

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 N.º de publicación: **ES 2 050 068**

21 Número de solicitud: 9201378

51 Int. Cl.⁵: C12N 9/20
C07K 3/20

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **03.07.92**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.94**

Fecha de concesión: **08.11.94**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **16.12.94**

45 Fecha de publicación del folleto de patente:
16.12.94

73 Titular/es:
**Consejo Superior Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

72 Inventor/es: **Rua Rodríguez, M. Luisa y
Ballesteros Olmo, Antonio**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Procedimiento para la purificación de dos isoenzimas lipasa de Candida rugosa.**

57 Resumen:

Procedimiento para la purificación de dos isoenzimas lipasa de *Candida rugosa*.

Procedimiento para la purificación de dos lipasas extracelulares presentes en lipasa bruta comercial de la levadura *Candida rugosa*. El método consta de un sólo paso de cromatografía hidrofóbica en matriz de agarosa. Condiciones de elución muy diferentes permiten la completa separación y purificación de dos enzimas con actividad lipásica (lipasas A y B) presentes en el extracto comercial de partida. Para ello se utiliza un tampón concentrado de pH 6 a 8, con el que se eluyen de la columna gran parte de los contaminantes presentes en el extracto; luego con la misma solución tampón más diluida se arrastra la lipasa B. Posteriormente, con un di o polialcohol disuelto en el tampón diluido se eluye la lipasa A, de cuya solución, mediante concentración por ultrafiltración y cromatografía de exclusión molecular con dextrano, se elimina el alcohol.

Se aplica industrialmente en la purificación de enzimas.

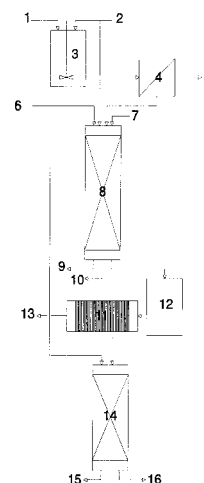


Figura 2

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

DESCRIPCION

Campo de la técnica

Procesos para la preparación y purificación de enzimas (C12N9).

Estado de la técnica

La aplicación industrial de los enzimas se ha establecido en los últimos años como una alternativa válida frente a procesos químicos convencionales. En este campo de la biotecnología las lipasas ocupan un lugar preferente debido a su versatilidad de acción sobre compuestos lipofílicos, y también a que un gran número de las mismas es asequible comercialmente, aún cuando sea como lipasa bruta. La lipasa más utilizada es con mucho la producción por la levadura *Candida rugosa* (anteriormente catalogada como *Candida cylindracea*) debido a su buena actividad tanto en diversas reacciones de hidrólisis [Benzonana, G., Esposito, S. *Biochim. Biophys. Acta* **231**, 15-22 (1971); Deleuze, H., Langrand, G., Millet, H., Barratti, J., Buono, G., Triantaphylides, C. *Biochim. Biophys. Acta* **911**, 117-120 (1987); Ballesteros, A., Bernabe, M., Cruzado, C., Martin-Lomas, M., Otero, C. *Tetrahedron* **45**, 7077-7082 (1989); Otero, C., Pastor, E., Fernandez, V.M., Ballesteros, A. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **23**, 237-246 (1990)] como de síntesis [Otero, C., Pastor, E., Ballesteros, A. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **26**, 35-44 (1990)]. La mayoría de los estudios llevados a cabo hasta la fecha con esta lipasa lo han sido con lipasas brutas cuyo grado de pureza es muy bajo (generalmente <10% de proteína y <1% de lipasa, relativos al peso total del extracto). La creciente necesidad de obtener compuestos puros de alto valor añadido mediante procesos reproducibles, ha aumentado notablemente el interés por la purificación y caracterización de los biocatalizadores. Para la producción industrial de enzimas se aprovecha que en muchos casos éstas son segregadas durante la fermentación al medio extracelular, lo cual facilita su posterior aislamiento sin necesidad de recurrir a la ruptura de las células. Este es el caso de la lipasa producida por la levadura *Candida rugosa*. A pesar del uso generalizado de esta lipasa, el progreso en el conocimiento a nivel fundamental de este enzima es inferior al logrado con otras lipasas. Prueba de ello es que hasta el año 1989 no se describe la existencia de dos enzimas extracelulares con actividad lipásica producida por *C. rugosa* [Veeraragavan, K., Gibbs, B.F. *Biotechnol. Lett.* **11**, 345-348 (1989); Brahimi-Horn, M., Guglielmino, M.L., Elling, L., Sparrow, L.G. *Biochim. Biophys. Acta* **1042**, 51-54 (1990); Shaw, J.F., Chang, C.H., Wang, Y.J. *Biotechnol. Lett.* **11**, 779-784 (1989); Wu, S.H., Guo, Z.V., Sih, C.J. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 1990-1995 (1990)]. Estas dos proteínas, similares en algunas propiedades moleculares, muestran diferencias en la especificidad de sustrato, lo cual aporta un interés adicional al desarrollo de métodos de purificación rápidos y sencillos. Existe un proceso patentado en el año 1989 que consta de tres pasos cromatográficos: una columna de intercambio iónico y dos columnas de exclusión molecular [Patente japonesa [89 80, 286] (Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 01 80, 286)]. Estos tipos de columnas son las

que se están utilizando en la bibliografía para la purificación de los isoenzimas lipasa de *C. rugosa* [Veeraragavan, K., Gibbs, B.F. *Biotechnol. Lett.* **11**, 345-348 (1989); Brahimi-Horn, M., Guglielmino, M.L., Elling, L., Sparrow, L.G. *Biochim. Biophys. Acta* **1042**, 51-54 (1990); Shaw, J.F., Chang, C.H., Wang, Y.J. *Biotechnol. Lett.* **11**, 779-784 (1989); Wu, S.H., Guo, Z.V., Sih, C.J. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 1990-1995 (1990)].

Breve descripción de la invención

La presente invención recoge un procedimiento rápido para la separación y purificación de dos isoenzimas lipasa en un sólo paso de cromatografía hidrofóbica, partiendo de una preparación bruta de lipasa procedente de una levadura. En esencia, consiste, como se muestra en la figura 1, en el paso de la disolución de la lipasa bruta en un tampón (1) a través de una columna (2) rellena con una matriz de agarosa hidrofóbica, la cual se eluye primero con la propia solución tampón (3) que arrastra las impurezas (6) y luego con la misma solución tampón más diluida (4), que arrastra la lipasa B (7). A continuación con un di ó polialcohol disuelto en la solución tampón diluida (5) se eluye la lipasa A (8), de cuya solución, posteriormente, se elimina el alcohol.

Descripción detallada de la invención

Como se muestra en la figura 2, la lipasa comercial en polvo (1), obtenida mediante un aislamiento bruto a partir de un cultivo de *Candida rugosa*, se solubiliza en una solución tamponada a pH 6-8 para lo que preferentemente se utiliza un tampón fosfato (por ejemplo una solución 0,25 M de fosfato (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄) preferentemente mediante agitación, en un tanque (3), más de una hora, hasta conseguir, en cualquier caso, disolver la mayor parte de la actividad lipásica. A continuación se desecha el material insoluble (5) por cualquier procedimiento de separación sólido-líquido, preferentemente por centrifugación (4). La solución resultante, que puede almacenarse en un depósito pulmón (no mostrado en la figura), se carga en una columna (8) rellena con una matriz de agarosa hidrofóbica (preferentemente una fenil-agarosa de tamaño de poro mediano en la proporción de un 4% de agarosa respecto al gel, aunque esta cifra no es limitativa), previamente equilibrada en el mismo tampón en el que se solubilizó el material de partida. Lavando intensamente la columna con un volumen de tampón de equilibrio (2) superior a dos veces el volumen total de la columna, se eluye un material fuertemente coloreado (9), sin actividad lipásica. A continuación, y con el tampón diluido al menos 50 veces (por ejemplo fosfato 1mM) (6), se eluye una fracción (10) con actividad correspondiente a la lipasa B, mientras que la lipasa A se eluye con el mismo tampón al que se le acciona un di ó polialcohol (7), preferentemente una solución al 50% (v/v) de etilenglicol. Las columnas utilizadas tienen una relación altura/diámetro de 3:1 o inferior. Aumentando 5,7 veces el volumen del lecho de columna se mejora el rendimiento respecto a unidades de actividad de la lipasa B, mientras que prácticamente no se afecta el rendimiento de la lipasa A. Aumentando la relación de carga de lipasa bruta (definida como gramos de polvo comercial cargado por ml de gel de fenil-agarosa) en

la columna se aumenta el rendimiento respecto a lipasa B pero disminuye el factor de purificación. La relación de carga admitida por la matriz debe ser estar comprendida entre 0.05 y 0.25, preferentemente entre 0.10 y 0.15.

La solución conteniendo la lipasa A, preferentemente se almacena en un depósito pulmón (11), para, posteriormente, después de concentrarla por ultrafiltración usando un filtro (12) que deja pasar sustancias de peso molecular menor de 30 kD (13), se elimina el disolvente orgánico haciéndola pasar a través de una columna de exclusión molecular (14), rellena con un gel de dextrano o un material análogo que excluya las substancias con peso molecular superior a 5 kD. La lipasa A se eluye de esta columna con la misma solución tampón diluida (6), obteniéndose, como en (10) una solución tamponada (15) de lipasa A. Posteriormente, y totalmente separado de la lipasa A, se eluye el polialcohol (16) que constituye un efluente a eliminar del proceso.

Las operaciones pueden realizarse dentro de un intervalo de temperaturas comprendidas entre 5 y 30°C.

Descripción de las figuras

Figura 1.

Esquema fundamental del proceso:

- [1] Solución tamponada a tratar.
- [2] Columna rellena con agarosa.
- [3] Solución de lavado (tampón concentrado).
- [4] Primera solución de elución (tampón diluido).
- [5] Segunda solución de elución (tampón diluido conteniendo di ó polialcohol).
- [6] Efluente.
- [7] Eluato de la primera operación (lipasa B).
- [8] Eluato de la segunda operación (lipasa A).

Figura 2.

- [1] Lipasa comercial (A+B+impurezas)
- [2] Solución tampón concentrada
- [3] Tanque
- [4] Separador sólido-líquido
- [5] Residuo sólido
- [6] Solución tampón diluida
- [7] Solución de di o polialcohol en tampón diluido
- [8] Columna de relleno
- [9] Efluente sin actividad enzimática
- [10] Solución tamponada de lipasa B
- [11] Depósito
- [12] Ultrafiltro

- [13] Ultrafiltrado
- [14] Columna de relleno
- [15] Solución Tamponada de lipasa A
- [16] Efluente sin actividad enzimática

Ejemplos

Ejemplo 1

Se pesan 0.6 g del polvo comercial de lipasa de la casa Sigma Chemical Co., USA y se resuspenden en 6 ml de tampón fosfato sódico 0.25 M, pH 7.0 (tampón de equilibrio). Esta relación (100 mg de sólido/ml de tampón) se mantiene constante en todos los ejemplos que se detallan. La mezcla se agita magnéticamente durante 90 min y posteriormente se centrifuga a 17.000 x g durante 20 min. El sobrenadante obtenido se carga directamente en una columna de 6.2 ml de volumen total (1.2 cm de diámetro interno y 5.5 cm de longitud) con un relleno hidrofóbico de Phenyl -sepharose[®] CL-4B (de la firma Pharmacia), equilibrada con el tampón de equilibrio. En estas condiciones la relación de carga, definida como g de polvo comercial cargados por ml de gel de Phenyl-sepharose[®] CL-4B, es de 0,1. Lavando intensamente la columna con un volumen de tampón de equilibrio igual o superior a dos veces el volumen de la columna y a un flujo de 40 ml/h, se eluye un material intensamente coloreado y sin actividad lipásica. A continuación se lava con tampón fosfato 1 mM (pH 7.0) para eluir las fracciones de actividad correspondientes a la lipasa B. La lipasa A se eluye con el mismo tampón al que se ha añadido etilenglicol en la proporción volumétrica 1:1. Para eliminar el etilenglicol, la muestra obtenida (6 ml) se concentra hasta 2,5 ml por ultrafiltración, usando una membrana PM30 (de la firma Amicon), y se carga en una columna de Sephadex[®] G-25 (de la firma Pharmacia). Esta columna se eluye con tampón fosfato sódico 1 mM (pH 7,0).

En todos los casos la actividad fue determinada en pH-estado, utilizando tributirina como sustrato lipásico, definiéndose una unidad de actividad (U) como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de ácido graso por minuto de reacción. Proteínas y azúcares neutros se determinaron, respectivamente, según el método de Lowry, con seroalbúmina de bovino como estándar [Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. *Biol. Chem.* **193**, 256-275 (1951)], y según el método del fenol -sulfúrico [Mckelvy, J.F., Lee, Y.C. *Arch. Biochem. Biophys.* **132**, 99-110 (1969)] con xilosa como estándar.

En las condiciones descritas las lipasas A y B se obtienen con un rendimiento, respecto a unidades totales de actividad lipasa en el sólido de partida, del 36 y del 20%, respectivamente; los factores de purificación (cociente de actividades específicas) fueron de 6 y 12. Las actividades específicas fueron 90 U/mg proteína (lipasa A) y 415 U/mg proteína (lipasa B). Más del 90% de los azúcares neutros presentes en la lipasa bruta se detectaron en la fracción no retenida en la columna de fenil-agarosa, mientras que en las fracciones con actividad el contenido fue del 0,3% (lipasa A) y del 0,15% (lipasa B).

En los ejemplos que se detallan a continuación se estudia el efecto del escalado (con una columna de volumen 5,7 veces mayor) y de la relación de carga sobre el factor de purificación y sobre el rendimiento en lipasa B, mayoritaria en el extracto de partida.

Ejemplo 2

Se utiliza una columna de 2,5 cm de diámetro por 7 cm de longitud. para mantener la misma relación de carga del ejemplo 1 se parte de 3,4 g de polvo comercial, que después de ser sometido al mismo proceso, se carga en la columna. Las condiciones de elución para los dos lipasas fueron las descritas en el caso anterior salvo el flujo que fue de 60 ml/h. En estas condiciones la lipasa A se obtiene con un rendimiento del 22% y la lipasa B aumenta hasta el 60%. La actividad específica final de esta lipasa es de 960 U/mg proteína, lo que significa un factor de purificación de 11.

Ejemplo 3

En la misma columna del ejemplo anterior se cargan 5 g del polvo comercial, con lo que se aumenta la relación de carga hasta 0,15. La preparación de las muestras, así como las condiciones de elución fueron las mismas que en el ejemplo 2. Las lipasas A y B se obtuvieron con un rendimiento del 14% y del 71%, respectivamente. Para la lipasa B la actividad específica fue de 325 U/mg proteína, con un factor de purificación de 4,8.

Ejemplo 4

En la misma columna de los ejemplos 2 y 3 se cargan 7 g del polvo comercial para obtener una relación de carga de 0,2. Las lipasas A y B se obtienen con un rendimiento del 19% y del 80%, respectivamente. La actividad específica de la lipasa B es de 185 U/mg proteína, con un factor de purificación de 2,8.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la purificación de dos isoenzimas lipasa de *Candida rugosa*, mediante el tratamiento del producto solubilizado en una columna de cromatografía, **caracterizado** porque el producto a purificar se disuelve en una solución tampón para un pH entre 6 y 8, preferentemente una solución 0,25 M de fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$), pasándola a través de una columna cromatográfica con un relleno hidrofóbico; a continuación la columna se lava dos veces, primero con la misma solución tampón para arrastrar las impurezas y luego con la misma solución tampón, diluida por lo menos 50 veces, para arrastrar la lipasa B; posteriormente se eluye con un di o polialcohol disuelto en el tampón, lo que da lugar a una solución alcohólica que arrastra la lipasa A, de cuya solución, mediante concentración por ultrafiltración y cromatografía de exclusión molecular con un gel de dextrano, se elimina el alcohol.

2. Procedimiento para la purificación de dos isoenzimas lipasa de *Candida rugosa* según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el di o polialcohol empleado para la elución de la lipasa A

es preferentemente etilenglicol y la proporción volumétrica con el tampón es de 1 a 1.

3. Procedimiento para la purificación de dos isoenzimas lipasa de *Candida rugosa*, según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque el relleno de la columna hidrofóbica es, preferentemente, una fenil -agarosa de tamaño de poro mediano, preferentemente en una proporción del 4% de agarosa en el gel.

4. Procedimiento para la purificación de dos isoenzimas lipasa de *Candida rugosa*, según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la relación altura/diámetro de la columna es 3:1 ó inferior, preferentemente es 3:1 ó inferior, preferentemente de un diámetro de 2 cm.

5. Procedimiento para la purificación de dos isoenzimas lipasa de *Candida rugosa*, según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque las columnas se desarrollan a flujos comprendidos entre 25 y 50 cm/h.

6. Procedimiento para la purificación de dos isoenzimas lipasa de *Candida rugosa*, según las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque la relación de carga admitida por la matriz debe ser estar comprendida entre 0.05 y 0.25, preferentemente entre 0.10 y 0.15.

30

35

40

45

50

55

60

65

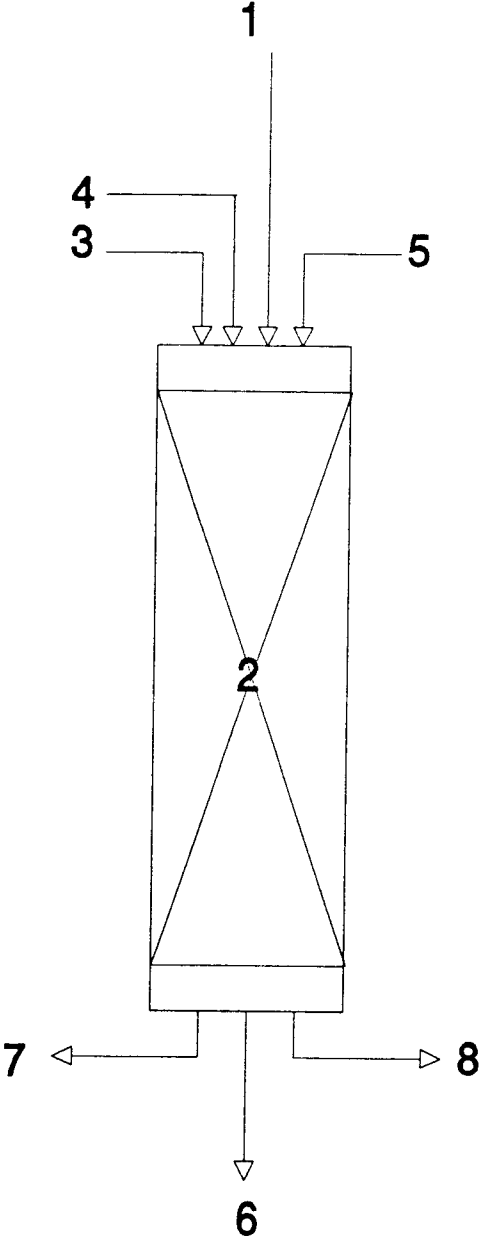


Figura 1

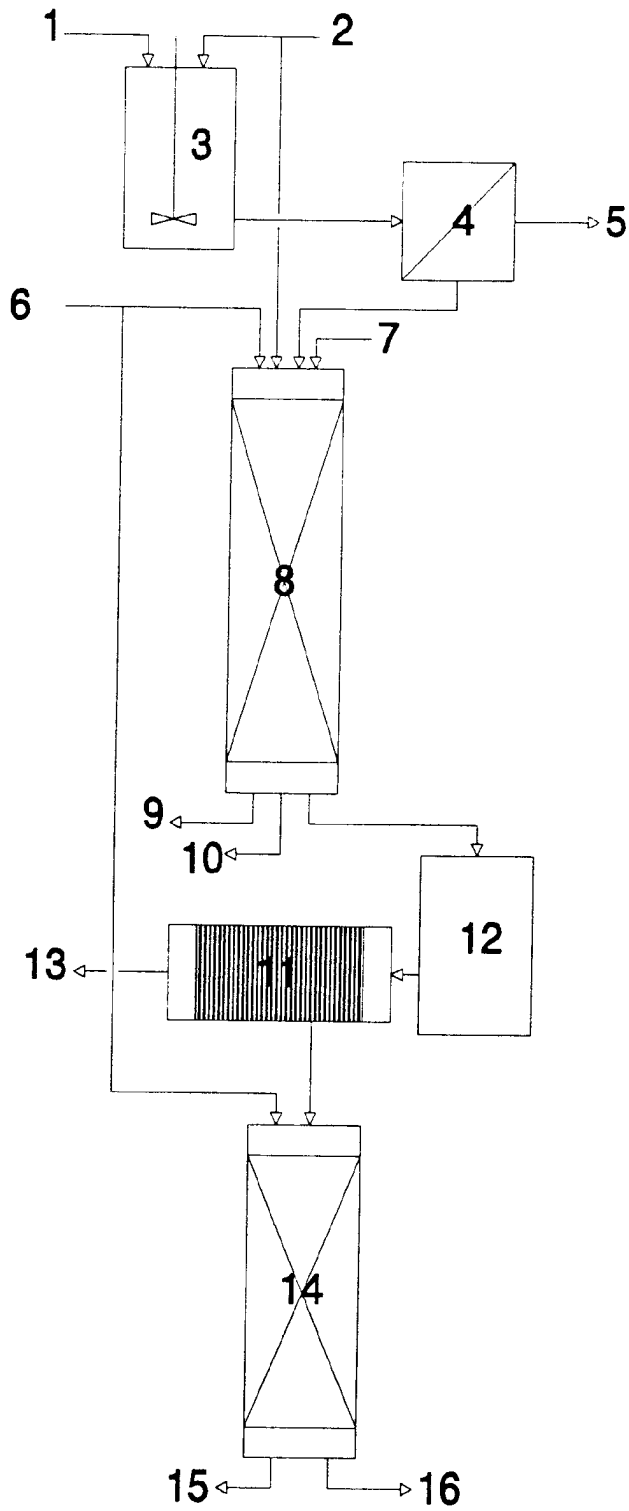


Figura 2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ① ES 2 050 068
② N.º solicitud: 9201378
③ Fecha de presentación de la solicitud: 03.07.92
④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁵: C12N 9/20, C07K 3/20

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO-A-9015146 (Rhone-Poulenc Inc.) * Pag. 35-37, ejemplos 11,12 *	1-6

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.º:

Fecha de realización del informe

03.03.94

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/1