



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 330 594**

51 Int. Cl.:  
**C12N 11/00** (2006.01)  
**C08G 77/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08155937 .9**  
96 Fecha de presentación : **09.05.2008**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2011865**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.01.2009**

54 Título: **Preparados de enzimas.**

30 Prioridad: **06.07.2007 DE 10 2007 031 689**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**11.12.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**11.12.2009**

73 Titular/es: **Evonik Goldschmidt GmbH**  
**Goldschmidtstrasse 100**  
**45127 Essen, DE**

72 Inventor/es: **Thum, Oliver;**  
**Ansorge-Schumacher, Marion;**  
**Wiemann, Lars y**  
**Buthe, Andreas**

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Preparados de enzimas.

La invención se refiere a preparados de enzimas de nueva clase para aplicación como biocatalizadores.

Microorganismos y enzimas aisladas encuentran utilización extendida como catalizador en la industria química o en la producción de alimentos. Una reseña ofrece por ejemplo: A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH: 2000, Weinheim, Alemania.

Para garantizar la utilización económica de tales biocatalizadores, deben cumplirse varias condiciones: el biocatalizador tiene que ser activo en las condiciones de reacción durante un tiempo suficientemente largo, debería separarse fácilmente una vez terminada la reacción y poder reutilizarse el mayor número de veces posible. Idealmente, estas condiciones deberían cumplirse en un campo lo más amplio posible de condiciones de reacción (p.ej. campo de temperatura, clase de los disolventes empleados, presiones, etc), a fin de proporcionar un catalizador lo más universal posible.

A fin de cumplir estas condiciones, es habitualmente necesario inmovilizar las enzimas o microorganismos que contienen enzimas empleados.

En muchos casos, las enzimas o los microorganismos que contienen enzimas se inmovilizan sobre soportes de modo no covalente, empleándose a menudo como soportes resinas cambiadoras de iones o partículas de polímeros, que poseen distribuciones granulométricas apropiadas. Ejemplos de éstos son los productos comerciales Novozym 435, Lipozym RM IM o Lipozym TL IM de la firma Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca, o Amano PS, de la firma Amano, Japón. En estos ejemplos se trata de lipasas inmovilizadas, que encuentran aplicación extendida, dado que tales inmovilizados exhiben también actividades técnicamente útiles en sistemas no acuosos, es decir sistemas que no contienen disolvente alguno o contienen únicamente disolventes orgánicos, como se describe p.ej. en *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* 1989, 934-935. Inconveniente respecto a la utilización de tales inmovilizados es, sin embargo, por una parte la desorción de la enzima o de los microorganismos que contienen enzimas que tiene lugar dependiendo del sistema de reacción empleado, por ejemplo en el caso del empleo de componentes tensioactivos. La pérdida de actividad asociada con dicha desorción se muestra en el Ejemplo Comparativo 1. Adicionalmente, tales preparados exhiben una estabilidad mecánica insuficiente, por lo cual no es posible el empleo en reactores simples provistos de agitación o lo es sólo aceptando una reutilizabilidad claramente limitada. La inestabilidad mecánica de tales preparados se muestra en el Ejemplo Comparativo 2.

A fin de hacer posible el empleo repetido de tales preparados enzimáticos, tienen que emplearse por tanto otros conceptos de reactor. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2003, 105, 601-607 describe por ejemplo el empleo de un reactor de lecho fijo para la realización de esterificaciones catalizadas por lipasas. El inconveniente de este proceso es sin embargo la limitación a mezclas de reacción homogéneas de baja viscosidad, dado que las mezclas o suspensiones muy viscosas no pueden ser transportadas a través de un lecho fijo.

K. Faber "Biotransformations in Organic Chemistry", Springer: 2000, Berlín, Alemania, describe en la página 384 y siguientes la utilización de enzimas incluidas en alginatos. Sin embargo, los preparados así obtenidos exhiben una estabilidad mecánica extraordinariamente pequeña y exhiben sólo una actividad muy reducida en sistemas no acuosos.

Adicionalmente, se describe la reticulación transversal ulterior de las enzimas inmovilizadas con sustancias reactivas como p.ej. dialdehído glutárico. Por otra parte, es un inconveniente la actividad específica claramente reducida en la mayor parte de los casos de los preparados reticulados transversalmente en comparación con la actividad antes de la modificación. Adicionalmente, este proceso no proporciona aportación alguna a la mejora de la estabilidad mecánica.

Se describe también en dicho documento la inmovilización covalente de enzimas sobre soportes reactivos. En este caso es inconveniente el hecho de que tienen que estar presentes en la superficie de la enzima grupos funcionales apropiados que puedan reaccionar con el soporte, produciéndose adicionalmente con ello en muchos casos una pérdida de actividad enzimática.

*J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 9487-9496 describe la inclusión de enzimas en matrices de siloxano, denominadas sol-geles. El inconveniente en las preparaciones sol-gel es la reducida distribución granulométrica, que dificulta una filtración eficiente, la insuficiente estabilidad mecánica, la desorción que tiene lugar, el empleo de sustancias reaccionantes tóxicas (respecto a la toxicidad de TEOS véase p.ej. *Nippon Sanso Giho* 1990, 9, 68-72 y *Archives of Toxicology* 1994, 68, 277-283; para la toxicidad de TMOS véase p.ej. *Fundamental and Applied Toxicology* 1989, 13, 285-295; para la producción de sol-geles no tóxicos son necesarios pasos costosos, p.ej. almacenamiento durante 6 meses o tratamiento térmico a 350°C, como se describe en *Polimery w Medycynie* 2000, 30, 45-54, así como el comportamiento de hinchamiento que depende muy acusadamente del disolvente empleado, lo que no permite una utilización universal en diferentes sistemas de reacción (acuosa y no acuosa). *J. Sol Gel Sci. Technol.* 2003, 26, 1183-1187 demuestra por ejemplo la dependencia de disolvente de la actividad enzimática observada y con ello el incumplimiento de la exigencia de utilizabilidad amplia.

Landbauforschung Völkenrode, 2002, Sonderheft 241, 41-46 describe preparados sol-gel, en los cuales las enzimas se inmovilizan primeramente sobre partículas de silicona "finas" y a continuación se encapsulan en un sol-gel. De este modo se resuelve parcialmente el problema de la estabilidad mecánica, pero los experimentos descritos demuestran que se obtienen actividades suficientes solamente en disolventes seleccionados, no describiéndose en absoluto la utilización en sistemas exentos de disolvente. Adicionalmente, las preparaciones se obtienen en una forma no utilizable directamente, sino que deben fraccionarse en primer lugar en tamaños ajustados, lo cual es difícilmente realizable en escala industrial.

J. Mol. Catal. B, 2005, 35, 93-99 describe la inmovilización de enzimas por inclusión de soluciones enzimáticas acuosas en esferas de silicona mecánicamente estables, denominadas emulsiones estáticas. Sin embargo, las actividades específicas obtenidas de los preparados, con hasta 33 U/g, son evidentemente demasiado pequeñas en comparación con los inmovilizados sobre soportes inertes descritos anteriormente, en los que pueden alcanzarse fácilmente actividades específicas superiores a 1000 U/g (U = unidad o  $\mu\text{mol/min}$ ).

WO 03/106607 A1 describe asimismo emulsiones estáticas de este tipo, pero se describe únicamente la utilización en sistemas acuosos, al ser la aplicación una formulación de detergente, es decir que no se trata de una biocatálisis, y las granulometrías obtenidas son, con aprox. 10  $\mu\text{m}$ , demasiado pequeñas para una filtración eficiente de mezclas de reacción orgánicas.

Persiste por tanto adicionalmente necesidad de métodos para la inmovilización de enzimas, que resuelvan los inconvenientes de la técnica actual, para llevar a la práctica procesos biocatalíticos no realizables hasta ahora.

Objeto de la presente invención ha sido por tanto la puesta a disposición de preparaciones enzimáticas, que no presentan uno o varios de los inconvenientes de los preparados de la técnica anterior. Particularmente, deberían proporcionarse preparados enzimáticos que exhiban una alta estabilidad frente a los esfuerzos mecánicos y frente a la desorción y posean con preferencia en este contexto actividades específicas en mezclas de reacción diferentes acuosas y no acuosas, que sean suficientemente altas para hacer posible una aplicación industrial. Con preferencia, los preparados enzimáticos deberían ser apropiados por su distribución granulométrica para poder separarse fácilmente del sistema de reacción y reutilizarse.

Otros objetos no mencionados explícitamente se deducen del contexto de la descripción que sigue, de los ejemplos y de las reivindicaciones.

Sorprendentemente, se ha encontrado que estos objetos son resueltos por preparados enzimáticos, que se obtienen por inmovilización de enzimas o microorganismos que contienen enzimas sobre un soporte inerte y revestimiento subsiguiente con un recubrimiento de silicona obtenido por hidrosililación.

Objeto de la presente invención son por tanto preparados enzimáticos, que se obtienen de tal manera que inmovilizados enzimáticos que exhiben enzimas o microorganismos que contienen enzimas inmovilizados sobre un soporte inerte, se proveen de un recubrimiento de silicona obtenido por hidrosililación, así como su utilización como biocatalizador industrial.

Adicionalmente, es objeto de la presente invención un proceso para la producción de los preparados enzimáticos correspondientes a la invención, que se caracteriza porque inmovilizados enzimáticos que exhiben enzimas o microorganismos que contienen enzimas inmovilizados sobre un soporte inerte, se proveen de un recubrimiento de silicona obtenido por hidrosililación.

Los preparados enzimáticos correspondientes a la invención presentan la ventaja de que exhiben una alta estabilidad frente a los esfuerzos mecánicos y frente a la desorción. A pesar de estas propiedades mejoradas, los preparados enzimáticos correspondientes a la invención exhiben actividades específicas en diversas mezclas de reacción acuosas (p.ej. en la hidrólisis de tributirina) o no acuosas (p.ej. en la síntesis de laurato de propilo exenta de disolvente), que son lo bastante altas para hacer posible una utilización industrial. Los preparados enzimáticos correspondientes a la invención presentan adicionalmente la ventaja de que, por la elección del material soporte y de la distribución granulométrica inherente a ello, el tamaño de partícula puede ajustarse de tal manera que se hace posible una separación fácil de los preparados enzimáticos del sistema de reacción y por consiguiente también la reutilización de los preparados enzimáticos.

Los preparados enzimáticos correspondientes a la invención, así como un proceso para su producción se describen a continuación a modo de ejemplo, sin que la invención deba considerarse limitada a estas formas de realización ilustrativas. En los casos en que se indican a continuación campos, fórmulas generales o clases de compuestos, éstos no deben abarcar sólo los campos o grupos de compuestos respectivos que se mencionan explícitamente, sino también todos los campos parciales y grupos parciales de compuestos, que se pueden obtener por extracción de los valores (campos) o compuestos individuales.

Cuando en el marco de la presente invención se describen compuestos, como p.ej. polisiloxanos organomodificados, que pueden exhibir repetidamente unidades diferentes, éstas pueden estar presentes distribuidas estadísticamente (oligómero estadístico) u ordenadas (oligómero de bloques) en dichos compuestos. Los datos referidos al número de unidades en tales compuestos deben entenderse como valor medio, ponderado para todos los compuestos respectivos.

Así pues, los preparados enzimáticos correspondientes a la invención se caracterizan porque inmovilizados enzimáticos que exhiben enzimas o microorganismos que contienen enzimas inmovilizados sobre un soporte inerte, están provistos de un recubrimiento de silicona, que se obtiene por hidrosililación.

Para la producción de los inmovilizados enzimáticos pueden emplearse células enteras, células en reposo, enzimas purificadas o extractos de células que contienen las enzimas respectivas, o mezclas de los mismos. Se emplean con preferencia enzimas hidrolíticas, p.ej. lipasas, esterases o proteasas, como por ejemplo lipasas de *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Pseudomonas sp.*, *Thermomyces langosiosus*, páncreas de cerdo, *Mucor miehei*, *Alcaligines sp.*, colesteroesterasas de *Candida rugosa*, esterases de hígado de cerdo, de modo particularmente preferido lipasas. Por consiguiente, los inmovilizados enzimáticos contienen con preferencia enzimas de la clase de las hidrolasas, con preferencia lipasas.

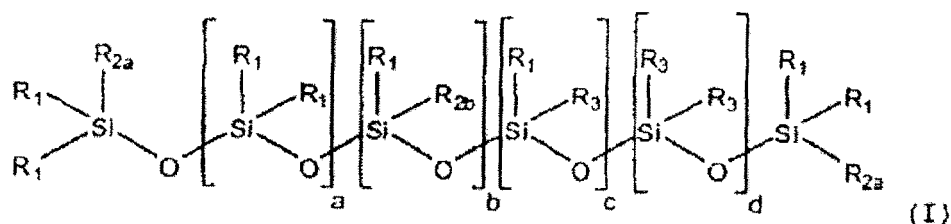
Como soporte inerte pueden emplearse soportes orgánicos o inorgánicos. Con preferencia se emplean o se encuentran en el inmovilizado enzimático como soporte inerte soportes particulados de este tipo que exhiben una distribución de tamaños de partícula en la cual al menos 90% de las partículas tienen un tamaño de partícula de 10 a 5000  $\mu\text{m}$ , con preferencia de 50  $\mu\text{m}$  a 2000  $\mu\text{m}$ . Como soporte orgánico pueden emplearse particularmente materiales de esta clase que contienen poliacrilato, polimetacrilato, polivinilestireno, copolímeros estireno-divinilbenceno, polipropileno, polietileno, poli(tereftalato de etileno), PTFE y/u otros polímeros, o que están constituidos por éstos. Como material soporte pueden emplearse, dependiendo de la enzima a inmovilizar, particularmente resinas cambiadoras de iones ácidas o básicas, por ejemplo Duolite A568, Duolite XAD 761, Duolite XAD 1180, Duolite XAD 7HP, Amberlite IR 120, Amberlite IR 400, Amberlite CG 50, Amberlyst 15 (todos ellos productos de la firma Rohm und Haas) o Lewatit CNP 105 y Lewatit VP OC 1600 (productos de la firma Lanxess, Leverkusen, Alemania). Como soportes inorgánicos pueden emplearse soportes de tipo óxido y/o cerámicos conocidos en la técnica. Como soportes inorgánicos pueden emplearse particularmente por ejemplo celita, zeolitas, sílice, vidrio de poro controlado (CPG) u otros soportes, como se describen por ejemplo en L. Cao, "Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design", Wiley-VCH: 2005, Weinheim, Alemania. De modo particularmente preferido, los soportes inertes inherentes presentes en el inmovilizado enzimático o los soportes inertes empleados para la producción de los inmovilizados enzimáticos están constituidos por polivinilestireno, polimetacrilato o poliacrilato.

La inmovilización en las partículas puede realizarse de acuerdo con la invención de modo covalente o no covalente, con preferencia de modo no covalente. Para la inmovilización no covalente, el soporte puede incubarse o impregnarse p.ej. con una solución enzimática acuosa, que puede contener opcionalmente otros ingredientes, como p.ej. sales inorgánicas o detergentes. Esta incubación/impregnación puede realizarse p.ej. a temperaturas comprendidas entre 0°C y 50°C, de modo particularmente preferible entre 0°C y 40°C. Con preferencia, la incubación/impregnación tiene lugar en un periodo de varios minutos hasta varias horas. El avance de la incubación puede seguirse por determinación de la concentración de enzima en la solución con el proceso usual para la determinación de proteínas. Una vez alcanzado el grado de inmovilización deseado, el soporte puede lavarse con preferencia con agua y, en caso deseado, secarse. Un inmovilizado enzimático así obtenido puede proveerse a continuación de acuerdo con la invención de un recubrimiento de silicona.

De acuerdo con la invención pueden emplearse también sin embargo inmovilizados enzimáticos que se pueden obtener en el comercio, por ejemplo Novozym 435, Lipozym RM IM o Lipozym TL IM, de la firma Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca, o Amano PS, de la firma Amano, Japón.

El recubrimiento de silicona se obtiene de acuerdo con la invención por hidrosililación. Para ello se hacen reaccionar con preferencia polisiloxanos con funcionalidad Si-H en presencia de catalizadores, con preferencia catalizadores de metales de transición, con polisiloxanos organomodificados que tienen al menos un enlace doble carbono-carbono en posición terminal, con preferencia al menos dos enlaces dobles de este tipo.

Como polisiloxanos con funcionalidad Si-H se emplean con preferencia SiH-polisiloxanos de la fórmula general I,



donde son:

$$N = a+b+c+d+2 = 3 \text{ a } 850, \text{ con preferencia } 6 \text{ a } 160,$$

$$a = 1 \text{ a } 800, \text{ con preferencia } 2 \text{ a } 150,$$

## ES 2 330 594 T3

b = 0 a 400, con preferencia 2 a 75,

c = 0 a 10, con preferencia 0,

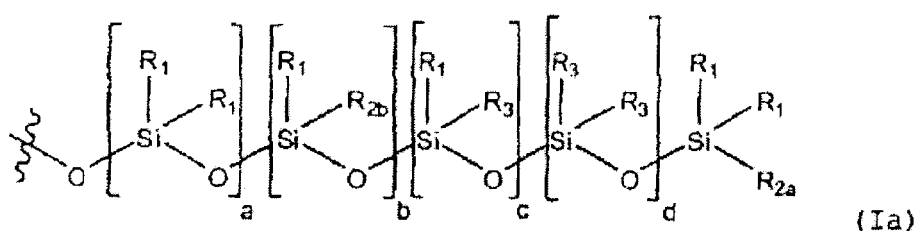
d = 0 a 10, con preferencia 0,

$R_1$ , independientemente unos de otros, iguales o diferentes, seleccionados del grupo que comprende: grupos alquilo saturados o insaturados, opcionalmente ramificados con 1 a 30 átomos C, restos alcarilo con 7 a 30 átomos C, restos arilo con 6 a 30 átomos C, con preferencia grupos alquilo con 1 a 4 átomos C o fenilo, especialmente metilo;

$R_{2a}$ , independientemente unos de otros, hidrógeno o  $R_1$ ;

$R_{2b}$ , independientemente unos de otros, hidrógeno o  $R_1$ ;

$R_3$ , independientemente unos de otros, restos iguales o diferentes de la fórmula general (Ia)



donde son:

$N = a+b+c+d+2 = 3$  a 850, con preferencia 6 a 160,

a = 1 a 800, con preferencia 2 a 150,

b = 0 a 400, con preferencia 2 a 75,

c = 0 a 10, con preferencia 0,

d = 0 a 10, con preferencia 0,

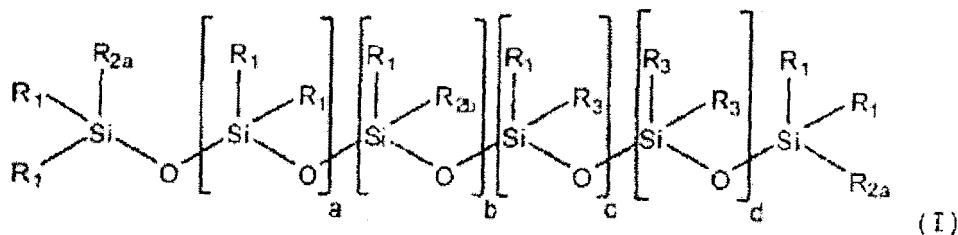
$R_1$ , independientemente unos de otros, iguales o diferentes, seleccionados del grupo que comprende: grupos alquilo saturados o insaturados, opcionalmente ramificados con 1 a 30 átomos C, restos alcarilo con 7 a 30 átomos C, restos arilo con 6 a 30 átomos C, con preferencia grupos alquilo con 1 a 4 átomos C o fenilo, particularmente metilo;

$R_{2a}$ , independientemente unos de otros, hidrógeno o  $R_1$ ;

$R_{2b}$ , independientemente unos de otros, hidrógeno o  $R_1$ ;

$R_3$ , independientemente unos de otros, restos iguales o diferentes de la fórmula general Ia o un resto  $R_1$ .

Con preferencia, se emplea como polisiloxano con funcionalidad SiH un polisiloxano de la fórmula general (I)



donde son:

$N = a+b+c+d+2 = 6$  a 160,

# ES 2 330 594 T3

a = 2 a 150,

b = 2 a 75,

c = 0,

d = 0,

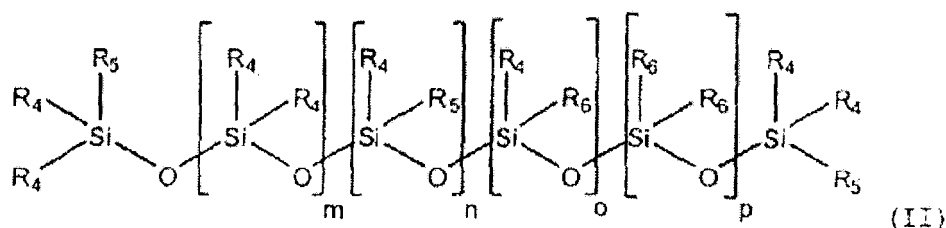
R<sub>1</sub>, independientemente unos de otros, iguales o diferentes, seleccionados del grupo que comprende: grupos alquilo saturados o insaturados, opcionalmente ramificados con 1 a 30 átomos C, restos alcarilo con 7 a 30 átomos C, restos arilo con 6 a 30 átomos C, con preferencia grupos alquilo con 1 a 4 átomos C o fenilo, particularmente metilo;

R<sub>2a</sub>, independientemente unos de otros, hidrógeno o R<sub>1</sub>;

R<sub>2b</sub>, independientemente unos de otros, hidrógeno o R<sub>1</sub>.

Es habitual para los expertos, que los compuestos están presentes o pueden estar presentes en forma de una mezcla con una distribución regulada esencialmente por leyes estadísticas. Los valores para los índices a, b, c y d representan por tanto habitualmente valores medios.

De acuerdo con la invención, como pareja de reacción olefínica, es decir como polisiloxanos que contienen enlaces dobles carbono-carbono en posición terminal, se emplean con preferencia polisiloxanos de la fórmula general II:



donde son:

N = m+n+o+p+2 = 3 a 1000, con preferencia 10 a 600,

m = 1 a 800, con preferencia 2 a 600,

n = 0 a 20, con preferencia 0 a 10, más con preferencia 0,

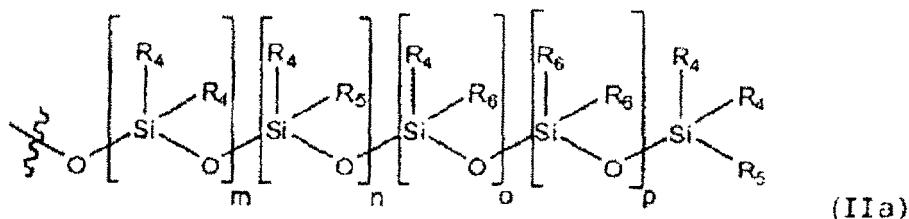
o = 0 a 10, con preferencia 0,

p = 0 a 10, con preferencia 0,

R<sub>4</sub>, independientemente unos de otros, iguales o diferentes y son del grupo siguiente: grupos alquilo saturados o insaturados, opcionalmente ramificados con 1 a 30 átomos C, restos alcarilo con 7 a 30 átomos C, restos arilo con 6 a 30 átomos C, con preferencia grupos alquilo con 1 a 4 átomos C o fenilo, particularmente metilo;

R<sub>5</sub>, independientemente unos de otros, un resto alquilo insaturado terminal, con preferencia vinilo, o un resto alcóxilo, con preferencia con 3 a 20 átomos C, o R<sub>4</sub>;

R<sub>6</sub>, independientemente unos de otros, restos iguales o diferentes de la fórmula general IIa



## ES 2 330 594 T3

donde son:

$$N = m+n+o+p+2 = 3 \text{ a } 1000, \text{ con preferencia } 10 \text{ a } 600,$$

$$m = 1 \text{ a } 800, \text{ con preferencia } 2 \text{ a } 600,$$

$$n = 0 \text{ a } 20, \text{ con preferencia } 0 \text{ a } 10, \text{ con preferencia } 0,$$

$$o = 0 \text{ a } 10, \text{ con preferencia } 0,$$

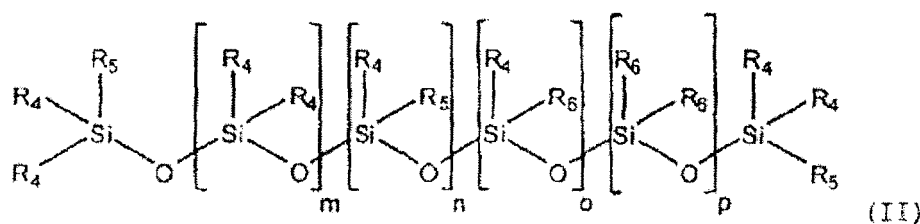
$$p = 0 \text{ a } 10, \text{ con preferencia } 0,$$

$R_4$ , independientemente unos de otros, iguales o diferentes y son del grupo siguiente: grupos alquilo saturados o insaturados, opcionalmente ramificados con 1 a 30 átomos C, restos alcarilo con 7 a 30 átomos C, restos arilo con 6 a 30 átomos C, con preferencia grupos alquilo con 1 a 4 átomos C o fenilo, particularmente metilo;

$R_5$ , independientemente unos de otros, un resto alquilo insaturado terminal, con preferencia vinilo, o un resto alcóxido, con preferencia con 3 a 20 átomos C, o  $R_4$ ;

$R_6$ , independientemente unos de otros, restos iguales o diferentes de la fórmula general IIa o restos  $R_4$ .

Como polisiloxanos que contienen enlace doble carbono-carbono en posición terminal se utilizan con preferencia polisiloxanos de la fórmula general II:



donde son:

$$N = m+n+o+p+2 = 10 \text{ a } 600,$$

$$m = 2 \text{ a } 600,$$

$$n = 0,$$

$$o = 0,$$

$$p = 0,$$

$R_4$ , independientemente unos de otros, iguales o diferentes y son del grupo siguiente: grupos alquilo saturados o insaturados, opcionalmente ramificados con 1 a 30 átomos C, restos alcarilo con 7 a 30 átomos C, restos arilo con 6 a 30 átomos C, con preferencia grupos alquilo con 1 a 4 átomos C o fenilo, particularmente metilo;

$R_5$ , independientemente unos de otros, un resto alquilo insaturado terminal, con preferencia vinilo, o un resto alcóxido, con preferencia con 3 a 20 átomos C.

Es habitual para el experto, que los compuestos de la fórmula II están presentes o pueden estar presentes en forma de una mezcla con una distribución regulada esencialmente por leyes estadísticas. Los valores para los índices m, n, o, y p representan por tanto habitualmente valores medios.

La hidrosililación puede realizarse según métodos establecidos en presencia de un catalizador. Para ello pueden utilizarse por ejemplo los catalizadores que se emplean para hidrosililaciones, como por ejemplo complejos de platino, rodio, osmio, rutenio, paladio o iridio o compuestos análogos, o los elementos respectivos puros o sus derivados inmovilizados sobre sílice, óxido de aluminio o carbón activo o materiales soporte análogos. Con preferencia, la hidrosililación se realiza en presencia de catalizadores de platino como cisplatino o el catalizador de Karstedt [Tris (diviniltetrametildisiloxano)bis-platino].

## ES 2 330 594 T3

Con preferencia, la cantidad empleada de catalizador es  $10^{-7}$  hasta  $10^{-1}$  mol por mol de olefina o por mol de enlace doble carbono-carbono en posición terminal, con preferencia 1 a 100 ppm. La hidrosililación se realiza con preferencia a temperaturas comprendidas entre 0 y 200°C, con preferencia de 0 a 120°C.

5 La hidrosililación puede realizarse en presencia o en ausencia de disolvente. Por regla general no son necesarios disolventes para la realización de la reacción. Sin embargo, la reacción puede realizarse en disolventes apropiados, como por ejemplo hidrocarburos alifáticos o aromáticos, oligosiloxanos cíclicos, alcoholes o ésteres. Disolventes apropiados son particularmente ciclohexano o tolueno.

10 De acuerdo con la invención, se utiliza con preferencia, referido al peso de soporte empleado, 1 a 500% en peso, con preferencia 10 a 200% en peso, y de modo particularmente preferible 20 a 150% en peso de componentes siloxano. Los componentes siloxano están integrados particularmente por la suma de los compuestos de la fórmula I y II o de sus productos de reacción.

15 La hidrosililación puede realizarse con empleo de las relaciones más diversas de los compuestos de las fórmulas I a compuestos de las fórmulas II. Con preferencia, la hidrosililación se realiza con una relación molar referida a los grupos reactivos de 1:10 hasta 10:1, con preferencia de 1:5 a 5:1, de modo particularmente preferible desde 1:1,1 a 1,1:1, y de modo muy particularmente preferible de 1:1. Por elección de los compuestos empleados de la fórmula general I y II y modificación de sus relaciones de mezcla pueden adaptarse las propiedades del recubrimiento de silicona a la medida en lo que respecta a la permeabilidad para los sustratos y otras propiedades de reacción. Por elección de la relación en peso de componentes de silicona a inmovilizados enzimáticos pueden modificarse los espesores de capa del recubrimiento de silicona y ajustarse a los requerimientos respectivos.

25 El recubrimiento de silicona correspondiente a la invención, producido por hidrosililación, puede obtenerse realizando la hidrosililación en presencia del inmovilizado enzimático. Sin embargo, es posible también obtener los revestimientos aplicando subsiguientemente sobre los inmovilizados enzimáticos un siloxano obtenido por hidrosililación. Esto puede realizarse p.ej. por tratamiento del inmovilizado enzimático con una solución del siloxano, p.ej. una solución de siloxano en un disolvente orgánico, particularmente ciclohexano o tolueno. A continuación puede separarse el disolvente p.ej. por vaporización. La concentración de siloxano en una solución de este tipo es preferentemente 10 a 100% en peso, con preferencia 30 a 100% en peso. Con preferencia, el recubrimiento de silicona correspondiente a la invención se obtiene sin embargo de tal manera que la hidrosililación se realiza en presencia del inmovilizado enzimático.

35 Los preparados enzimáticos correspondientes a la invención se producen con preferencia por el proceso correspondiente a la invención que se describe a continuación. Este proceso para la producción de preparados enzimáticos se caracteriza porque inmovilizados enzimáticos que exhiben enzimas o microorganismos que contienen enzimas inmovilizados sobre un soporte inerte se proveen de un recubrimiento de silicona obtenido por hidrosililación.

40 Con preferencia, el proceso correspondiente a la invención se realiza de tal manera que los inmovilizados enzimáticos se proveen de un recubrimiento de silicona de tal modo que los inmovilizados enzimáticos se ponen en contacto en condiciones de hidrosililación con una mezcla de reacción, que exhibe polisiloxanos con funcionalidad SiH, polisiloxanos que contienen enlaces dobles carbono-carbono en posición terminal y un catalizador que cataliza la hidrosililación. El proceso puede realizarse particularmente de tal manera que se realiza una reacción de hidrosililación en presencia de inmovilizados enzimáticos que exhiben enzimas o microorganismos que contienen enzimas inmovilizados sobre un soporte inerte. Debido a la silicona que se forma durante la hidrosililación, el inmovilizado enzimático puede proveerse de un recubrimiento de silicona.

50 La hidrosililación puede realizarse de una manera conocida por los expertos. Con preferencia, la hidrosililación se realiza con empleo de los parámetros/materias primas/catalizadores arriba mencionados.

En una forma de realización preferida del proceso correspondiente a la invención, una cantidad determinada de inmovilizado enzimático se trata con una mezcla (mezcla de reacción) de los reactivos de silicona (compuestos de las fórmulas I y II más catalizador) se trata, por ejemplo por adición de una mezcla que contiene compuestos de la fórmula general I y de la fórmula general II y catalizador de Karstedt. Así, puede p.ej. añadirse a 1 g de un inmovilizado enzimático una mezcla de compuestos de las fórmulas I y II en la relación molar de 10:1 a 1:10, así como catalizador de Karstedt, p.ej. 50 ppm referido a la cantidad presente de componentes de silicona. Con objeto de optimizar las propiedades del recubrimiento puede ser ventajoso disolver los componentes de silicona con inclusión del catalizador antes de la adición en un disolvente, por ejemplo ciclohexano, tolueno o cualquier otro disolvente orgánico, y añadir luego la solución al inmovilizado enzimático. Si se emplea por ejemplo ciclohexano como disolvente, se ha comprobado que es ventajoso, después de la adición de la solución a los inmovilizados enzimáticos dispersar concienzudamente esta mezcla durante aprox. 15 a 30 min, p.ej. por medio de un agitador turbulento (Ika, etapa 9), hasta que se ha evaporado una mayor parte del ciclohexano.

65 A continuación, los preparados enzimáticos obtenidos se secan o se curan en el armario secador a 50°C por ejemplo durante 12 horas. Por variación de las relaciones de mezcla de los compuestos de la fórmula general I y II, pueden modificarse sin problema alguno las propiedades del recubrimiento de silicona y ajustarse a los requerimientos respectivos.

Otra forma de realización del proceso correspondiente a la invención se diferencia de la forma de realización mencionada anteriormente en que los inmovilizados enzimáticos a revestir se sumergen en la mezcla de reacción deseada, se retiran subsiguientemente de la mezcla de reacción y se secan. La retirada puede realizarse p.ej. con empleo de un tamiz, que retiene las partículas del inmovilizado enzimático. La duración de inmersión es preferiblemente de 1 a 10 minutos. El secado puede realizarse en un armario secador convencional. Preferiblemente, el secado/curado se realiza a una temperatura de 20°C a 80°C, preferiblemente a 40°C hasta 60°C, y de modo particularmente preferible a aprox. 50°C.

En otra forma de realización del proceso correspondiente a la invención, que es particularmente apropiada para la realización a escala industrial, la hidrosililación se realiza con empleo de una unidad de "plato de peletización" (p.ej. de la firmas Erweka o Eirich). Para ello, se pone una cantidad definida de partículas de inmovilizado enzimático en la citada unidad de plato, y se agita. A continuación se añade la mezcla, que contiene los compuestos de las fórmulas I y II, catalizador y eventualmente disolvente o bien, preferiblemente, con empleo de una tobera de dos materiales (p.ej. de la firma Schlick u otras), en la cual se aplica a presión sobre las partículas (p.ej. con nitrógeno o aire sintético) la mezcla o los componentes en forma de una niebla fina de gotitas, a fin de garantizar una distribución lo más homogénea posible. Las partículas se retiran después de un tiempo de revestimiento prolongado, como se ha descrito arriba y se secan o se curan durante varias horas a una temperatura de 20°C hasta 80°C, preferiblemente de 40°C hasta 60°C, de modo particularmente preferible a 50°C en el armario secador, y pueden almacenarse a continuación a la temperatura ambiente hasta su utilización ulterior.

En otra forma de realización adicional, las partículas pueden generarse en un reactor de lecho fluidizado (p.ej. de la firma Erwerka), en el cual las partículas y la mezcla de reacción se aplican bajo dispersión intensa en relaciones de mezcla apropiadas.

Los preparados enzimáticos correspondientes a la invención pueden emplearse p.ej. como biocatalizadores, particularmente como biocatalizadores industriales.

La presente invención se ilustra más detalladamente con ayuda de las imágenes, sin limitarse a ellas. Las imágenes Fig. 1 y Fig. 2 muestran fotografías de suspensiones agitadas en un vaso de precipitados de 100 ml con un diámetro del fondo de 4 cm. Las suspensiones se han producido como se describe en el Ejemplo 2. De la imagen de Fig. 1 puede deducirse que la suspensión agitada basada en NZ435 sin tratar está enturbiada por partículas finas. Por el contrario, la suspensión agitada basada en NZ435 tratado de acuerdo con la invención es transparente, es decir que no exhibe partícula alguna o al menos no exhibe partícula alguna apreciable a simple vista (Fig. 2).

Los ejemplos que siguen deben ilustrar más detalladamente la presente invención, sin limitar el campo de protección de la misma, que se deduce de la descripción y las reivindicaciones de patente.

## Ejemplos

### *Materiales y métodos*

Novozym 435 (NZ435) es un inmovilizado enzimático comercial de la firma Novozymes A/S, Bagsvaerd/Dinamarca, una lipasa B de *C. antarctica* inmovilizada sobre un polimetacrilato por adsorción.

### *Actividad hidrolítica (hidrólisis de tributirina en medio acuoso)*

La actividad hidrolítica se determinó con el denominado método de pH estático, en el cual el ácido liberado durante la hidrólisis se titula contra una base, de tal modo que el valor de pH de la solución se mantiene constante. Por la dependencia respecto al tiempo del consumo de base puede cuantificarse el ácido liberado, y con ello la actividad enzimática. Realización ilustrativa: se añadieron 10-20 mg de partículas catalíticamente activas a 25 ml de tampón Tris-HCl (1 mM, pH 7,5; contiene adicionalmente NaCl y CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM) y 500 µl de tributirina. La actividad hidrolítica se cuantificó con el Autotitulado (Tritroline alfa, de la firma Schott) por la cantidad de la base de titulación (NaOH 50 mM) consumida.

### *Actividad hidrolítica (éster etílico del ácido valerianico en el medio acuoso)*

Análogamente a la determinación de la actividad hidrolítica en el ejemplo de la tributirina, puede utilizarse éster etílico del ácido valerianico. Realización ilustrativa: se añadieron 10-20 mg de partículas catalíticamente activas a 25 ml de tampón de fosfato (1 mM, pH 8,0) y 500 µl de éster etílico del ácido valerianico. La actividad hidrolítica se cuantificó con el Autotitulado (Tritroline alfa, de la firma Schott) por la cantidad de la base de titulación (NaOH 10 mM) consumida.

### *Actividad de síntesis en unidades PLU (actividad de síntesis de laurato de propilo en sistema sin disolvente)*

Se introdujeron 10 mg de partículas catalíticamente activas en 5 ml de solución equimolar de sustrato (ácido láurico y 1-propanol) y se incubaron a 60°C con vibración y agitación. Se tomaron muestras (V<sub>muestra</sub>: 50 µl) cada 5 min durante 25 min y se añadieron a 950 µl de decano (patrón interno: dodecano (sic) 4 mM). La determinación de las PLUs se realizó con ayuda de las velocidades iniciales de formación de producto. La detección del laurato de propilo (tiempo

## ES 2 330 594 T3

de retención: 9,791 min) se realizó por cromatografía de gases (Shimadzu 2010, columna BTX de la firma SGE; longitud 25 m, diámetro interior 0,22  $\mu\text{m}$ ; película: 0,25  $\mu\text{m}$ ; tipo de detector: FID a 300°C; temperatura del inyector 275°C y volumen de inyección 1  $\mu\text{l}$ , relación de división 35,0; presión del gas portador (helio) 150 kpa; programa de temperatura: temperatura inicial 60°C mantenida durante 1,5 min, aumento de temperatura 20°C/min, temperatura final 250°C mantenida durante 2,5 min).

### Determinación de la actividad de lacasa

Para la determinación de la actividad de lacasa, se ponen partículas catalíticamente activas (lacasa nativa o inmovilizada) en 19 ml de tampón de fosfato de potasio (100 mM, pH 6, 37°C) con 1 ml de solución ABTS (solución lista para ser utilizada, 1,8 mM, que puede obtenerse de Sigma-Aldrich) y se mide fotoespectrométricamente el aumento de la extinción a 405 nm. La actividad de lacasa debe seguirse durante un lapso de tiempo de 20 min. Las muestras se toman a intervalos de 5 min.

La actividad puede determinarse como sigue:

$$\text{Actividad} = \frac{\Delta \text{Ext}_{405} \cdot V_{\text{total}}}{\Delta t \cdot \epsilon \cdot d \cdot V_{\text{Muestra}}}$$

$\Delta \text{Ext}_{405}$ : variación de la extinción en función del tiempo

$V_{\text{total}}$ : volumen total en la mezcla de reacción [20 ml]

$V_{\text{muestra}}$ : volumen de la muestra [2 ml]

$\Delta t$ : variación del tiempo [min]

$\epsilon$ : coeficiente de extinción para ABTS a 405 nm [43,2 ml  $\mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]

$d$ : espesor de capa de la cubeta [1 cm]

La actividad se expresa en unidades (U/ml o U/g), definidas como 1  $\mu\text{mol}$  de conversión de sustrato por minuto.

### Determinación de proteína según Bradford

La determinación del contenido de proteína en el sobrenadante se realizó según el método de Bradford (Anal. Chem. 1976, 72, 248-254), que está basado en la fijación del colorante de triarilmetano Azul Brillante Coomassie G-250 a los restos de aminoácidos básicos y aromáticos contenidos en la proteína. Esta fijación provoca un desplazamiento del máximo de absorción desde 465 nm a 595 nm. Para la construcción de la curva de calibración se determinaron las extinciones de BSA en las concentraciones de 5-20  $\mu\text{g/l}$ . Para ello se completaron las muestras respectivas con  $\text{H}_2\text{O}$  hasta 800  $\mu\text{l}$  y se añadieron 200  $\mu\text{l}$  del reactivo de Bradford (Bio Rad, Munich) y se midieron a 595 nm.

Para la determinación del comportamiento de lixiviación de las partículas catalíticamente activas en condiciones de reacción severas se amplió el protocolo en los pasos siguientes:

La determinación del contenido de proteína de Novozym 435 (NZ435) se realizó según el esquema siguiente. Las partículas de NZ435 se incubaron durante 30 min en acetonitrilo/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:1, v/v) a 45°C con vibración y a continuación se tomaron muestras del sobrenadante (p.ej. 1 ml), se liofilizaron y se suspendieron de nuevo en agua (asimismo 1 ml). A continuación pudo determinarse el contenido de proteína como se ha descrito arriba. Los resultados pueden observarse en la Tabla 1.

TABLA 1

Resultados de la medida para el inmovilizado enzimático sin tratar

| Nativo<br>(sin revestimiento) | Actividad<br>Hidrolítica<br>[U/mg] | PLU<br>[U/g]   | Cantidad de<br>proteína desorbida<br>[ $\mu\text{g}$ proteína/<br>mg NZ435] | Cantidad de<br>proteína<br>desorbida<br>[%] |
|-------------------------------|------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| NZ435                         | 1,05 $\pm$ 0,15                    | 8000 $\pm$ 500 | 56 $\pm$ 1                                                                  | 5,6                                         |

## ES 2 330 594 T3

### Ejemplo comparativo 1

#### *Determinación de la estabilidad mecánica de inmovilizados enzimáticos convencionales*

Para la determinación de las estabilidades mecánicas de las partículas se incubaron éstas en diferentes soluciones sustrato equimolares de alta viscosidad (por ejemplo polietilenglicol (peso molecular aprox. 2400) y ácido oleico) con aportes de potencia altos y a temperaturas > 60°C y se investigó a continuación la integridad de las partículas. Con empleo de NZ435 (5% en peso en polietilenglicol (peso molecular aprox. 2400) y ácido oleico) pudo observarse al cabo de 24 horas a simple vista la formación de partículas finas, por ejemplo por una turbidez claramente apreciable.

### Ejemplo comparativo 2

#### *Determinación de la estabilidad de desorción de inmovilizados enzimáticos convencionales*

Para la determinación de la estabilidad de desorción de las partículas en condiciones de reacción severas se sometieron a vibración fracciones de 50 mg de NZ435 en 20 ml de solución MeCN/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) a 45°C durante 30 min. Se tomaron muestras definidas del sobrenadante (p.ej. de 1 ml) y se determinó el contenido de proteína en el sobrenadante como se ha descrito arriba. Las partículas se recuperaron en un filtro de pliegues, se lavaron con 100 ml de agua y se secaron durante 12 horas a 50°C, para determinar seguidamente según el esquema arriba descrito la actividad hidrolítica y la actividad de síntesis en PLU. Los resultados pueden deducirse de la Tabla 2.

TABLA 2

#### *Resultados de la medida del Ejemplo Comparativo 2*

| Nativo<br>(sin revestimiento) | Actividad<br>Hidrolítica<br>[U/mg] | Act. de<br>síntesis<br>[PLU/g] | Cantidad de proteína<br>desorbida<br>[µg proteína/mg NZ435] |
|-------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| NZ435                         | 0*                                 | 0*                             | 56                                                          |

\* En el contexto del test de actividad arriba descrito ya no era cuantificable actividad alguna.

### Ejemplo 1

#### *Producción de un preparado enzimático estable*

##### *Producción ilustrativa*

1 g de partículas de NZ435 se trataron en una cubeta metálica con 1 ml de mezcla de reacción, constituida por composiciones diversas de compuestos de las fórmulas generales I y II (para la composición véase la Tabla 3, los componentes de las fórmulas generales I y II se produjeron según un proceso habitual para los expertos, como se describe por ejemplo en US 7.196.163 B2, por equilibración), y catalizador de Karstedt (Syloff 4000, producto de Dow Corning, EE.UU.). Los componentes de silicona, con inclusión del catalizador, se disolvieron en cada caso antes de la aplicación en 3 ml de ciclohexano y se añadieron luego a las partículas en la cubeta metálica. Inmediatamente después de la adición se dispersaron intensamente por medio de un agitador turbulento (Ika, etapa 9) durante 15-30 min hasta que se hubo evaporado una mayor parte del ciclohexano. A continuación se secaron las partículas durante aprox 12 h en el armario secador a 50°C.

Tabla 3: Composición de las diversas partículas revestidas

| No.                | Pesa-<br>da<br>NZ435 | Componente<br>de<br>la fórmula<br>general I;<br>c=d=0; | Componente de<br>la<br>fórmula gene-<br>ral II: | Pro-<br>por-<br>ción<br>de | Act.<br>hidrólisis<br>[U/mg in-<br>mov. | Act. de sínte-<br>sis<br>[PLU/g innov.<br>(PLU/g NZ435)] |
|--------------------|----------------------|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| NZ435 <sup>1</sup> | 1 g                  | -                                                      | -                                               | 100                        | 1,05                                    | 8000<br>(8000)                                           |
| i                  | 1 g                  | a = 43, b = 5<br>100 µL                                | a = 98<br>900 µL                                | 57,4                       | 0,44<br>(0,77)                          | 4300<br>(7500)                                           |
| ii                 | 1 g                  | a = 64,5, b = 3,5<br>300 µL                            | a = 98<br>700 µL                                | 57                         | 0,39<br>(0,68)                          | 3100<br>(5400)                                           |
| iii                | 1 g                  | a = 43, b = 5<br>100 µL                                | a = 348<br>900 µL                               | 57,4                       | 0,44<br>(0,77)                          | 3800<br>(6700)                                           |

<sup>1</sup> Datos para inmovilizado nativo sin tratar, véase el Ejemplo Comparativo 1

## ES 2 330 594 T3

Las partículas producidas según este proceso exhiben frente al inmovilizado sin tratar rendimientos de actividad en la hidrólisis de hasta 73% (Ejemplos 1 i y 1 iii, 0,77 U/mg NZ435 en comparación con 1,05 U/mg para NZ435 sin tratar, como se describe en el Ejemplo Comparativo 1), o 65% (Ejemplo 1 i, 0,68 U/mg NZ435). En la síntesis pudieron alcanzarse rendimientos de actividad de 94% (Ejemplo 1 i), 84% (Ejemplo 1 iii) o 68% (Ejemplo 1 ii).

### Ejemplo 2

#### *Determinación de la estabilidad mecánica de los preparados enzimáticos correspondientes a la invención*

Se agitaron enérgicamente en cada caso 300 mg de partículas (NZ435 nativo sin tratar o NZ435 revestido según iii en la Tabla 3) durante 90 min en 5 ml de ácido láurico a 60°C (placa de agitación magnética de la firma Ika modelo RT, potencia etapa 5, barra agitadora: longitud 3,1 cm, anchura 0,6 cm). Después de la retirada del agitador se tomaron fotografías de las suspensiones agitadas (Fig. 1 y 2).

De la imagen de Fig. 1, puede deducirse claramente que la suspensión agitada basada en NZ435 sin tratar está enturbiada por partículas finas. Por el contrario, la suspensión agitada basada en NZ435 tratado de acuerdo con la invención es transparente, y no exhibe por tanto partícula alguna o al menos ninguna partícula de tamaño visible (Fig. 2).

A continuación se separaron las partículas de las suspensiones por medio de un filtro de pliegues, se lavaron con aprox. 10 ml de acetona y se secaron durante 12 horas a 50°C.

Para la determinación de la estabilidad mecánica de las partículas se realizó una determinación de la distribución granulométrica. Las porciones de tamizado utilizadas en este caso tenían los tamaños de exclusión siguientes: 800  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$ , 300  $\mu\text{m}$ , 150  $\mu\text{m}$  y 75  $\mu\text{m}$ .

Se determinaron por tamizado las distribuciones granulométricas antes y después de la agitación. Los resultados pueden deducirse de la Tabla 4.

TABLA 4

#### *Distribución granulométrica media (KVT) de NZ435 sin revestir y NZ435 revestido*

|                                   | Componente de la fórmula general I; c=d=0; R1 = R2a = metilo, R2b = H | Fórmula general II; b=c=d=0; R4 = metilo, R5 = vinilo | Proporción de NZ435 nativo [% p/p] | KVT anterior [ $\mu\text{m}$ ] | KVT posterior [ $\mu\text{m}$ ] | Disminución relativa KVT [%] |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| NZ435 nativo                      | -                                                                     | -                                                     | 100                                | 392                            | 293                             | 25                           |
| NZ435 revestido 100 $\mu\text{l}$ | a = 43, b = 5                                                         | a = 98 900 $\mu\text{l}$                              | 57,4                               | 547                            | 501                             | 8,5                          |
| NZ435 revestido 300 $\mu\text{l}$ | a = 64,5, b = 3,5                                                     | a = 98 700 $\mu\text{l}$                              | 57                                 | 486                            | 458                             | 5,8                          |
| NZ435 revestido 100 $\mu\text{l}$ | a = 43, b = 5                                                         | a = 348 900 $\mu\text{l}$                             | 57,4                               | 491                            | 432                             | 12                           |

## ES 2 330 594 T3

### Ejemplo 3

#### *Determinación de la estabilidad de desorción de preparados enzimáticos estables*

- 5 Análogamente al Ejemplo Comparativo 2, las partículas recuperadas del Ejemplo 1 se trataron con agua/acetonitrilo y se determinaron a continuación la actividad de hidrólisis, la actividad de síntesis y la cantidad de proteína liberada. El resultado de esta determinación puede deducirse de la Tabla 5.

TABLA 5

#### *Resultados del Ejemplo 3*

| Muestra                                       | Act. de hidrólisis<br>[U/mg inmov.<br>(U/mg NZ435)] | Act. de síntesis<br>[PLU/g inmov.<br>(PLU/g NZ435)] | Cantidad de proteína<br>desorbida [µg/mg inmov.<br>(µg/mg NZ435)] |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| NZ435 nativo<br>(Ejemplo Comparativo 1)       | 1,05 (1,05)                                         | 8000 (8000)                                         | -                                                                 |
| NZ435 sin revestir<br>(Ejemplo Comparativo 2) | 0                                                   | 0                                                   | 56                                                                |
| i                                             | 0,25 (0,44)                                         | 1182 ± 13 (2059)                                    | 10 (17)                                                           |
| ii                                            | 0,29 (0,51)                                         | 1699 ± 24 (2980)                                    | 4,5 (7,9)                                                         |
| iii                                           | 0,28 (0,49)                                         | 1235 ± 54,3 (2152)                                  | 9 (16)                                                            |

- 35 Mientras que el inmovilizado enzimático nativo sin tratar después de la incubación no exhibe actividad de hidrólisis alguna y pueden comprobarse 56 µg/mg de inmovilizado como proteína libre, las partículas recubiertas de silicona exhiben actividades de hidrólisis de hasta 75% de la actividad inicial (muestra ii, 0,51 U/mg de NZ435 frente a 0,77 U/mg de NZ435 antes de la lixiviación), actividades de síntesis de hasta 55% de la actividad inicial (muestra iii, 2980 U/g de NZ435 frente a 5400 U/g de NZ435 antes de la lixiviación), y una desorción de enzima reducida de hasta 86% (muestra ii).

### Ejemplo 4

#### *Producción de un inmovilizado enzimático*

- 45 Se agitó 1 g de Lewatit VPOC1600 (firma Lanxess) durante aprox. 18 h a la temperatura ambiente en 5 ml de solución de CALB (Lipozym CALB L, Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca, actividad hidrolítica: 2700 U/ml), se separó en un filtro de pliegues, se lavó con 250 ml de agua destilada, se secó a continuación durante 3 horas al aire, se lavó con 1 ml de isopropanol y se secó una vez más al aire durante 1 hora. Los inmovilizados así producidos se almacenaron en recipientes de reacción provistos de tapa a 4°C hasta su utilización ulterior.

- 55 Según el proceso arriba descrito, se midieron las actividades de los inmovilizados enzimáticos (actividad hidrolítica de 1,04 U/mg y una actividad de síntesis de 6000 PLU/g). La densidad de carga se determinó por el test de Bradford, encontrándose un resultado de aproximadamente 30 µg<sub>proteína</sub>/mg<sub>VPOC1600</sub>.

- 60 Los inmovilizados enzimáticos así generados se revistieron con silicona en un segundo paso según el proceso arriba descrito (formulación como en el ensayo i de la Tabla 3). La proporción en peso de inmovilizado enzimático en el preparado corresponde a 63%. La actividad hidrolítica de los preparados revestidos es 0,43 U/mg, y la actividad de síntesis 2927 PLU/g.

- 65 Análogamente al Ejemplo Comparativo 2, se trataron con agua/acetonitrilo las partículas sin revestir y las partículas revestidas con silicona y se determinaron a continuación la actividad de hidrólisis, la actividad de síntesis y la cantidad de proteína liberada. El resultado puede deducirse de la Tabla 6.

## ES 2 330 594 T3

TABLA 6

*Resultados del Ejemplo 4*

| Muestra                                             | Componente de la fórmula general I;<br>c=d=0;<br>R1 = R2a = metilo, R2b = h | Fórmula general II;<br>b=c=d=0;<br>R4 = metilo, R5 = vinilo | Act. de hidrólisis [U/mg inmov. (U/mg inmov. nativo)] | Act. de síntesis [PLU/g inmov. (PLU/g inmov. nativo)] | Cantidad de proteína desorbida [µg/mg inmov. (µg/mg inmov. nativo)] |
|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| CALB en VPOC1600, nueva sin revestir                | -                                                                           | -                                                           | 1,04                                                  | 6000                                                  | -                                                                   |
| CALB en VPOC1600, nueva revestida                   | a=43, b=5<br>100 µl                                                         | a = 348<br>900 µl                                           | 0,43<br>(0,68)                                        | 2930<br>(4650)                                        | -                                                                   |
| CALB en VPOC1600, sin revestir después de desorción | -                                                                           | -                                                           | 0                                                     | 0                                                     | 27 ± 5                                                              |
| CALB en VPOC1600, revestida después de desorción    | a = 43, b = 5<br>100 µl                                                     | a = 348<br>900 µl                                           | 0,234 ± 0,005<br>(0,37)                               | 1765 ± 369<br>(2800)                                  | 3 ± 1,3<br>(4,7)                                                    |

Como puede deducirse de la Tabla 6, en el caso del inmovilizado sin tratar se desorbe una cantidad nueve veces mayor de proteína. Al mismo tiempo, pueden alcanzarse rendimientos de actividad de 54% (actividad de hidrólisis), o 60% (actividad de síntesis). La idoneidad ya demostrada con ayuda de NZ435 para los preparados comerciales acabados del método arriba descrito para el recubrimiento de inmovilizados enzimáticos con siliconas pudo comprobarse también por tanto para los inmovilizados enzimáticos autocargados.

### Ejemplo 5

#### *Determinación de las actividades enzimáticas en disolvente orgánico*

La actividad de los preparados enzimáticos de los Ejemplos 1 y 4, así como de los inmovilizados nativos correspondientes, se determina por realización de una síntesis de laurato de propilo en metilciclohexano (concentración inicial de los sustratos = 10 mM, T = 25°C).

## ES 2 330 594 T3

TABLA 7

*Actividad de síntesis (PLU/g) en metilciclohexano*

| No.                              | Pesada<br>NZ435 | Componente<br>de la fórmula<br>general I;<br>c=d=0; R1 =<br>R2a = metilo,<br>R2b = h | Componente<br>de la fórmula<br>general II;<br>b=c=d=0;<br>R4 = metilo,<br>R5 = vinilo | Proporción<br>de NZ435<br>nativo<br>[% p/p] | Actividad<br>[U/g inmov.<br>(U/mg inmov.<br>nativo)] | Actividad<br>después de<br>desorción<br>[U/g inmov.<br>(U/g inmov.<br>nativo)] |
|----------------------------------|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| NZ435 nativo                     | 1 g             | -                                                                                    | -                                                                                     | 100                                         | 581                                                  | 0                                                                              |
| i del Ejemplo 1                  | 1 g             | a=43, b=5<br>100 µl                                                                  | a=98<br>900 µl                                                                        | 57,4                                        | 227<br>(395)                                         | 142<br>(247)                                                                   |
| ii del Ejemplo 1                 | 1 g             | a=64,5,<br>b=3,5<br>300 µl                                                           | a=98<br>700 µl                                                                        | 57                                          | 240<br>(421)                                         | 141<br>(247)                                                                   |
| iii del Ejemplo 1                | 1 g             | a=43, b=5<br>100 µl                                                                  | a=348<br>200 µl                                                                       | 57,4                                        | 267<br>(465)                                         | 133<br>(232)                                                                   |
| CALB en<br>VPOC1600<br>nativa    | 1 g             | -                                                                                    | -                                                                                     | 100                                         | 311                                                  | 0                                                                              |
| CALB en<br>VPOC1600<br>revestido | 1 g             | a=43, b=5<br>100 µl                                                                  | a=98<br>900 µl                                                                        | 51                                          | 151<br>(296)                                         | 118<br>(231)                                                                   |

La Tabla 7 muestra claramente que el rendimiento de actividad de los preparados enzimáticos en el caso del empleo en disolvente orgánico es excelente y que la estabilidad de desorción es también evidente.

### Ejemplo 6

#### *Producción de preparados de lipasa adicionales*

Análogamente al Ejemplo 1, se provee Lipozym RM IM (Lipasa de *M. miehei*, inmovilizada en Duolite A568 de la firma Lanxess, obtenida de Novozymes A/S) con un revestimiento de siloxano y se determina el rendimiento de actividad análogamente al Ejemplo 5 en disolvente orgánico.

## ES 2 330 594 T3

TABLA 8

*Determinación de la actividad de la lipasa Lipozym RM IM revestida*

| Designación          | Pesada<br>RM IM | Componente de<br>la fórmula<br>general I;<br>c=d=0;<br>R1 = R2a =<br>metilo, R2b = H | Componente de<br>la fórmula II;<br>b=c=d=0;<br>R4 =metilo,<br>R5 = vinilo | Proporción de<br>inmov. nativo<br>[% p/p] | PLUs en LM en<br>disolvente<br>orgánico |
|----------------------|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------|
| RM IM nativa         | 1 g             | -                                                                                    | -                                                                         | 100                                       | 321 ± 40                                |
| RM IM revesti-<br>da | 1 g             | a = 43, b = 5<br>100 µl                                                              | a = 98<br>909 µl                                                          | 51                                        | 171 ± 5                                 |

La Tabla 8 muestra claramente que, referido a la cantidad empleada de lipozima RM IM se alcanza, dentro del margen de inexactitud de la medida, un rendimiento de actividad cuantitativo.

### Ejemplo 7

#### *Producción de preparados de lipasa adicionales*

Análogamente al Ejemplo 4, se inmoviliza una lipasa de *T. lanuginosa* (que puede obtenerse como "esterasa" TL01 de la firma Asa Spezialenzyme, y que se trata de una lipasa con función esterasa adicional) sobre Lewatit VPOC1600 y se provee de un revestimiento de siloxano. Para la determinación de la actividad se determina la hidrólisis del éster etílico del ácido valeriánico.

TABLA 9

*Resultados del Ejemplo 5*

|                                      | Pesada de<br>inmov. nativo | Componente de<br>la fórmula<br>general I;<br>c=d=0;<br>R1 = R2a =<br>metilo, R2b = H | Fórmula gene-<br>ral II; b=c=d=0;<br>R4 =metilo,<br>R5 = vinilo | Proporción de<br>inmov. nativo<br>[% p/p] | Actividad [U/g<br>inmovilizado]<br>(U/g inmov.<br>nativo) |
|--------------------------------------|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| TL01 sobre<br>VPOC1600,<br>nativo    | 1 g                        | -                                                                                    | -                                                               | 100                                       | 261                                                       |
| TL01 sobre<br>VPOC1600,<br>revestido | 1 g                        | a = 43, b = 5<br>250 µl                                                              | a = 198<br>750 µl                                               | 55                                        | 157<br>(285)                                              |

La Tabla 9 muestra que el preparado nativo exhibe una actividad de 261 U/g, mientras que el preparado revestido muestra una actividad de 157 U/g. Referido al contenido de inmovilizado nativo, significa que una actividad de 285 U/g, es decir dentro del margen de error de exactitud, puede alcanzarse un rendimiento de actividad cuantitativo.

## ES 2 330 594 T3

### Ejemplo 8

#### *Producción de una preparación de esterasa*

- 5 Análogamente al Ejemplo 7, se inmoviliza una esterasa de *R. oryzae* sobre Lewatit VPOC1600, se reviste y se determina la actividad en la hidrólisis del éster etílico del ácido valeriánico.

10 TABLA 10

*Determinación de la actividad de la esterasa de R. oryzae inmovilizada*

|    | Pesada de inmov. nativo         | Componente de la fórmula general I; c=d=0; R1 = R2a = metilo, R2b = H | Fórmula general II; b=c=d=0; R4 =metilo, R5 = vinilo | Proporción de inmov. nativo [% p/p] | Actividad [U/g inmovilizado] (U/g inmovilizado nativo) |
|----|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 15 | VPOC1600 nativo + esterasa R.O. | 1 g                                                                   | -                                                    | 100                                 | 67                                                     |
| 20 | VPOC1600 revestido + E.R.O.     | 1 g                                                                   | a = 43, b = 5<br>250 µl                              | a = 198<br>750 µl                   | aprox. 45<br>99,5 (65)                                 |

25 También en este caso se aprecia, dentro del margen de inexactitud de la medida, un rendimiento de actividad cuantitativo.

### Ejemplo 9

#### *Producción de una preparación de lacasa*

- 45 Análogamente al Ejemplo 4, se inmovilizó una lacasa (EC 1.10.3.2) de *Myceliophthora thermophila* (que puede obtenerse como "Flavorstar" de la firma Novozymes A/S) sobre Lewatit VPOC1600 (4,5 mg de proteína en 1 g de Lewatit VPOC1600), se proveyó de un revestimiento de siloxano y se determinó la actividad en el ensayo ABTS.

50 (Tabla pasa a página siguiente)

Tabla 11: Actividades de la lacasa inmovilizada

| Enzima/<br>soporte         | Pesada<br>inmov.<br>nativo | Componente de la<br>fórmula general I;<br>c=d=0;<br>R1 = R2a = metilo,<br>R2b = H | Fórmula general II;<br>b=c=d=0;<br>R4 =metilo,<br>R5 = vinilo | Proporción<br>inmov. nativo<br>[% p/p] | Actividad [U/g<br>inmov.<br>(U/g inmov. nativo)] | Actividad U/g<br>proteína | Actividad relativa<br>[%] |
|----------------------------|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Lacasa/VPOC1600 nativa     | 1 g                        | -                                                                                 | -                                                             | 100                                    | 0,41                                             | 91                        | 100                       |
| Lacasa/VPOC1600 recubierta | 1 g                        | a = 43, b = 5<br>250 µl                                                           | a = 98<br>750 µl                                              | 33                                     | 0,022<br>(0,066)                                 | 14,6                      | 16                        |

La Tabla 11 muestra que las lacasas se pueden revestir también con el método correspondiente a la invención

## REIVINDICACIONES

1. Preparados enzimáticos, que pueden obtenerse de tal manera que inmovilizados enzimáticos que exhiben enzimas o microorganismos que contienen enzimas inmovilizados sobre un soporte inerte, se proveen de un recubrimiento de silicona obtenido por hidrosililación.

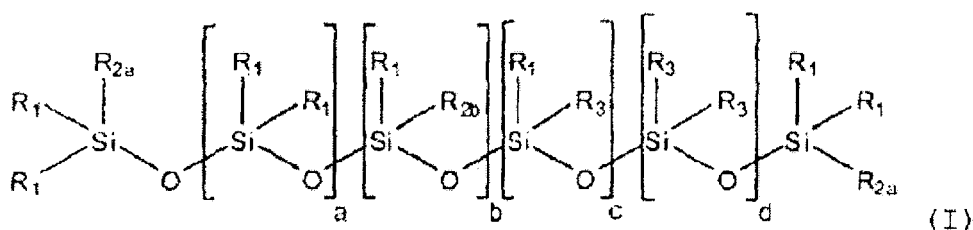
2. Preparados enzimáticos según la reivindicación 1, **caracterizados** porque las enzimas son de la clase de las hidrolasas, preferiblemente lipasas.

3. Preparados enzimáticos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizados** porque los soportes inertes tienen una distribución granulométrica, en la cual el 90% de las partículas exhiben un tamaño de partícula de 10 a 5000  $\mu\text{m}$ .

4. Preparados enzimáticos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizados** porque los soportes inertes empleados están constituidos por polivinilestireno, polimetacrilato o poliacrilato.

5. Preparados enzimáticos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizados** porque el recubrimiento de silicona se obtiene por hidrosililación de polisiloxanos con funcionalidad SiH con polisiloxanos que contienen enlaces dobles carbono-carbono en posición terminal.

6. Preparados enzimáticos según la reivindicación 5, **caracterizados** porque como componente SiH se emplean polisiloxanos de la fórmula general I



donde son:

$$N = a+b+c+d+2 = 3 \text{ a } 850,$$

$$a = 1 \text{ a } 800,$$

$$b = 0 \text{ a } 400,$$

$$c = 0 \text{ a } 10,$$

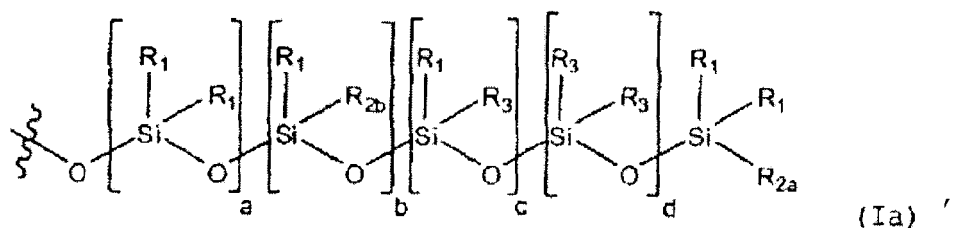
$$d = 0 \text{ a } 10,$$

$R_1$ , independientemente unos de otros, iguales o diferentes, seleccionados del grupo que comprende: grupos alquilo saturados o insaturados, opcionalmente ramificados con 1 a 30 átomos C, restos alarilo con 7 a 30 átomos C;

$R_{2a}$ , independientemente unos de otros, hidrógeno o  $R_1$ ;

$R_{2b}$ , independientemente unos de otros, hidrógeno o  $R_1$ ;

$R_3$ , independientemente unos de otros, restos iguales o diferentes de la fórmula general (Ia)



donde son:

$$N = a+b+c+d+2 = 3 \text{ a } 850, \text{ con preferencia } 6 \text{ a } 160,$$

$$a = 1 \text{ a } 800,$$

$$b = 0 \text{ a } 400,$$

$$c = 0 \text{ a } 10,$$

$$d = 0 \text{ a } 10,$$

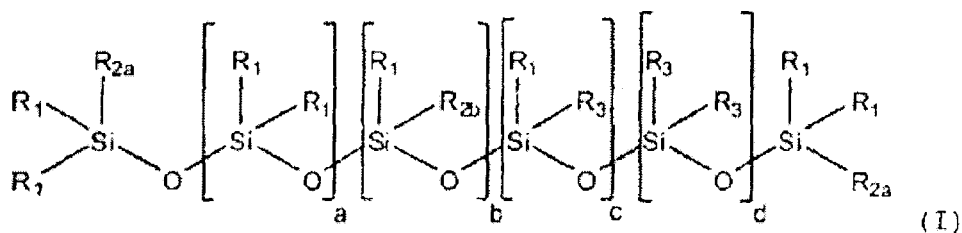
$R_1$ , independientemente unos de otros, iguales o diferentes, seleccionados del grupo que comprende: grupos alquilo saturados o insaturados, opcionalmente ramificados con 1 a 30 átomos C, restos alarilo con 7 a 30 átomos C, restos arilo con 6 a 30 átomos C;

$R_{2a}$ , independientemente unos de otros, hidrógeno o  $R_1$ ;

$R_{2b}$ , independientemente unos de otros, hidrógeno o  $R_1$ ;

$R_3$ , independientemente unos de otros, restos iguales o diferentes de la fórmula general Ia o un resto  $R_1$ .

7. Preparados enzimáticos según la reivindicación 6, **caracterizados** porque, como componente SiH se emplean polisiloxanos de la fórmula general I



donde son:

$$N = a+b+c+d+2 = 6 \text{ a } 160,$$

$$a = 2 \text{ a } 150,$$

$$b = 2 \text{ a } 75,$$

$$c = 0,$$

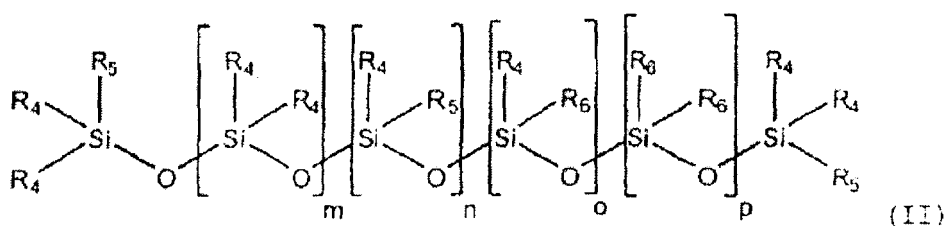
$$d = 0,$$

$R_1$ , independientemente unos de otros, iguales o diferentes, seleccionados del grupo que comprende: grupos alquilo saturados o insaturados, opcionalmente ramificados con 1 a 30 átomos C, restos alarilo con 7 a 30 átomos C, restos arilo con 6 a 30 átomos C;

$R_{2a}$ , independientemente unos de otros, hidrógeno o  $R_1$ ;

$R_{2b}$ , independientemente unos de otros, hidrógeno o  $R_1$ .

8. Preparados enzimáticos según al menos una de las reivindicaciones 5 a 7, **caracterizados** porque como polisiloxanos que contienen enlaces dobles carbono-carbono en posición terminal se emplean polisiloxanos de la fórmula general II:



donde son:

$$N = m+n+o+p+2 = 3 \text{ a } 1000,$$

$$m = 1 \text{ a } 800,$$

$$n = 0 \text{ a } 20,$$

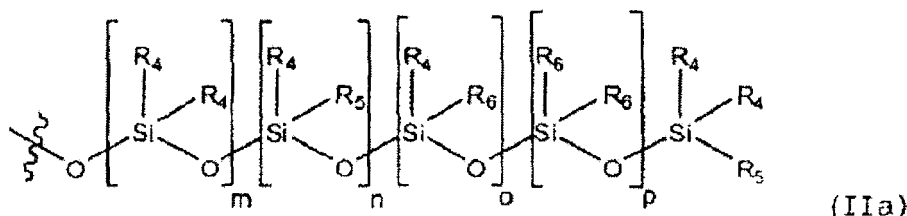
$$o = 0 \text{ a } 10,$$

$$p = 0 \text{ a } 10,$$

$R_4$ , independientemente unos de otros, iguales o diferentes y son del grupo siguiente: grupos alquilo saturados o insaturados, opcionalmente ramificados con 1 a 30 átomos C, restos alcarilo con 7 a 30 átomos C, restos arilo con 6 a 30 átomos C,

$R_5$ , independientemente unos de otros, un resto alquilo insaturado terminal, o resto alcoxilo, o  $R_4$ ;

$R_6$ , independientemente unos de otros, restos iguales o diferentes de la fórmula general IIa:



donde son:

$$N = m+n+o+p+2 = 3 \text{ a } 1000,$$

$$m = 1 \text{ a } 800,$$

$$n = 0 \text{ a } 20,$$

$$o = 0 \text{ a } 10,$$

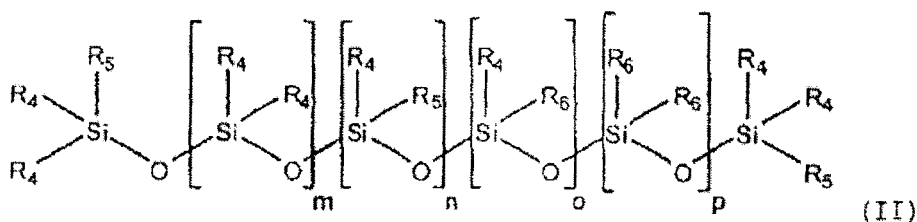
$$p = 0 \text{ a } 10,$$

$R_4$ , independientemente unos de otros, iguales o diferentes y son del grupo siguiente: grupos alquilo saturados o insaturados, opcionalmente ramificados con 1 a 30 átomos C, restos alcarilo con 7 a 30 átomos C, restos arilo con 6 a 30 átomos C,

$R_5$ , independientemente unos de otros, un resto alquilo insaturado terminal, o resto alcoxilo, o  $R_4$ ;

$R_6$ , independientemente unos de otros, restos iguales o diferentes de la fórmula general IIa o restos  $R_4$ .

9. Preparados enzimáticos según al menos una de las reivindicaciones 5 a 8, **caracterizados** porque como polisiloxanos que contienen enlaces dobles carbono-carbono en posición terminal se emplean polisiloxanos de la fórmula general II:



donde son:

$$N = m+n+o+p+2 = 10 \text{ a } 600,$$

## ES 2 330 594 T3

m = 2 a 600,

n = 0 a 10,

5 o = 0,

p = 0,

10 R<sub>4</sub>, independientemente unos de otros, iguales o diferentes y son del grupo siguiente: grupos alquilo saturados o insaturados, opcionalmente ramificados con 1 a 30 átomos C, restos alarilo con 7 a 30 átomos C, restos arilo con 6 a 30 átomos C;

R<sub>5</sub> independientemente unos de otros, un resto alquilo o resto alcoxilo insaturado terminal.

15 10. Proceso para la producción de preparados enzimáticos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque inmovilizados enzimáticos, que exhiben enzimas o microorganismos que contienen enzimas inmovilizados sobre un soporte inerte, se proveen de un recubrimiento de silicona obtenido por hidrosililación.

20 11. Proceso según la reivindicación 10, **caracterizado** porque los inmovilizados enzimáticos se proveen de un recubrimiento de silicona de tal manera que los inmovilizados enzimáticos se ponen en contacto con una mezcla de reacción que contiene polisiloxanos con funcionalidad SiH, polisiloxanos que contienen enlaces dobles carbono-carbono en posición terminal y un catalizador que cataliza la hidrosililación, en condiciones de hidrosililación.

25 12. Utilización de los preparados enzimáticos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 como biocatalizador industrial.

30

35

40

45

50

55

60

65

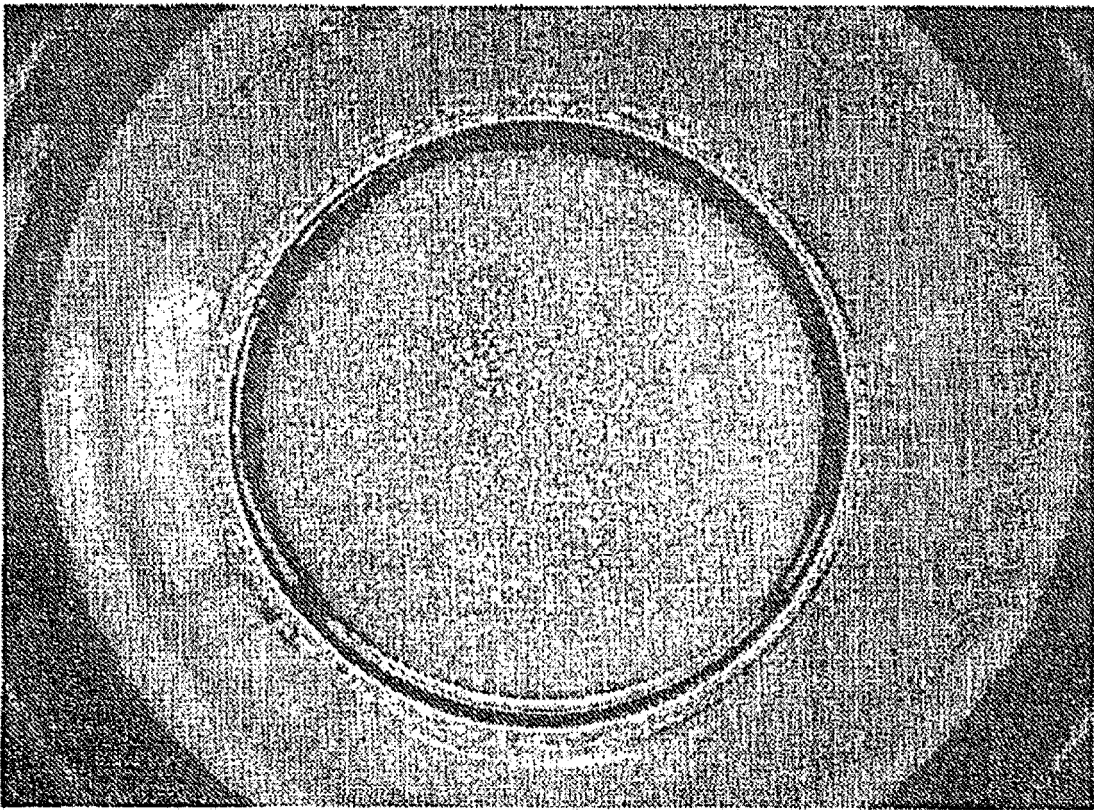


Fig. 1

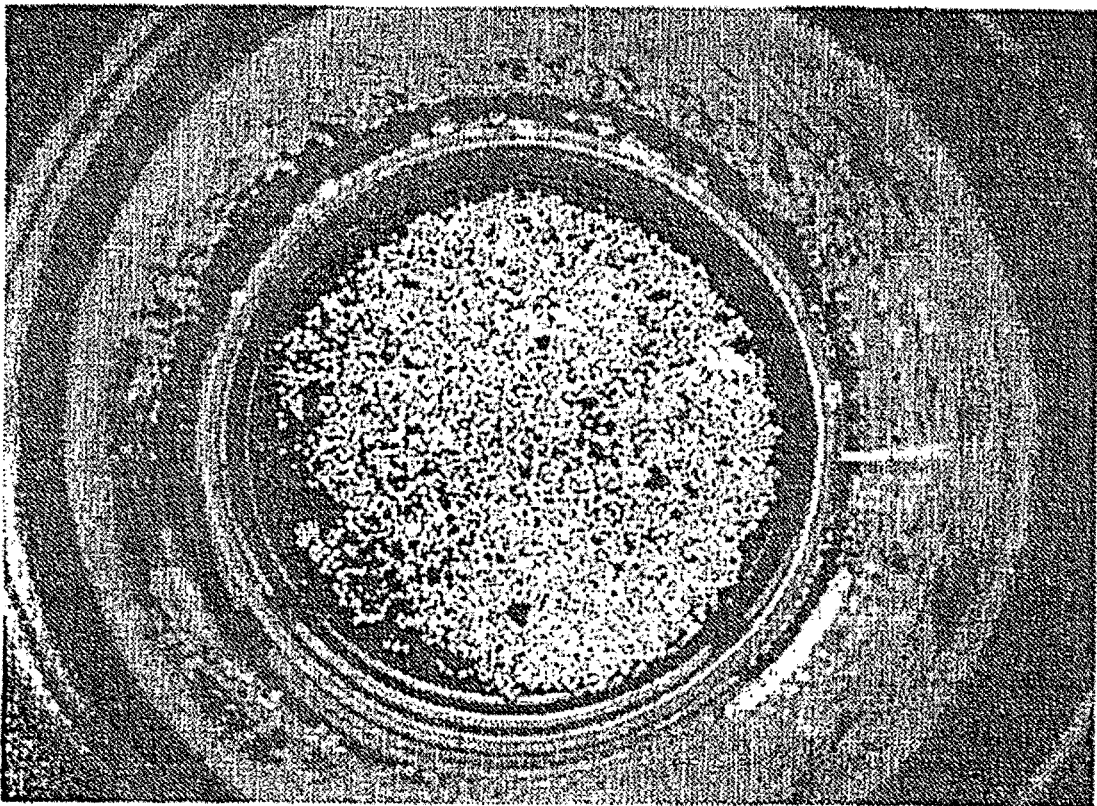


Fig. 2