



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 N.º de publicación: **ES 2 083 326**

21 Número de solicitud: 9400476

51 Int. Cl.⁶: C12Q 1/61

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **08.03.94**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.96**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.04.96

71 Solicitante/s: **Universidad de Murcia**
Avda. Teniente Flomesta s/n
Edificio Rectorado
30071 Murcia, ES

72 Inventor/es: **Sanchez Ferrer, Alvaro;**
Perez Gilabert, Manuela;
Bru Martínez, Roque y
García Carmona, Francisco

74 Agente: **Ungría López, Javier**

54 Título: **Método de purificación de 5-lipoxigenasa de patata por partición de fases en el detergente no iónico Triton X-114.**

57 Resumen:

Método de purificación de 5-lipoxigenasa de patata por partición de fases en el detergente no iónico Triton X-114.

Comprende (a) homogeneizar tubérculos de patata en una mezcla de tampón acetato, EDTA y Triton X-114, filtrar y centrifugar para obtener un extracto crudo; (b) someter el extracto crudo a una partición de fases inducida por la temperatura con más Triton X-114; (c) someter el sobrenadante claro conteniendo la lipoxigenasa a precipitación fraccionada con sulfato amónico.

La 5-lipoxigenasa de patata tiene utilidad como modelo para estudiar el comportamiento de la 5-lipoxigenasa humana, implicada en los fenómenos de inflamación y asma.

ES 2 083 326 A1

DESCRIPCION

Método de purificación de 5-lipoxigenasa de patata por partición de fases en el detergente no iónico Triton X-114

Campo técnico de la invención

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de la purificación de 5-lipoxigenasas, las cuales están implicadas en fenómenos de inflamación y asma.

Más concretamente, la presente invención se refiere a un método de purificación de 5-lipoxigenasa de patata, enzima de similares características a las de la 5-lipoxigenasa humana, mediante separación de fases inducida por la temperatura en el detergente no iónico Triton X-114.

Estado de la técnica anterior a la invención

Lipoxigenasas son un grupo de enzimas muy relacionadas, que aparecen ampliamente distribuidas en tejidos animales y vegetales [(1) H. Kühn, T. Schewe y S.M. Rapoport, (1986) The stereochemistry of the reactions of lipoxygenases and their metabolites. Proposed nomenclature of lipoxygenases and related enzymes. *Adv. Enzymol.* 58, 274-311]. Estas enzimas catalizan la dioxigenación de los ácidos grasos poliinsaturados que contienen una configuración cis, cis-1,4-pentadieno a su correspondiente hidropéroxido. La nomenclatura de lipoxigenasas está basada en el sitio de inserción del oxígeno molecular en la molécula de ácido graso, tomando generalmente como referencia el ácido araquidónico. Según este criterio, estas enzimas, que están presentes tanto en animales como en plantas [(2) S.M. Rapoport, T. Schewe y H. Kühn, (1986) *Enzymology and physiology of reticulocyte lipoxygenase: comparison with other lipoxygenases.* *Adv Enzymol.* 58, 191-271], se clasifican como 5-, 12- y 15- lipoxigenasas. La lipoxigenasa con mayor importancia fisiológica y objeto de un gran interés en los últimos años, es 5-lipoxigenasa, que cataliza el primer paso de la ruta de síntesis de leucotrienos [(3) B. Samuelsson, S.E. Dahlen, J.A. Lindgren, C.A. Rouzer y C.N. Seragam (1987) *Leukotrienes and lipoxins: Structures, biosynthesis and biological effects.* *Science* 237, 1171 -1176]. Estos compuestos son considerados como hormonas locales sintetizadas por las células como respuesta a un estímulo local y están implicados en fenómenos de inflamación y asma. [(4) C.A. Rouzer, T. Matsumoto y B. Samuelsson (1986). *Single protein from human leukocytes possesses 5-lipoxygenase and leukotriene A₄ synthase activities.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 857-861]. La 5-lipoxigenasa ha sido purificada de un gran número de células animales [(4) y (5) N. Ueda, S. Kaneko, T. Yoshimoto y S. Yamamoto, (1986). *Purification of arachidonate 5-lipoxygenase from porcine leukocytes and its reactivity with hydroperoxyeicosatetraenoic acids.* *J. Biol. Chem.* 261, 7982-7988] y vegetales [(6) H.D. Berkeley y T. Galliard, (1976). *Substrate specificity of potato lipoxygenase* *Phytochemistry*, 15, 1481-1484]. La enzima purificada de mamíferos requiere Ca²⁺ y ATP para que exprese su máxima actividad, es bastante inestable y no puede ser purificada en gran cantidad [(4)]. Por esto, cuando se requiere en grandes cantidades para estudios mecanísticos, de inhibidores o de síntesis de leucotrienos [(7) P. Reddanna, J. Whelan, K.R. Maddipati, and C. Channa Reddy (1990). *Purification of arachidonate 5-lipoxygenase from potato tubers.* *Methods in Enzymology* 187. 268-277], se suele recurrir a su purificación a partir de tubérculo de patata. Se han descrito varios métodos para la purificación de 5-lipoxigenasa de patata, pero todos ellos requieren la incorporación de una gran cantidad de agentes reductores (ascórbico, metabisulfito, etc.) con el fin de evitar el instantáneo pardeamiento del extracto [(7) y (8) E. Mulliez, J.P. Leblanc, J.J. Gired, M. Rigaud y J.C. Chottard, (1987) *5-Lipoxygenase from potato tubers. Improved purification and physicochemical characteristics.* *Biochim. et. Biophys. Acta* 916, 13-23]. Además la presencia de altos niveles de ácido α -linolénico en el extracto crudo hace que la enzima se inactivo por efecto del hidropéroxido producido durante la purificación [(7)].

El procedimiento de purificación, objeto de esta patente, resuelve estos dos problemas mediante la utilización del detergente no iónico Triton X-114 para la extracción de lipoxigenasa de patata., La posterior purificación de lipoxigenasa se hace utilizando la propiedad singular del Triton X-114 (TX-114) de separarse en dos fases en equilibrio, cuando aumenta la temperatura de la disolución [(9) C. Bordier. (1981) *Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution.* *J. Biol. Chem.* 256, 1604-1607]. Así, TX-114 forma disoluciones transparentes a 4°C, que se enturbian a temperaturas superiores a 25°C, dando lugar posteriormente a su separación en dos fases en equilibrio, una rica en detergente y otra sin detergente. Esta característica ha sido utilizada para eliminar fenoles y clorofilas, de hoja de haba y de espinaca [(10) A. Sánchez-Ferrer, R. Bru y F. García -Carmona (1990) *Partial purification of a thylakoid-bound enzyme using temperature-induced phase partitioning.* *Anal. Biochem.* 184, 279-282; y (11) A. Sánchez Ferrer, J. Villalba y F. García Carmona (1989) *Triton X-114 as a tool for purifying spinach polyphenol oxidase.* *Phytochemistry* 28, 1321-1325]. Por tanto, el detergente actuaría

en tres direcciones, eliminando los fenoles de la patata que pardearían el extracto, eliminando sustratos naturales y aumentando la solubilidad de la enzima en el extracto.

Descripción detallada de la invención

5

La presente invención, tal y como se indica en su enunciado, se refiere a un método para la purificación de 5-lipoxigenasa de patata por partición de fases en el detergente no iónico Triton X-114.

10 El método de la presente invención se caracteriza esencialmente porque comprende tres etapas. En la primera etapa, los tubérculos se homogeneizan en una mezcla de tampón acetato, EDTA y Triton X-114, tras lo cual se filtra y centrifuga para obtener un sobrenadante denominado "extracto crudo". En la segunda etapa, este extracto crudo se somete a una partición de fases inducida por la temperatura tras añadirle Triton X-114. En la tercera y última etapa, el sobrenadante claro conteniendo la 5-lipoxigenasa se somete a precipitación fraccionada con sulfato amónico.

15

En los párrafos siguientes se explican con más detalle cada una de estas etapas.

20 Como se ha visto, el método de la presente invención utiliza de modo combinado el detergente no iónico Triton X-114 y el fraccionamiento con sulfato amónico para evitar el pardeamiento del extracto, aumentar la solubilidad de la enzima y eliminar los sustratos naturales de 5lipoxigenasa de patata durante su purificación. La principal diferencia con otros métodos descritos en la bibliografía [(7) y (8)] reside en el primer paso que comprende la adición de TX-114 en lugar de acetona, iones Ca^{2+} o agentes reductores como metabisulfito, ácido ascórbico o cisteína. Estos agentes pueden actuar inactivando a la enzima.

25 La combinación de detergente y de EDTA en el tampón de extracción previene el pardeamiento del extracto crudo a 4°C, y permite la precipitación del almidón cuando el extracto es almacenado a 4°C durante 90 min. Después de la primera centrifugación, el sobrenadante obtenido es una disolución ligeramente amarillenta y transparente correspondiente a dicho "extracto crudo". Cuando se compara la actividad específica del extracto crudo obtenido con TX-114 frente al descrito por Mulliez y Col. [(8)] para la misma variedad de patata, se observa que la actividad específica (AE) en el procedimiento descrito en esta patente es 12 veces mayor (AE = 12 UE/mg vs AE = 1UE/mg). Este resultado indica que la presencia de TX-114 extrae 5-lipoxigenasa de patata de forma más específica que el Brij 99 utilizado por Mulliez y Col. [(8)]. Por otro lado, también indica eliminación de -linolénico que puede actuar inactivando a la enzima.

35

El segundo paso del proceso de purificación es introducido para eliminar al máximo los fenoles y proteínas hidrofóbicas presentes en el sobrenadante del extracto crudo. Ello se realiza simplemente mediante la adición de más TX-114 al extracto crudo a 4°C, para posteriormente inducir separación de fases en el TX-114 al subir la temperatura de 4°C a 37°C. y mantenerla durante 15 min. Este paso no supone pérdida de 5-lipoxigenasa, pero si de proteínas hidrofóbicas y sobre todo de fenoles que caen en un 58% aproximadamente.

40

En el siguiente y último paso, la precipitación fraccionada con sulfato amónico entre el 20% y el 45%, proporciona una actividad específica 10 veces mayor que en el método de Mulliez y Col. [(8)] (AE = 24,12 UE/mg vs AE = 2,7 UE/mg). Este incremento de la actividad específica obtenido con el método del TX-114 es debido a una clara eliminación de proteínas del extracto como se muestra en la electroforesis en gel de poliacrilamida de la Figura 1. Compárese el número de bandas de la calle 3, que corresponde a 49 μg de proteína purificados en el método del Triton X-114, con el número de bandas de la calle 1 purificado con el método de Mulliez y Col. [(8)] para la misma cantidad de proteínas. La banda de 93.000 Daltons de peso molecular es la correspondiente a lipoxigenasa [(8)]. La actividad total es 3 veces superior por este procedimiento (1327 UE frente a 416 UE) (Tabla I).

45

50

55

60

TABLA

Purificación de 5-lipoxigenasa de patata mediante el uso de Triton X-114 (100 gr.)

Extracto	Volumen (ml)	unidades enzimáticas totales ^a	actividad específica (unidades/mg de proteína)	recuperación (%)	fenoles (μg)	fenoles (%)
Crudo	180	2175	12,0	100	2150	100
TX-114 al 4%	135	2200	17,3	100	900	42
(NH ₄) ₂ SO ₄ 20-40%	5	1327	24,1	60	64	3

^a La actividad se midió a pH 5.5 con ácido linoleico como sustrato.

Además el método del TX-114, reduce el contenido de fenoles a solo un 3% del original, evitando así, fenómenos de pardeamiento de la enzima purificada, que permiten que la enzima sea estable durante 6 meses a -20°C. Otra ventaja sensible del método es la reducción de tiempo y reactivos químicos. En tiempo, el procedimiento se lleva a cabo en aproximadamente 6 horas frente a las 48 horas del método de Mulliez y Col. [(8)]. En reactivos, ya que el TX-114 es mucho más barato comercialmente que la mezcla de agentes reductores y Brij 96 utilizado en el método de Mulliez y Col. [(8)].

En conclusión, el método del TX-114 para purificar 5-lipoxigenasa de patata de la presente invención es simple, rápido, barato, elimina fenoles, extrae 10 veces más actividad específica y es fácilmente escalable ya que no requiere de técnicas sofisticadas excepto la clásica centrifugación.

30 Descripción de la figura

Figura 1: Electroforesis en un gel al 10% de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) de lipoxigenasa de patata. *Calle 1:* 49 μg de 5-lipoxigenasa de patata purificada por el método de Mulliez y Col. [(8)]. *Calle 2:* 10 μg de una mezcla de proteínas marcadoras de peso molecular conocido: miosina de músculo de conejo (205.000), β-galactosidasa de E. coli (116.000), fosforilasa b de músculo de conejo (97.000), albúmina bovina (66.000), albúmina de huevo (45.000) y anhidrasa carbónica de eritrocito bovino (29.000). *Calle 3:* 49 μg de 5-lipoxigenasa de patata purificada con el método del Triton X-114.

40 Modos de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente Ejemplo el cual no pretende ser limitativo de su alcance.

45 Ejemplo

Material vegetal.

Los tubérculos de patata (*Solanum tuberosum*) de la variedad Desiree fueron recolectadas en estado de madurez y se almacenaron a temperatura constante de 10°C, en ausencia de luz y humedad hasta su utilización.

Purificación del Triton X-114

El Triton X-114 que fue condensado tres veces siguiendo el método de Sánchez-Ferrer y Col. [(12)] A. Sánchez-Ferrer, R. Bru, F. García Carmona (1989) Novel procedure for extraction of latent grape polyphenol oxidase using temperature induced phase separation in Triton X-114. *Plant Physiol.* 91, 1481-1487 pero usando tampón acetato 200 mM con EDTA 20 mM de pH 4,0, en vez de tampón Tris-HCl 10 mM pH 7,4 NaCl 150 mM. El método de purificación del Triton X-114 consistió en disolver 10 gr de este detergente con 8 mg de butilhidroxitolueno (Sigma) en tampón acetato 200 mM con EDTA 20 mM de pH 4,0 a 4°C hasta la completa disolución del detergente, tras lo cual se incubaba a 37°C durante 15 minutos. La mezcla blanquecina así obtenida, se introduce en un embudo de decantación y se deja repo-

sar durante la noche a temperatura ambiente (10 -20°C). Transcurrido dicho tiempo aparecen dos fases transparentes completamente separadas: una mayoritaria, en la parte superior, pobre en detergente; y una minoritaria, en la parte inferior, rica en detergente. La fase acuosa pobre en detergente es desechada y se reemplaza por un volumen igual de tampón acetato 200 mM con EDTA 20 mM de pH 4,0. Esta
5 mezcla es sometida a condensación dos veces más, bajo las condiciones antes citadas, pero sin la adición de butil-hidroxitolueno. La fase de detergente de la tercera condensación tuvo una concentración del 28% (p/v) de Triton X-114 y fue usada como solución “madre” de detergente para todos los experimentos descritos aquí en los que se usa este producto.

10 *Método de purificación del enzima.*

Los tubérculos fueron lavados, pelados a mano y troceados. Una muestra de 100 gr se homogeneizó con 150 ml de tampón acetato 200 mM pH 4,0 con EDTA 20 mm y un 6% (p/v) de Triton X-114 durante 1,5 minutos. El homogenado fue filtrado a través de 8 capas de gasa y mantenido a 4°C durante 90
15 minutos. Transcurrido ese tiempo, fue centrifugado a 100000g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recogido y denominado como extracto crudo (Tabla I, paso 1). Este sobrenadante fue sometido a una partición de fases inducida por la temperatura tras añadirle TX-114 a 4°C, de tal modo que la concentración final de TX-114 quedó al 4% (p/v) (Paso 2). La mezcla fue entonces calentada a 37°C. Tras 15 minutos, la solución se enturbió por la formación, agregación y precipitación de micelas mixtas de
20 detergente que contienen proteínas hidrofóbicas y compuestos fenólicos. Esta solución fue centrifugada a 10000g durante 15 minutos a una temperatura de 25°C. La fase rica en detergente fue descartada, el sobrenadante claro conteniendo 5-lipoxigenasa se llevó al 20% de saturación con sulfato amónico sólido. Después de 1 hora, la solución fue centrifugada durante 30 minutos a 60000g, y el precipitado se descartó. El sobrenadante, se llevó al 45% de saturación con sulfato amónico sólido. El precipitado, obtenido
25 tras centrifugar entre el 20 y el 45% de saturación fue disuelto en el volumen mínimo de agua y, utilizado como fuente de enzima tras eliminar la sal en una columna de Sephadex G-25.

La enzima resultante se almacena a -20°C hasta el momento de medir su actividad, siendo así estable durante más de 6 meses.

30 *Determinación de la actividad enzimática.*

Una unidad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de hidroperóxido del ácido linoleico a 234 nm ($\epsilon = 25000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) por minuto a 25°C en tampón acetato 200 mM pH
35 5,5, conteniendo 0,5 mM de DETAPAC y 0,001% de Tween 20.

Determinación de proteínas.

La concentración de proteínas en los distintos estadios de proceso de purificación fue determinada
40 utilizando una modificación del método de Lowry [(13) A. Bensadoun y D. Weinstein. (1976) Assay of proteins in the presence of interfering materials Anal. Biochem. 70,241-250]

Determinación de fenoles.

Los fenoles totales se determinaron por el método colorimétrico de Kidron y Col. [(14) M. Kidron,
45 M. Harel, A.M. Mayer (1987) Catechol oxidase activity in grapes and Wine Am. J. Enol. Vitic. 30-35], basado en la reacción de los fenoles con el reactivo de Folin en presencia de Na_2CO_3 .

Electroforesis

50 Se realizó siguiendo el método de Mulliez y Col. [(8)] en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS y utilizando un sistema Mini Protean II de Bio Rad. Los marcadores de peso molecular se obtuvieron de Sigma (SDS-6H).

55

60

REIVINDICACIONES

1. Método de purificación de 5-lipoxigenasa de patata por partición de fases en el detergente no iónico Triton X-114; cuyo procedimiento está **caracterizado** porque comprende esencialmente las siguientes etapas:

- (a) homogeneizar los tubérculos de patata en una mezcla de tampón acetato, EDTA y Triton X-114, tras lo cual se filtra y centrifuga para obtener un extracto crudo correspondiente al sobrenadante;
- (b) someter el mencionado extracto crudo a una partición de fases inducida por la temperatura, tras añadirle Triton X-114;
- (c) someter el sobrenadante claro conteniendo la lipoxigenasa procedente de la etapa anterior a precipitación fraccionada con sulfato amónico.

2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la etapa (b) se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 4 y 37°C.

3. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el sulfato amónico se emplea en una proporción comprendida entre 20 y 45% en peso.

25

30

35

40

45

50

55

60

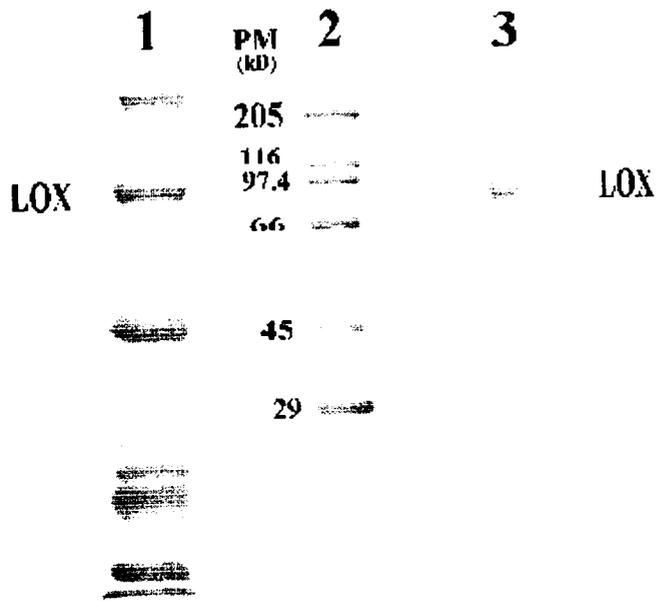


Figura 1



① ES 2 083 326

② N.º solicitud: 9400476

③ Fecha de presentación de la solicitud: 08.03.94

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: C12Q 1/61

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, 1987, Vol. 916, pp. 13-23. E. MULLIEZ et al. "5-Lipoxygenase from potato tubers. Improved purification and physicochemical characteristics". * Todo el documento *	1-3
A	PHYTOCHEMISTRY, 1989, Vol. 28, n° 5, pp. 1321-1325. A. SANCHEZ-FERRER et al. "Triton X-114 as a tool for purifying spinach polyphenol oxidase". * Todo el documento *	1-3

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

17.01.96

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/1