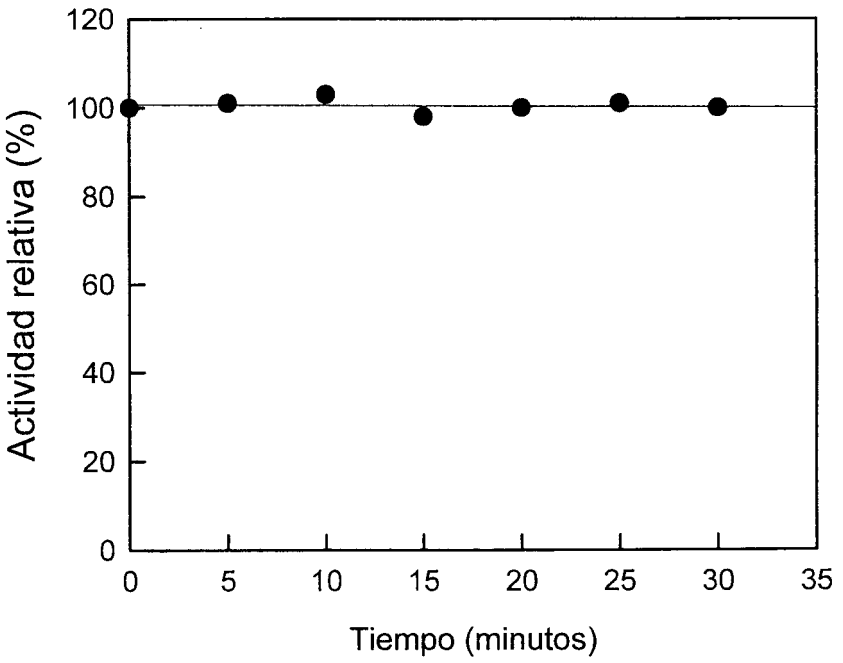
120
100
80
60
40
20
0
Actividad relativa (%)
0
5
10
15
20
25
30
35
Tiempo (minutos)

FIGURA 4

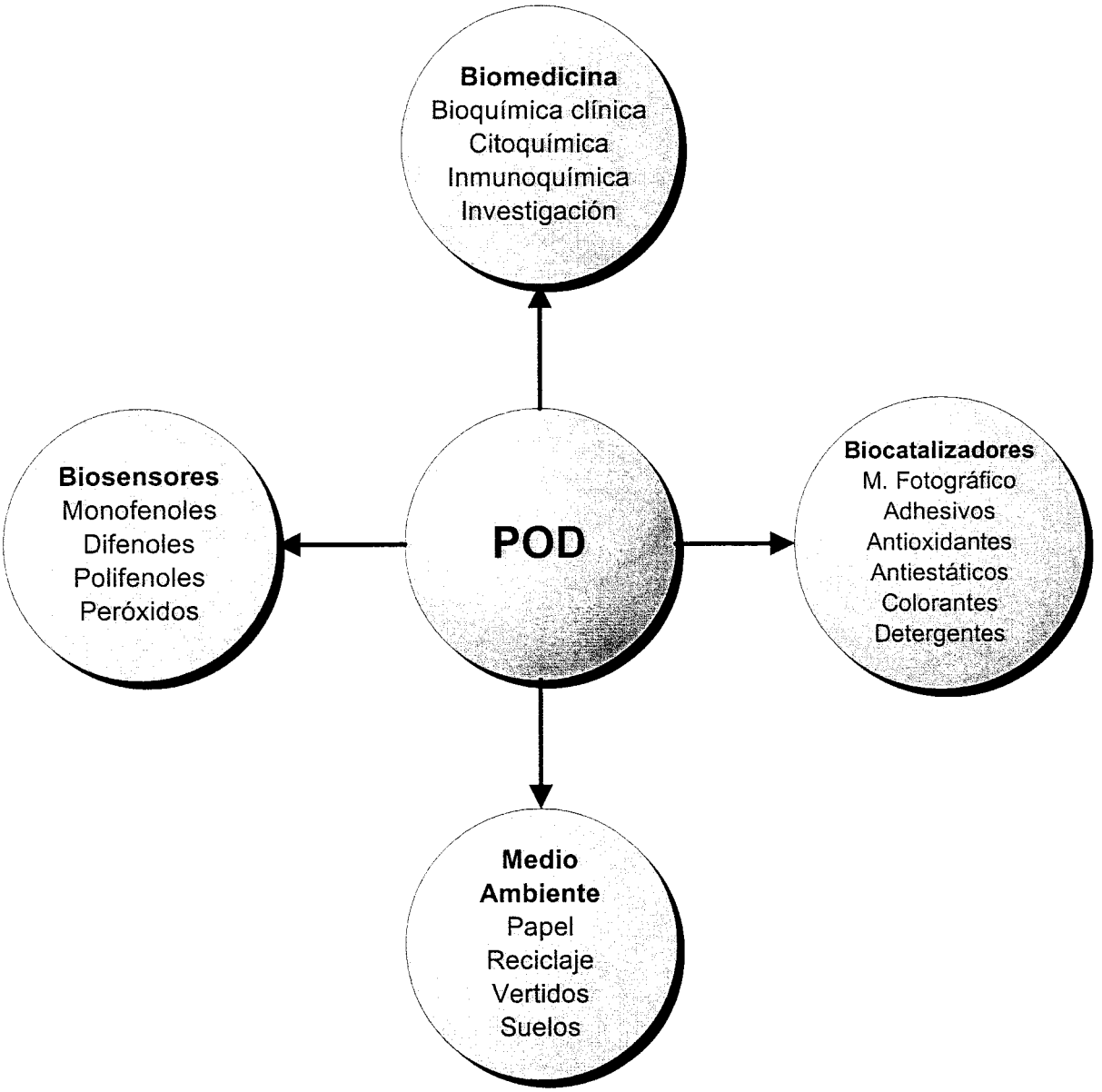
Biomedicina
Bioquímica clínica
Citoquímica
Inmunoquímica
Investigación
Biosensores
Monofenoles
Difenoles
Polifenoles
Peróxidos
POD
Biocatalizadores
M. Fotográfico
Adhesivos
Antioxidantes
Antiestáticos
Colorantes
Detergentes
Medio Ambiente
Papel
Reciclaje
Vertidos
Suelos

FIGURA 5

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 167 278

(21) N.° solicitud: 200002553

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **24.10.2000**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl.**[7]**:** C12N 9/08, 9/02

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X A Y	KANEL, M.Y.; GHAZY, A.M. Peroxidases of Cynara scolymus (global artichoke) leaves. Purification and properties. 1973. Acta Biol. Med. Ger., 31 (1), 39-49.	1 10-40 41-47
Y	EP 517327 A2 (EASTMAN KODAK COMPANY) 09.12.1992	42-43
Y	US 5508180 A (JOHNSON et al.) 16.04.1996	41,44
Y	EP 744466 A2 (CO.RI.AL. SCPA) 27.11.1996	42,47
Y	US 5178762 A (POKORA et al.) 12.01.1993	46
Y	WO 9855629 A2 (INDIANA CROP IMPROVEMENT ASSOCIATION) 10.12.1998	45

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 n°:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
04.01.2002	M. Hernández Cuéllar	1/1