



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 229 924**

② Número de solicitud: 200302264

⑤ Int. Cl.:
C12N 11/08 (2006.01)
C12P 19/18 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **01.10.2003**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2005**

Fecha de la concesión: **28.08.2006**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **01.10.2006**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.10.2006

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

⑱ Inventor/es:
**Gómez de Segura Ugalde, María Aránzazu;
Alcalde Galeote, Miguel;
Plou Gasca, Francisco José;
Yates Buxcey, Malcolm y
Ballesteros Olmo, Antonio**

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Procedimiento para la inmovilización covalente de dextranasa sobre soportes acrílicos de distinta porosidad con grupos oxirano.**

㉑ Resumen:

Procedimiento para la inmovilización covalente de dextranasa sobre soportes acrílicos de distinta porosidad con grupos oxirano.

Se describe un procedimiento para la inmovilización de la enzima dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F sobre soportes acrílicos de distinta porosidad que contienen grupos oxirano. La unión que se establece con la enzima es covalente. Para favorecer la unión al soporte, se lleva a cabo un tratamiento previo de la enzima con dextranasa, con el fin de eliminar parte del dextrano envolvente. Se han variado una serie de parámetros en el proceso de inmovilización, concretamente las propiedades texturales del soporte, su contenido en grupos epóxido y la relación en peso enzima/soporte. En el presente procedimiento se reivindica la utilización de polímeros acrílicos activados con grupos epóxido para obtener biocatalizadores inmovilizados de dextranasa con una actividad por unidad de volumen superior a la obtenida por métodos de atrapamiento.

ES 2 229 924 B1

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la inmovilización covalente de dextranosa sobre soportes acrílicos de distinta porosidad con grupos oxirano.

5 **Sector de la técnica**

El azúcar de mesa (sacarosa) es una de las materias primas de la industria alimentaria más atractivas para su aprovechamiento. Su transformación en oligosacáridos de alto valor añadido mediante el empleo de enzimas (glucosiltransferasas y fructosiltransferasas) es un proceso industrial vigente, en gran desarrollo. Disponer de biocatalizadores inmovilizados para estos procesos implica claras ventajas tecnológicas. La invención va dirigida fundamentalmente al sector industrial agroalimentario. Permite la síntesis de oligosacáridos y dextranos que tienen aplicaciones en diversos sectores: alimentos funcionales, alimentación infantil, productos lácteos, cosmética, productos dietéticos, farmacia.

15 **Estado de la técnica**

La síntesis de oligosacáridos de interés alimentario hace uso de la enzimología como método preponderante frente a la síntesis química. Además de las glicosidasas (EC 3.2), la industria emplea enzimas de la subclase glicosiltransferasas (EC 2.4) para dichas biotransformaciones [Monsan, P. and Paul, F. (1995). Enzymatic synthesis of oligosaccharides. *FEMS Microbiol. Rev.*, 16, 187-192]. Para la aplicación industrial de las glicosiltransferasas es determinante poder utilizar carbohidratos baratos como sustratos. Concretamente, la dextranosa (EC 2.4.1.5) es una de las enzimas de transglicosilación con mejores perspectivas en la enzimología moderna. Esto se debe a que el sustrato que utiliza, sacarosa, repercute en una disminución de los costes, y además permite la síntesis de una amplia variedad de productos de reacción.

25 *Propiedades de las dextranosas*

Las dextranosas son enzimas inducibles por sacarosa, extracelulares, producidas por bacterias de los géneros *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus*. Las dextranosas pertenecen a la familia de las glucanosa, enzimas que catalizan la síntesis de glucanos con diferentes estructuras a partir de sacarosa. Los glucanos que tienen la cadena principal constituida por uniones $\alpha(1 \rightarrow 6)$ entre glucosas se conocen como dextranos, con ramificaciones $\alpha(1 \rightarrow 2)$, $\alpha(1 \rightarrow 3)$ o $\alpha(1 \rightarrow 4)$ dependiendo de la cepa productora de la enzima. Cuando en el medio de reacción hay presente otro azúcar reductor, la enzima es capaz de sintetizar oligosacáridos de longitud de cadena controlada (productos de aceptor). Como resultado de la inducción con sacarosa, la dextranosa de *Leuconostoc mesenteroides* contiene una gran cantidad de dextrano envolvente.

35 *Inmovilización de dextranosas*

La producción a gran escala de oligosacáridos no digeribles de interés industrial sintetizados por vía enzimática requiere como paso previo la inmovilización de la enzima. Este proceso facilita la separación del biocatalizador del medio con la consiguiente parada de la reacción, su reutilización y, en algunos casos, un aumento de su estabilidad operacional.

Se han estudiado distintos métodos de inmovilización de dextranosas: adsorción, atrapamiento en alginato cálcico y unión covalente. En cuanto a los métodos de inmovilización por adsorción, éstos son inadecuados debido a que las reacciones tienen lugar en un medio acuoso y la enzima se desprende progresivamente del soporte.

La existencia de agregados de dextranosa de gran tamaño (un dextrano de tamaño medio tiene 10^6 - 10^7 Da) explican que el método de inmovilización más estudiado para la dextranosa sea el atrapamiento en geles de alginato cálcico. Este sistema aprovecha la estructura supramacromolecular de los complejos enzima-dextrano, enzima-enzima o célula-dextrano-enzima. Con este tipo de inmovilización se han conseguido rendimientos excelentes.

A pesar del gran número de biocatalizadores basados en alginato que han sido descritos, esta metodología presenta ciertos inconvenientes [Jahnz, U., Wittlich, P., Prüsse, U., and Vorlop, K.D. (2001) New matrices and bioencapsulation processes. *In: Engineering and Manufacturing for Biotechnology*, Vol. 4, pp. 293-307. Eds.: Hofman, M., and Thonart, P. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht]. Por un lado, la estabilidad mecánica del gel es pequeña en reactores que presenten una alta tensión tangencial. Además, si se utilizan tampones fosfato o citrato, tiene lugar la pérdida de calcio, lo que origina un deterioro del gel. Por otro lado, el alginato puede ser biodegradado en el propio reactor cuando se trabaja en condiciones no estériles. Un hecho muy notorio es que la actividad específica (más concretamente, la actividad por unidad de volumen) de los catalizadores basados en alginato no es muy alta, inferior a 10 U/ml gel [Reh, K.D.; Noll-Borchers, M. and Buchholz, K. (1996). Productivity of immobilized dextranase for leucrose formation. *Enzyme Microb. Tech.*, 19, 518-524].

Por lo tanto, la inmovilización covalente se presenta como un excelente y muy atractivo método de inmovilización, permitiendo incluso proteger a la enzima contra la inactivación térmica y la desnaturalización química.

La sílice porosa activada facilita una inmovilización covalente de la enzima mediante la formación de enlaces multipuntuales entre la proteína y el soporte. Esta estrategia ha sido aplicada a la dextranosa [Kaboli, H. and Rei-

lly, P.J. (1980) Immobilization and properties of *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrases. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 1055-1069; Monsan, P. and López, A. (1981) On the production of dextran by free and immobilized dextransucrase. *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 2027-2037; Alcalde, M., Plou, F.J., Gómez de Segura, A., Remaud-Simeon, M., Willemot, R.M., Monsan, P. and Ballesteros, A. (1999). Immobilization of native and dextran-free dextransucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F for the synthesis of glucooligosaccharides. *Biotechnol. Tech.*, 13, 749-755]. La superficie específica de la sílice y su diámetro medio de poro son parámetros importantes en este tipo de inmobilizaciones. El tamaño macromolecular del complejo dextrano-enzima influye sobremanera en la unión de la enzima a la sílice, que penetra con mayor dificultad en los poros a medida que el diámetro de éste disminuye. Así, se han obtenido mejores resultados cuanto mayor es el diámetro de poro del soporte. Monsan y López (1981) lograron valores de actividad recuperada inferiores al 2% utilizando dextransacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B-512F y sílice aminada activada con glutaraldehído. La mayor actividad catalítica lograda por este grupo fue 40 U/g biocatalizador. Kaboli y Reilly (1980) utilizando un sistema similar obtuvieron una recuperación en el inmovilizado de un 10% de la actividad inicial, aunque la actividad específica finalmente obtenida fue muy baja (0,51 U/g). Este valor tan bajo se debió a que la cantidad de enzima empleada en el proceso de inmobilización fue especialmente pequeña.

La presencia del dextrano envolvente condiciona las estrategias de inmobilización covalente. En algunos casos se ha eliminado, como paso previo a la inmobilización, la cubierta de dextrano que se encuentra estrechamente asociada a la proteína, y que afecta a sus propiedades. Para ello se incubó la dextransacarasa con la enzima dextranasa [Fu, D. and Robyt J.F. (1990) A facile purification of *Leuconostoc mesenteroides* B-512FM dextransucrase. *Prep. Biochem* 20, 93-106]. La eliminación de la cubierta de dextranos tiene una doble ventaja: facilitar el acceso de la enzima al interior del poro, y permitir un mayor número de contactos covalentes enzima-soporte. Nuestro grupo fue pionero en el empleo de la dextransacarasa tratada con dextranasa para facilitar su inmobilización covalente a un soporte. Se obtuvo un rendimiento de inmobilización (13,1%) 22 veces superior al de la enzima nativa, lo que suponía los mejores resultados descritos hasta el momento en inmobilización covalente de la dextransacarasa. El catalizador obtenido presentó una actividad de 129 U/g biocatalizador.

La búsqueda de nuevos soportes para la inmobilización covalente de enzimas de la industria alimentaria es de gran actualidad. Se necesitan materiales de bajo coste, no tóxicos, disponibles en cantidad, que no se degraden en las condiciones de trabajo y que reaccionen de forma sencilla con la enzima. Los soportes que contienen grupos oxirano son materiales muy adecuados para la inmobilización covalente de enzimas con aplicaciones industriales. Dentro de ellos, han sido bastante estudiados los soportes tipo Eupergit (de la empresa Rohm-Pharma), obtenidos por copolimerización de N,N'-metilen-bis-metacrilamida, glicidil metacrilato, alilglicidil éter y metacrilato [Katchalski-Katzir, E. and Kraemer, D.M. (2000). Eupergit®, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 10, 157-176]. Más recientemente se han puesto en el mercado soportes similares basados en polimetacrilato denominados Sepabeads (de la empresa Resindion S.L.) [Mateo, C., Abian, O., Fernández-Lorente, G., Pedroche, J., Fernández-Lafuente, R., Guisan, J.M., Tam, A. and Daminati, M. (2000) Epoxy sepabeads: a novel epoxy support for stabilization of industrial enzymes via very intense multipoint covalent attachment. *Biotechnol. Prog.* 18, 629-634]. Las principales ventajas de su utilización son: 1) aumento de estabilidad operacional del inmovilizado para uso continuo o discontinuo; 2) alta actividad por unidad de peso o volumen; 3) aumento del rendimiento referido a actividad; 4) no se requiere una activación del soporte.

Producción de dextranos con dextransacarasas

Los dextranos son polisacáridos de alto peso molecular obtenidos industrialmente por fermentación bacteriana de sacarosa utilizando *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. La enzima implicada en dicho proceso es la dextransacarasa. Los dextranos de bajo peso molecular tienen sus principales aplicaciones en el campo de la industria farmacéutica, como expansores del plasma sanguíneo. Entre las ventajas de estos dextranos, se encuentran su estabilidad a la esterilización por calor, la ausencia de agentes causantes de enfermedades transmisibles y una baja incidencia de reacciones adversas.

Producción de glucooligosacáridos prebióticos (GlcOS) con dextransacarasas

La dextransacarasa, por tanto, permite la producción de dextranos y/o de oligosacáridos. Resultan especialmente interesantes los isomaltooligosacáridos y los glucooligosacáridos con una o varias uniones $\alpha(1 \rightarrow 2)$. Los isomaltooligosacáridos son azúcares formados por unidades de glucosa unidas mediante enlaces $\alpha(1 \rightarrow 6)$. Mediante el empleo de dextransacarasa es posible la síntesis de estos productos en una sola etapa [Tanriseven, A. and Gokmen, F. (1999) Novel method for the production of a mixture containing fructooligosaccharides and isomaltooligosaccharides. *Biotechnol. Tech.* 13, 207-210]. El interés de los isomaltooligosacáridos radica en sus propiedades prebióticas, además de mejorar las características higroscópicas y reológicas de los productos a los que se incorporan. Los isomaltooligosacáridos son específicamente metabolizados por la microflora bacteriana beneficiosa (géneros *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*), favoreciendo el crecimiento de estos microorganismos (efecto *bifidos*).

Los glucooligosacáridos (GlcOS) contienen de 3 a 6 residuos de glucosa. Destacan los GlcOS producidos por la dextransacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B-1299 mediante la reacción con maltosa como aceptor. Se obtienen utilizando la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 nativa o inmovilizada en esferas de alginato cálcico. Son oligosacáridos con una o varias uniones $\alpha(1 \rightarrow 2)$, resistentes a las enzimas glicolíticas digestivas, lo que favorece que alcancen el colon y puedan entrar en contacto con la microflora bacteriana intestinal.

Por otro lado, los GlcOS son compuestos no cariogénicos (no producen caries, porque las enzimas salivares no hidrolizan los enlaces $\alpha(1 \rightarrow 2)$), y son bajos en calorías. Resultan especialmente interesantes sus aplicaciones cosméticas y farmacéuticas [Lamothe JP, Marchenay Y, Monsan P, Paul F, Pelenc V. (1991) Compositions cosmétiques contenant des lucooligosaccharides. Patente FR 2678166]; así, estos azúcares promueven el crecimiento de las bacterias lácticas beneficiosas para la piel, previniéndose el desarrollo de microorganismos perjudiciales que puedan ocasionar problemas dérmicos (acné, irritaciones, etc.).

Producción de leucrosa con dextransacarasa

Otro producto de interés alimentario que puede obtenerse a partir de sacarosa con la dextransacarasa es la leucrosa (5-O-(α -D-glucopiranosil)- β -D-fructopiranososa), utilizando fructosa como molécula aceptora [Böker, M., Jördening, H.J. and Buchholz, K. (1994). Kinetics of leucrose formation from sucrose by dextransucrase. *Biotechnol. Bioeng.* 43, 856-864]. Este disacárido tiene numerosas aplicaciones por ser no cariogénico (ya que las enzimas de la boca humana no son capaces de romper uniones $\alpha(1 \rightarrow 5)$), y presenta un 50% del poder edulcorante de la sacarosa. Al igual que en la producción de los GlcOS, el proceso industrial de obtención de leucrosa se basa en el empleo de reactores que contienen la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F inmovilizada en esferillas de alginato cálcico, alcanzando conversiones de hasta el 90%.

Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

La presente invención se centra en el diseño de estrategias de inmovilización efectivas para las enzimas dextransacarasas (EC 2.4.1.5), atendiendo a sus peculiaridades estructurales. Concretamente, se han utilizado polímeros acrílicos funcionalizados con grupos epóxido. Los grupos oxirano (epóxido) pueden reaccionar covalentemente con los grupos amino, fenol, carboxilo o tiol de la enzima. Este tipo de inmovilización ofrece múltiples ventajas ya que es un método sencillo, rápido y fácilmente escalable.

Estos biocatalizadores inmovilizados pueden ser utilizados en diferentes tipos de reactores, y pueden separarse fácilmente de la mezcla de reacción (por filtración o centrifugación). Para favorecer la unión al soporte, se lleva a cabo un tratamiento previo de la enzima con dextranasa, eliminando parte del dextrano envolvente. En esta invención se ha estudiado el efecto de una serie de variables en el proceso de inmovilización, concretamente las propiedades texturales del soporte, su contenido en grupos oxirano y la relación en peso enzima/soporte.

Descripción detallada de la invención

Los soportes activados con grupos oxirano son muy adecuados para llevar a cabo la inmovilización de enzimas, tanto a escala de laboratorio como industrial. Son capaces de formar enlaces covalentes muy estables con las proteínas, bajo condiciones experimentales suaves.

En primer lugar se llevó a cabo el tratamiento de la dextransacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B-512F para eliminar la cubierta de dextranos. Ello se realizó utilizando la enzima dextranasa de *Penicillium sp.* (EC 3.2.1.11), siguiendo un protocolo ya descrito. Posteriormente se llevó a cabo la inmovilización de la enzima en dos tipos de polímeros acrílicos activados con grupos oxirano.

Características de los soportes empleados

Las propiedades texturales de los materiales empleados en la siguiente invención se recogen en la Tabla 1. Los soportes tipo Eupergit® son polímeros acrílicos, formados por acrilamida con grupos alil-glicidil (epóxido) como componentes activos responsables del enlace. La unión que se establece con las enzimas es covalente, y los enlaces formados son extremadamente estables. Se presentan en forma de esferas de 150-200 μ m, electroneutras y de carácter hidrófilo. Se emplearon 2 tipos: Eupergit C y Eupergit C 250L. Las diferencias más significativas entre ambos soportes son: (1) su contenido en grupos oxirano, aproximadamente 600 μ moUg en Eupergit C y 200 μ moUg en Eupergit C 250L; (2) sus propiedades porosas, ya que el volumen de poro en Eupergit C es prácticamente despreciable, siendo de 1,88 cc/g en Eupergit C 250L, con un diámetro medio entre 1000-4000 Å.

Los soportes Sepabeads® son soportes de polimetacrilato, activados con grupos funcionales oxirano, muy adecuados para la inmovilización covalente de enzimas. Están constituidos por partículas de 150-300 μ m que se caracterizan por su gran rigidez y una distribución de tamaño de poro optimizado. Las diferencias más significativas entre los Sepabeads empleados (FP-EP, FP-EC3 y FP-EPO5) son: (1) Su contenido en grupos oxirano, ya que el Sepabeads FP-EPO5 tiene un contenido (23 μ mol/g) 10 veces inferior al Sepabeads FP-EP (250 μ moUg) y 2,5 veces menor que el FP-EC3 (106 μ mol/g); (2) el Sepabeads FP-EPO5 es el soporte más macroporoso de los tres. No obstante, cuando se calcula la densidad de grupos oxirano, los tres soportes presentan valores similares, en el rango 2,4-5,2 mol/m² (Tabla 1).

Efecto de la relación en peso enzima: soporte (Eupergit C)

Las condiciones iniciales de inmovilización fueron las siguientes (Fig. 1). Sobre 2,5 ml de disolución (que contenían 0,15 mg de dextransacarasa libre de dextranos) se añadieron 0,075 gramos de soporte. En estas condiciones la

ES 2 229 924 B1

relación en peso mg enzima:g soporte fue 2:1. La mezcla se incubó a 4°C durante 72 horas en tampón acetato sódico 1 M (pH 5,4). Después se filtró la solución mediante la utilización de filtros de microfibra de vidrio (Whatman) bajo vacío. A continuación se lavó el inmovilizado con tampón acetato sódico 0,1 M, pH 5,4, se secó el soporte mediante vacío y se guardó a 4°C. La actividad recuperada (Tabla 2) se refiere al cociente entre unidades totales de la enzima inmovilizada y unidades totales de la enzima nativa, mediante ensayo del ácido dinitrosalicílico. Las medidas de actividad se hicieron en condiciones de linealidad con respecto a la cantidad de biocatalizador. En estas condiciones, se recupera en el biocatalizador inmovilizado un 17% de la actividad enzimática de partida. Es especialmente interesante la elevada actividad específica del biocatalizador (79 U/g).

Se ensayaron diversas relaciones en peso (miligramos de enzima por gramo de soporte), concretamente 0,2:1, 1:1, 2:1, 10:1, 30:1. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2. El máximo de actividad recuperada (21%) se obtiene con la relación 1:1. A partir de este valor, si se aumenta la cantidad de enzima, disminuye la actividad recuperada (Fig. 2). Por otro lado, el porcentaje de proteína unida es muy alto. En cuanto a la actividad específica del biocatalizador, ésta alcanza su máximo (226 U/g) utilizando una relación enzima:Eupergit C 10:1, valor 5 veces superior al más alto descrito hasta ahora en la bibliografía.

Al aumentar la cantidad de enzima, la actividad específica no aumenta, probablemente debido a la saturación de los sitios de unión en el soporte, de manera que aumentan los impedimentos estéricos entre las distintas moléculas de enzima.

Efecto de la porosidad en los soportes Eupergit®

En el caso del Eupergit C, el pequeño valor de volumen de poro (0,06 cc/g) indica que el proceso de inmovilización debe tener lugar fundamentalmente en la superficie de las partículas. Por ello, se compararon los resultados anteriormente descritos con los obtenidos utilizando el soporte Eupergit C 250L, que presenta un volumen de poro (1,88 ml/g) y una distribución de poros de diámetro 1000-4000 Å, muy superiores a los del Eupergit C 250L. La Tabla 3 recoge los datos obtenidos, utilizando diversas relaciones mg enzima/g soporte, concretamente 1:1, 2:1, 10:1 y 30:1.

Comparando con Eupergit C, se observó que al emplear una misma relación en peso enzima:soporte, se unía una mayor cantidad de proteína unida al polímero en el caso del Eupergit C. Respecto a la actividad recuperada, el máximo valor obtenido (23%) correspondió a una relación en peso 2:1 (Fig. 3). Aunque pueda parecer una recuperación baja, es el mayor valor obtenido en procesos de inmovilización covalente de dextranasa. Además, los valores de actividad específicas del biocatalizador se incrementaron hasta alcanzar la mayor relación enzima:soporte ensayada.

Concretamente, usando una relación de 30 mg de enzima por gramo de soporte, se alcanzó una actividad de 710 U/g. Este valor contrasta con otros descritos hasta la fecha en inmovilización covalente de dextranasa, y es especialmente significativo comparado con los valores obtenidos en el atrapamiento con alginato. Esto parece indicar que, a pesar de que el Eupergit C presenta un mayor contenido en grupos epóxido (3 veces superior) que el Eupergit C 250L, el parámetro más importante es la macroporosidad del soporte.

Inmovilización en los soportes Sepabeads®

Se ensayaron 3 soportes Sepabeads de diferentes propiedades texturales. El Sepabeads FP-EP tiene una distribución de poros de diámetro 300-600 Å, bastante limitada en comparación con el tamaño molecular de la enzima sin dextrano (PM 169.709). Esto implica que, probablemente, el proceso de inmovilización de la enzima tendrá lugar fundamentalmente en la superficie exterior de las partículas. El segundo de ellos, Sepabeads FP-EC3, presenta una distribución porosa más acorde con esta enzima, con un rango de poros de diámetros entre 400-2000 Å. El más poroso de la serie es FP-EP05, con un volumen de poro de 1,67 cc/g distribuidos en el rango 5000-10000 Å.

Los datos de la Tabla 4 indican que los mejores resultados, tanto en términos de actividad recuperada como en actividad específica, corresponden al más poroso de los soportes ensayados. Es significativo el hecho de que en el caso del Sepabeads FP-EP, el aumento de la relación enzima/soporte origina una disminución en la actividad específica del catalizador. Ello parece estar de acuerdo con el carácter poco poroso de dicho material, que puede ver saturada la superficie externa con una carga baja de enzima. Este hecho no ocurre en los casos en los que el material tiene poros de un tamaño adecuado, en relación a las dimensiones de la enzima, que permiten aumentar la carga del biocatalizador (enzima unida por gramo de soporte). No obstante, las actividades específicas obtenidas son inferiores a las logradas con los soportes tipo Eupergit, especialmente con Eupergit C 250L.

Efecto de la inmovilización en los perfiles de actividad frente al pH y la temperatura

Se realizó un estudio comparativo entre la enzima soluble y la enzima inmovilizada en Eupergit C 250L, para determinar su temperatura óptima de trabajo. El rango de temperatura empleado fue entre 20-50°C. Para medir la actividad se utilizó el ensayo del ácido dinitrosalicílico. La Figura 4 muestra como ambas enzimas presentan perfiles similares, siendo 30°C la temperatura óptima en ambos casos.

También se estudió el efecto del pH en la actividad de la enzima soluble e inmovilizada (Fig. 5). El rango de pH

ES 2 229 924 B1

estudiado fue 4,0-8,0, utilizándose un pH-metro (Radiometer) para ajustar los tampones. La temperatura a la cual se llevó a cabo el ensayo fue 30°C. Se utilizaron los siguientes tampones: pH 4-5,5, acetato sódico 20 mM (pK_a 4,8); pH 5,5-6,5, MES 20 mM (pK_a 6,1); pH 6,5-7,8, MOPS 20 mM (pK_a 7,2). En el caso de la enzima nativa, el rango de pH óptimo es muy amplio (4,5-6,5), mientras que la inmovilizada en Eupergit C 250L presenta un intervalo más estrecho, en tomo a 5,5.

Efecto de la inmovilización en la estabilidad

Se realizó un estudio comparativo, entre la enzima soluble y la enzima inmovilizada en Eupergit C, Eupergit C 250L y Sepabeads FP-EP05 para analizar la estabilidad enzimática. La dextransacarasa fue incubada a 30°C en tampón acetato sódico 5 mM, pH 5,4. Para cada punto de la curva, el catalizador incubado un tiempo determinado se adicionó sobre un matraz que contenía sacarosa en las condiciones estándar de reacción, y se realizó el ensayo del ácido dinitrosalicílico para determinar su actividad residual. Se encontró que la enzima nativa era muy poco estable a 30°C (Figura 6), perdiendo el 90% de actividad en tan solo 2 horas. Se observó que el proceso de inmovilización de la dextransacarasa en Eupergit C 250L protegía a la enzima frente a la inactivación térmica. Así, tras una rápida pérdida de actividad en las primeras 2 horas, se mantiene una actividad residual superior al 40% durante los dos días siguientes de incubación. La enzima inmovilizada en Eupergit C y Sepabeads FP-EP05 mostró una estabilidad intermedia entre la nativa y la unida a Eupergit C 250L.

Ejemplos de realización de la invención

Ejemplo 1

Sobre 2,5 ml de solución enzimática conteniendo 0,15 mg de dextransacarasa tratada con dextranasa (270 U/mg proteína en el ensayo del ácido dinitrosalicílico) en tampón acetato sódico 1 M pH 5,4, se añadieron 0,075 g de Eupergit C. En estas condiciones la relación en peso mg enzima:g soporte fue 2:1. La suspensión se incubó a 4°C durante 72 h con agitación suave de rodillos. Después se filtró la solución mediante la utilización de filtros de microfibras de vidrio (Whatman) bajo vacío. A continuación se lavó el biocatalizador (3x9 ml) con tampón acetato sódico 0,1 M, pH 5,4. Finalmente se secó el soporte mediante vacío y se guardó a 4°C. En estas condiciones se recupera el 17% de actividad, y el biocatalizador presenta una actividad de 79 U/g.

Ejemplo 2

Sobre 2,5 ml de solución enzimática conteniendo 0,417 mg de dextransacarasa tratada con dextranasa (270 U/mg proteína en el ensayo del ácido dinitrosalicílico) en tampón acetato sódico 1 M pH 5,4, se añadieron 0,014 g de Eupergit C 250L. En estas condiciones la relación en peso mg enzima:g soporte fue 30:1. La suspensión se incubó a 4°C durante 72 h, con agitación suave de rodillos. Después se filtró la solución mediante la utilización de filtros de microfibras de vidrio (Whatman) bajo vacío. A continuación se lavó el biocatalizador (3x9 ml) con tampón acetato sódico 0,1 M, pH 5,4. Finalmente se secó el soporte mediante vacío y se guardó a 4°C. En estas condiciones se recupera el 10% de actividad, y el biocatalizador presenta una actividad de 710 U/g.

Ejemplo 3

Sobre 2,5 ml de solución enzimática conteniendo 0,15 mg de dextransacarasa tratada con dextranasa (270 U/mg proteína en el ensayo del ácido dinitrosalicílico) en tampón acetato sódico 1 M pH 5,4, se añadieron 0,216 g de Sepabeads FP-EP05. En estas condiciones la relación en peso mg enzima:g soporte fue 2:1, teniendo en cuenta la cantidad de agua inicial del soporte (65%). La suspensión se incubó a 4°C durante 72 h, con agitación suave de rodillos. Después se filtró la solución mediante la utilización de filtros de microfibras de vidrio (Whatman) bajo vacío. A continuación se lavó el biocatalizador (3x9 ml) con tampón acetato sódico 0,1 M, pH 5,4. Finalmente se secó el soporte mediante vacío y se guardó a 4°C. En estas condiciones se recupera el 11% de actividad, y el biocatalizador presenta una actividad de 62 U/g.

Descripción de las figuras

Figura 1. Esquema general de inmovilización de la enzima dextransacarasa.

Figura 2. Efecto de la relación en peso enzima (mg): soporte (g) en los valores de proteína unida, actividad catalítica y eficiencia, utilizando Eupergit C como soporte.

Figura 3. Efecto de la relación en peso enzima (mg): soporte (g) en los valores de proteína unida, actividad catalítica y eficiencia, utilizando Eupergit C 250L como soporte.

Figura 4. Efecto de la temperatura en la actividad de la dextransacarasa B-512F nativa e inmovilizada en Eupergit C 250L.

Figura 5. Efecto del pH en la actividad de la dextransacarasa B-512F nativa (o) e inmovilizada en Eupergit C 250L (●).

ES 2 229 924 B1

Figura 6. Estabilidad de la dextranasa B-512F nativa e inmovilizada en distintos soportes. Condiciones de incubación: acetato sódico 5 mM pH 5,4, 30°C.

5

(Tabla pasa a página siguiente)

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 1. Propiedades texturales de los soportes empleados.

SopORTE	Casa comercial	Tamaño de partícula (μm) ^a	Contenido en grupos oxirano ($\mu\text{mol/g}$) ^a	Area BET (m^2/g) ^b	Densidad de grupos oxirano ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$)	Volumen de poro (cc/g) ^c	Distribución de tamaño de poro (\AA) ^c	Contenido en agua (%) ^d
Eupergit C (Lote 1210109879)	Röhm	150	> 600	4	>130	0.06	100 – 500	4
Eupergit C 250L (Lote 1210419830)	Röhm	200	> 200	49	> 4	1.88	1000 – 4000	5
Sepabeads FP-EP (Lote E206P087)	Resindion	150 – 300	250	48	5,2	0.42	300 – 600	49
Sepabeads FP-EC3 (Lote E107P067)	Resindion	150 – 300	106	43	2,5	0.54	400 – 2000	60
Sepabeads FP-EP05 (Lote E007P80)	Resindion	150 – 300	23	9	2,4	1.67	5000 – 10000	65

^a Datos suministrados por el proveedor^b Cálculos realizados mediante adsorción de N_2 a 77 K. Para ello se empleó un equipo Micromeritics ASAP 2000.^c Cálculos realizados mediante porosimetría de Hg. Para ello se empleó un porosímetro Pascal 140/240 (Fisons).^d Determinado por Karl-Fisher utilizando un valorador DL-31 (Mettler)

Tabla 2. Inmovilización de dextranacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NNRL B-512F en Eupergit C.

Relación	Proteína unida (mg) por	Actividad	Actividad	Actividad	Eficiencia
mg enzima : g soporte	gramo de soporte ^a	recuperada (%) ^b	(U/g biocatalizador seco) ^b	(U/mg proteína) ^b	catalítica (%) ^c
0,2 : 1	0,20	14	7,5	38	14
1 : 1	0,97	21	47	59	22
2 : 1	1,8	17	79	50	18
10 : 1	6,7	9	226	36	13
30 : 1	18,3	3	211	12	4,4

^a Determinada por el método de Bradford (BioRad).

^b Determinada por el método del ácido dinitrosalicílico.

^c Cociente entre la actividad específica de la enzima inmovilizada y la actividad específica de la enzima nativa (270 U/mg proteína).

Tabla 3. Inmovilización de dextranacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NNRL B-512F en soportes tipo Eupergit C 250L.

Relación mg enzima : g soporte	Proteína unida (mg) por gramo de soporte ^a	Actividad recuperada (%) ^b	Actividad (U/g biocatalizador seco) ^b	Actividad (U/mg proteína) ^b	Eficiencia catalítica (%) ^c
1 : 1	1,0	19	47	51	19
2 : 1	1,9	22	93	61	23
10 : 1	8,6	16	410	51	19
30 : 1	21,5	9,8	710	37	14

^a Determinada por el método de Bradford (BioRad).

^b Determinada por el método del ácido dinitrosalicílico.

^c Cociente entre la actividad específica de la enzima inmovilizada y la actividad específica de la enzima nativa (270 U/mg proteína).

Tabla 4. Inmovilización de dextranasa de *Leuconostoc mesenteroides* NNRL B-512F en soportes Sepabeads.

SopORTE	Relación mg enzima : g soporte	Proteína unida (mg) por gramo de soporte ^a	Actividad recuperada (%) ^b	Actividad (U/g biocatalizador seco) ^b	Actividad (U/mg proteína) ^b	Eficiencia catalítica (%) ^c
Sepabeads FP-EP	2 : 1	1,8	7,4	37	22	8,2
Sepabeads FP-EP	4 : 1	3,0	3,1	33	11	4,1
Sepabeads FP- EC3	2 : 1	1,9	3,8	20	11	3,9
Sepabeads FP- EC3	5 : 1	4,6	3,1	48	8,9	3,3
Sepabeads FP-EP05	2 : 1	2,0	11	62	31	11,4
Sepabeads FP-EP05	5 : 1	3,9	5,2	71	18	6,7

^a Determinada por el método de Bradford (BioRad).

^b Determinada por el método del ácido dinitrosalicílico.

^c Cociente entre la actividad específica de la enzima inmovilizada y la actividad específica de la enzima nativa (270 U/mg proteína).

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para la inmovilización de dextranasa **caracterizado** por la utilización de soportes de poliacrilamida o polimetacrilato funcionalizados con grupos oxirano.

10 2. Procedimiento para la inmovilización de dextranasa procedente de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F según la reivindicación 1, **caracterizado** por el tratamiento previo de la enzima con dextranasa para eliminar la cubierta de dextranos.

15 3. Procedimiento para la inmovilización de dextranasa según la reivindicaciones 1-2, **caracterizado** por la utilización de una relación en peso enzima:soporte que oscila entre 0,2:1 y 30:1 (miligramos de enzima por gramo de soporte).

20 4. Procedimiento para la inmovilización de dextranasa según la reivindicaciones 1-3, **caracterizado** por la incubación de la enzima con el soporte un tiempo entre 8 horas y 120 horas.

25 5. Procedimiento para la inmovilización de dextranasa según la reivindicaciones 1-4, **caracterizado** por la incubación de la enzima con el soporte a temperaturas entre 0°C y 25°C.

30 6. Procedimiento para la inmovilización de dextranasa según la reivindicaciones 1-5, **caracterizado** por la utilización de tampones de acoplamiento 0,2-1 M a pHs entre 4,5 y 7,5.

35 7. Procedimiento para la preparación de biocatalizadores inmovilizados de dextranasa sobre soportes acrílicos de distinta porosidad, definidos en la reivindicación 1, para la síntesis de oligosacáridos, tales como isomaltooligosacáridos, dextranos y leucrosa.

40

45

50

55

60

65

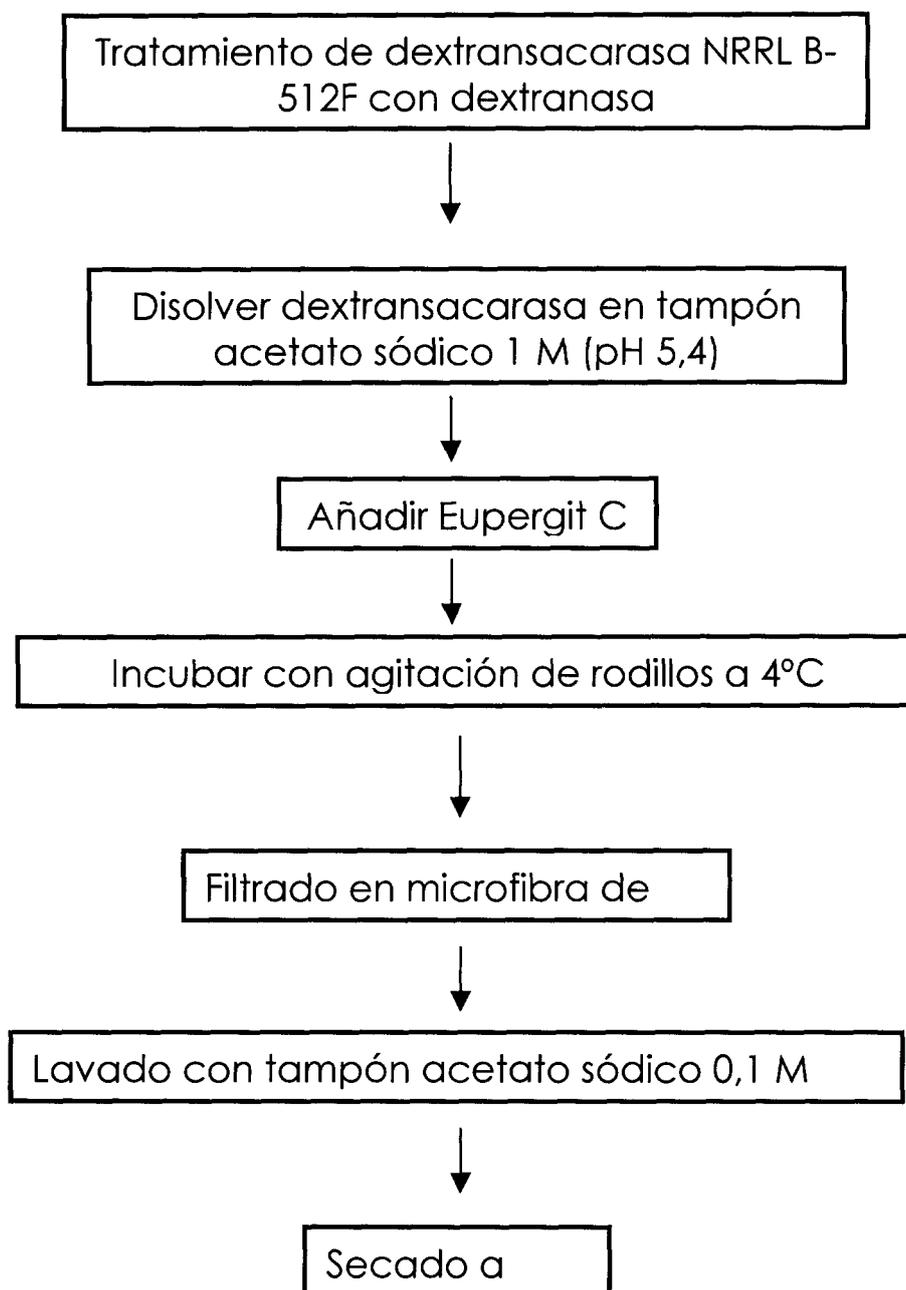


Figura 1

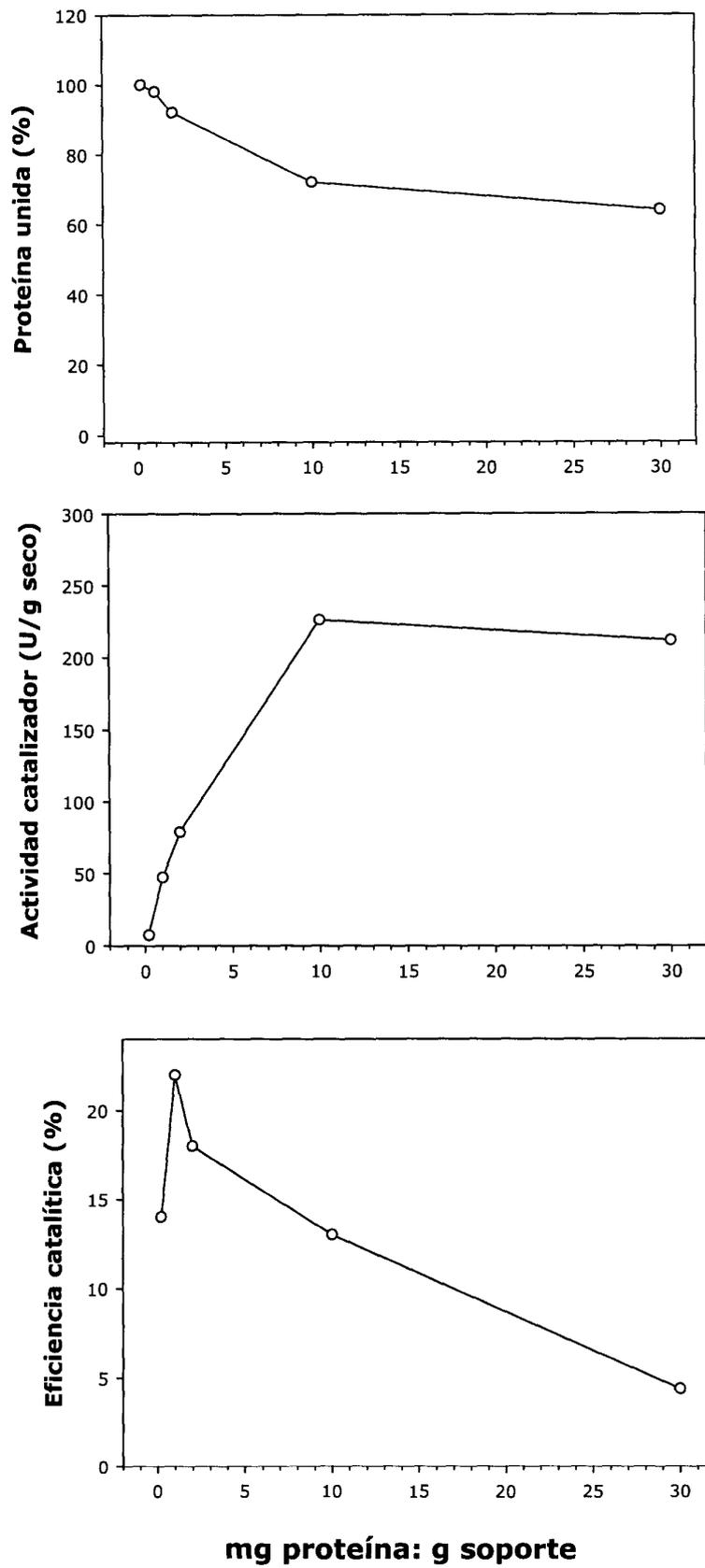


Figura 2

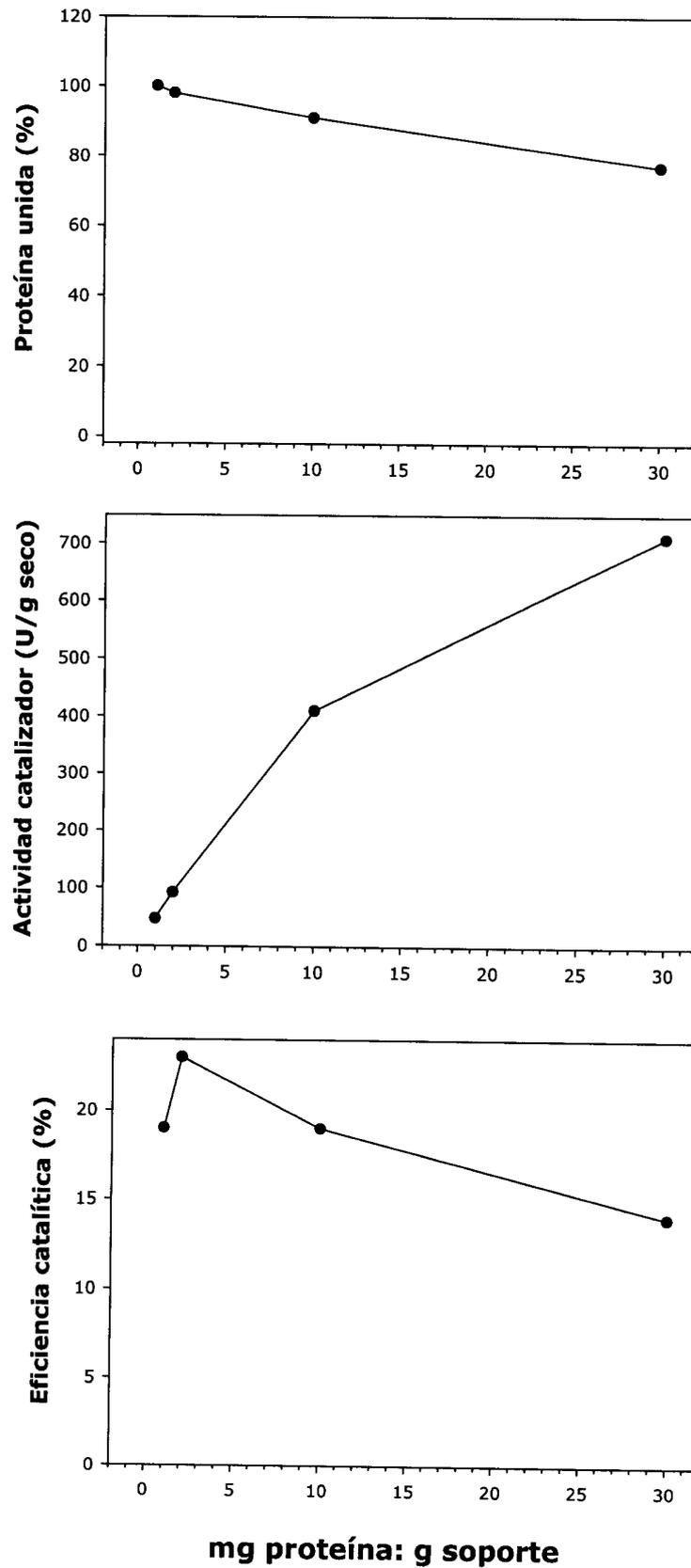


Figura 3

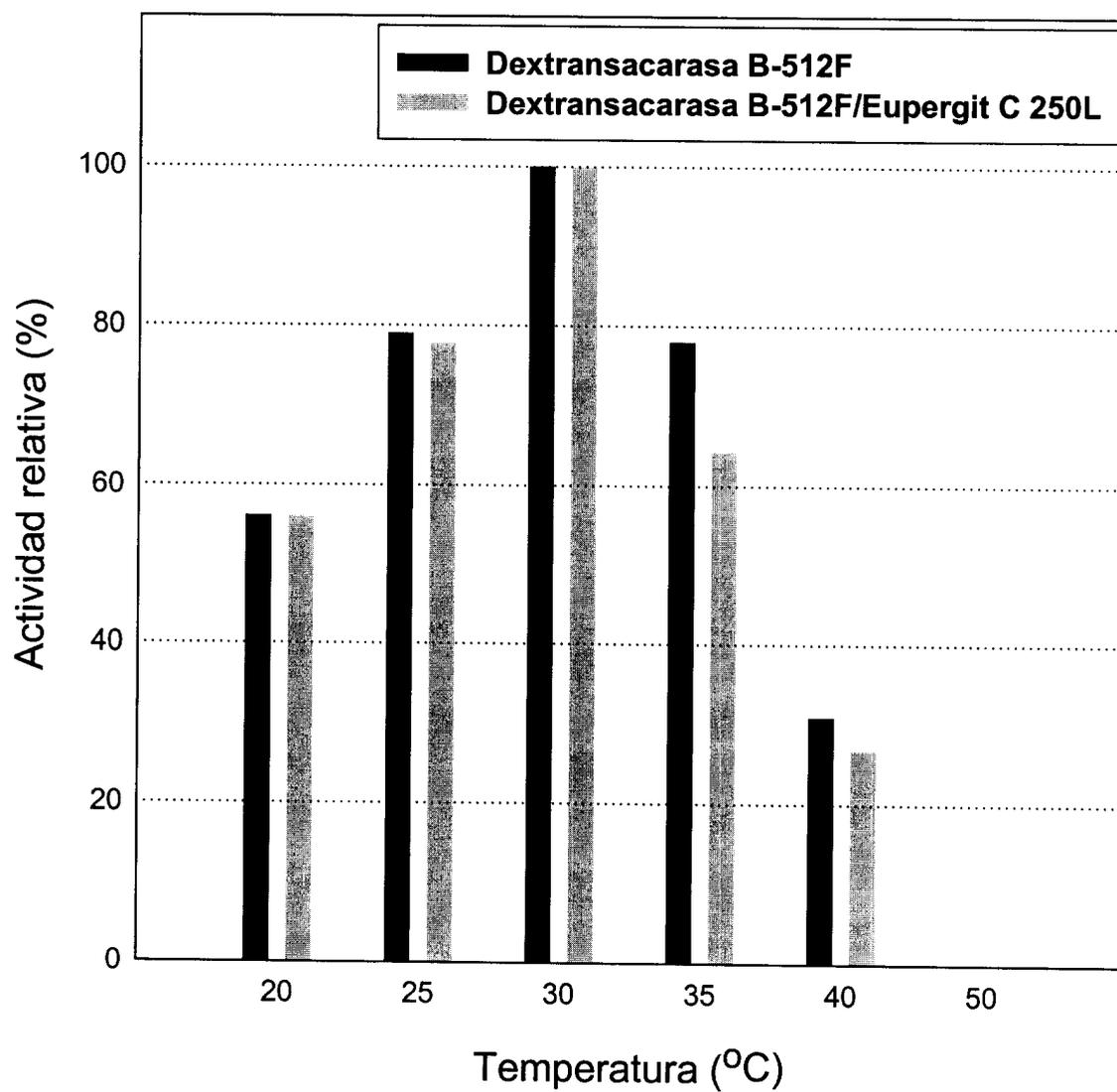


Figura 4

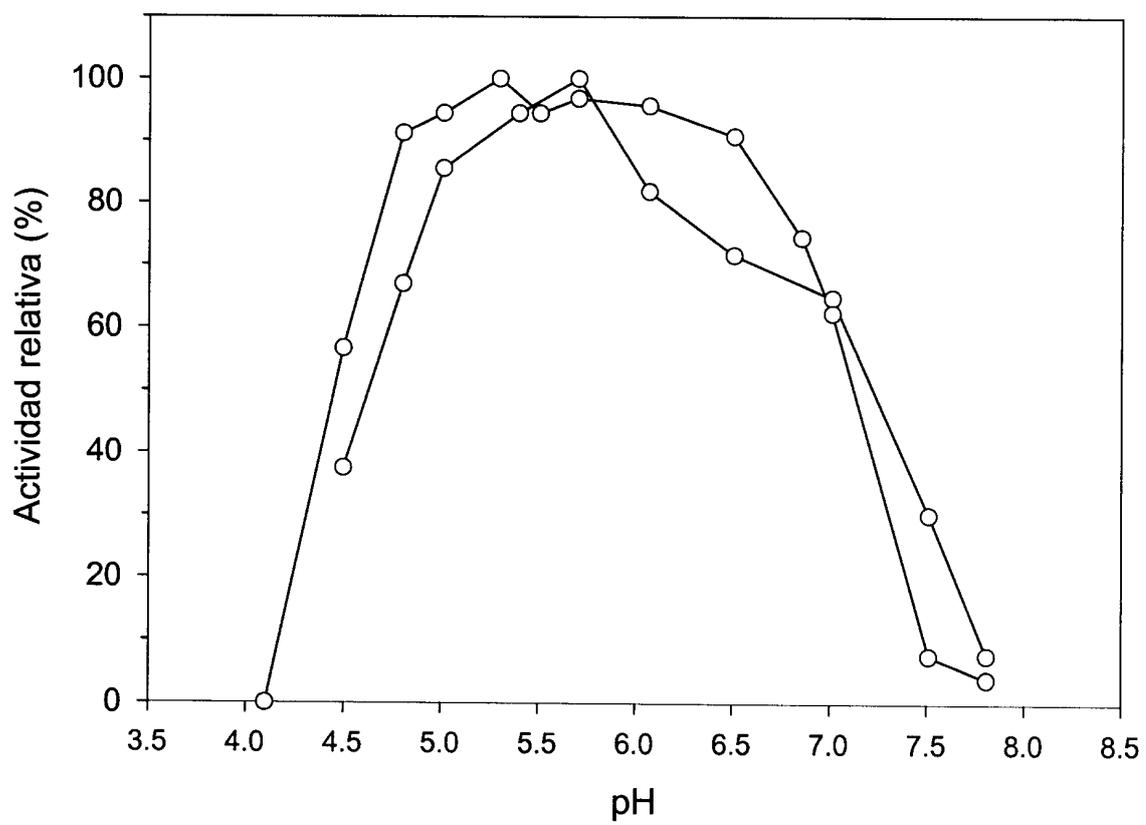


Figura 5

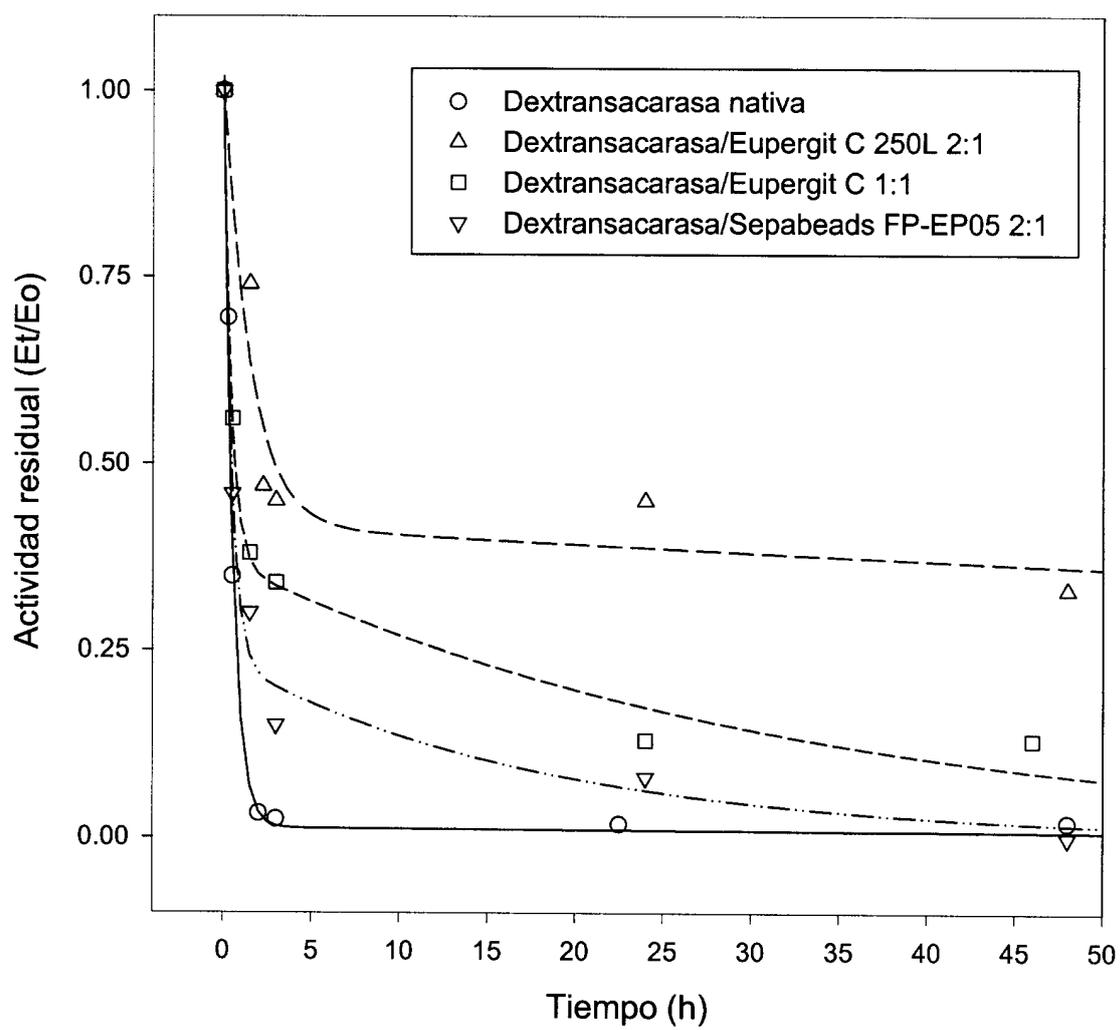


Figura 6



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 229 924

② Nº de solicitud: 200302264

③ Fecha de presentación de la solicitud: **01.10.2003**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12N 11/08, C12P 19/18

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	TANRISEVEN, A. et al.: "Production of isomalto-oligosaccharides using dextransucrase immobilized in alginate fibres", Process Biochem., Vol. 37, (2002), páginas 1111-1115, todo el documento.	1-7
A	ALCALDE, M. et al.: "Immobilization of native and dextran-free dextransucrases from Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512F for the synthesis of glucooligosaccharides", Biotech. Techn., Vol. 13, (1999), páginas 749-755, todo el documento.	1-7

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

23.02.2005

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1