



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 323 572**

51 Int. Cl.:
C12N 9/96 (2006.01)
C12N 9/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02711535 .1**
96 Fecha de presentación : **01.02.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1360285**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.11.2003**

54 Título: **Método de preparación de agregados enzimáticos reticulados.**

30 Prioridad: **01.02.2001 NL 1017258**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.07.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.07.2009

73 Titular/es: **Technische Universiteit Delft**
Julianalaan 134
2628 BL Delft, NL

72 Inventor/es: **Lopez Serrano, Paloma;**
Cao, Linqiu;
Van Rantwijk, Frederik y
Sheldon, Roger, Arthur

74 Agente: **Durán Moya, Luis Alfonso**

ES 2 323 572 T3

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

Método de preparación de agregados enzimáticos reticulados.

La presente invención se refiere a un método de preparación de agregados enzimáticos reticulados que comprende las etapas de

- a) precipitar una enzima disuelta presente en un medio líquido;
- b) reticular con un reticulante, y
- c) opcionalmente, lavar el agregado enzimático reticulado

Dicho método se conoce generalmente en la técnica. Éste método se utiliza para preparar preparaciones enzimáticas para realizar diversas reacciones catalizadas por enzimas. Por ejemplo, Cao y otros, (Organic Letters vol. 2 (10) p. 1361-1364, 2000) describen la preparación de agregados a base de penicilina acilasa. Los agregados reticulados descritos son menos activos que la enzima nativa.

El objeto de la presente invención es dar a conocer un método que haga posible conseguir agregados con una mayor actividad enzimática.

Para ello, la presente invención se caracteriza porque se realiza como mínimo, un tratamiento seleccionado entre el grupo que comprende I) realizar la etapa a) en presencia de un compuesto seleccionado entre el grupo que comprende i) un éter corona y ii) un tensioactivo, y II) realizar la etapa c) con un segundo líquido cuya composición orgánica difiere de la del líquido.

Los Solicitantes han descubierto sorprendentemente que dicho tratamiento puede dar como resultado un agregado enzimático reticulado (CLEA) con una actividad mejorada. Aunque la presente invención no garantiza esta actividad mejorada para una enzima en particular usada para catalizar una reacción en particular, ni permite la predicción de una actividad mejorada, proporciona un parámetro extra a controlar para conseguir un agregado mejor. Es decir, para una enzima particular, puede investigarse con poco esfuerzo y usando experimentación sencilla y rutinaria, si su capacidad catalítica puede mejorarse usando el tratamiento. Entre una gama de enzimas capaces de catalizar la reacción deseada, el mejor CLEA puede seleccionarse fácilmente y con poco esfuerzo. Debido a que el CLEA es insoluble, puede lavarse con un segundo líquido que sea completamente acuoso, orgánico o una mezcla de los dos. Después del tratamiento, el CLEA puede liofilizarse o almacenarse en forma de suspensión para un uso futuro.

Overbeeke P.L.A. y otros, describen en el documento J. of Mol. Cat. B: Enzymatic 10, p. 385-393 (2000) un método en el que una lipasa se cristaliza bajo la influencia de PEG en presencia de 2-metil-2,4-pentanodiol y los cristales formados se reticulan. Por el contrario, la presente invención hace uso de un agente de precipitado para formar agregados en lugar de cristales.

CAO L y otros, describen agregados reticulados de penicilina acilasa: "Robust catalysts for the synthesis of beta-lactam antibiotics". JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS B ENZYMATIC, vol. 11, N° 4-6, 2001, páginas 665-670, XP001079507 ISSN: 1381-1177.

Además VAN UNEN, DRIK-JAN y otros, se refieren a "Crown ether activation of cross-linked subtilisin Carlsberg crystals in organic solvents" JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, PERKIN TRANSACTIONS 1: ORGANIC AND BIO-ORGANIC CHEMISTRY (20), 1998, páginas 3341-3343, XP002202482.

Finalmente, KHALAF y otros, dan a conocer "Cross-linked enzyme crystals as highly catalysts in organic solvents" J. AM. CHEM. SOC., vol. 118, 1996, páginas 5494-5495, XP002202483.

Preferentemente, la etapa a) y la etapa b) se realizan simultáneamente.

Esto proporciona un procedimiento simplificado, que requiere menos tiempo y esfuerzo.

Según una realización preferente, el compuesto se retira después de la reticulación.

No es necesario que el tensioactivo y/o el éter corona estén presentes durante la reacción catalítica a realizar por el CLEA para mantener la alta actividad. Por lo tanto, el compuesto puede retirarse, en caso en que pudiera interferir con la reacción a catalizar o por otras razones. La retirada puede conseguirse usando cualquier método conocido en la técnica, y en particular a través de diálisis o lavado usando centrifugado.

Según una importante aplicación del método según la presente invención, la enzima es una lipasa.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un método para realizar una reacción catalizada por lipasa, seleccionándose dicha reacción entre el grupo que comprende i) transesterificación; ii) interesterificación; iii) hidrólisis; iv) esterificación; v) amoniolisis; vi) aminolisis; y vii) perhidrólisis, dicho método se caracteriza porque se prepara

un agregado de lipasa reticulado según la presente invención y dicho agregado de lipasa reticulado se pone en contacto con un sustrato.

La presente invención se ilustrará a continuación con referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Preparación de lipasas reticuladas

- Lipozyme lipasa de *R. miehei* (Novo Nordisk)
- SP525 lipasa B de *Candida antarctica* (Novo Nordisk)
- Lipasa de *P. alcaligenes* (Gist-brocades)

Método Ia)

En presencia de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Agua)

Se disuelven 0,5 ml de solución madre enzimática (Lipozyme o SP525, Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca) o 50 mg de polvo de enzima PaL (PaL es lipasa de *P. alcaligenes* (Gist-Brocades, Delft, Países Bajos)), en 1 ml de tampón fosfato potásico (100 mM, pH 7) en un tubo de centrífuga de 10 ml. Se añadieron 550 mg de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ seguidos por 1 ml de una solución de precipitación A que consiste en 550 mg de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (el precipitante) en tampón fosfato potásico (100 mM, pH 7) y se añaden 80 μl de glutardialdehído (solución al 25% en agua). La mezcla se deja en agitación a 4°C (temperatura ambiente para SP525) durante 17 horas. Se añaden 3 ml de H_2O a la mezcla y a continuación se centrifuga. El sobrenadante se decanta y el residuo se lava, se centrifuga y se decanta 3 veces más con H_2O (5 ml cada vez). La preparación enzimática final se mantiene en 5 ml de H_2O . Si fuera necesario, el sólido se dispersa agitando con agitadores magnéticos.

Método Ib y Ic)

En presencia de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y tensioactivo

Se repitió el método Ia), con la diferencia de que la solución de precipitación A contenía además 25 mg de dodecilsulfato sódico (SDS) (método Ib) o 25 mg de Triton X-100 (TR) (método Ic).

Método Id)

En presencia de dimetoxietano (DME)

Se introducen 0,5 ml de solución madre enzimática (Lipozyme o SP525) o 50 g de polvo de enzima PaL en un tubo de centrífuga de 10 ml, después de lo cual se añade 1 ml de tampón fosfato potásico (100 mM, pH 7), 3 ml de DME y 80 μl de glutardialdehído. La mezcla se deja en agitación a 4°C (temperatura ambiente para SP525) durante 17 horas.

Se añade 1 ml de DME a la mezcla y a continuación se centrifuga. El sobrenadante se decanta y el residuo se lava, se centrifuga y se decanta 3 veces más con DME (5 ml cada vez).

La preparación enzimática final se mantiene en 5 ml de DME. Si fuera necesario, el sólido se dispersa agitando con agitadores magnéticos.

Método Ie)

En presencia de DME y un Éter corona

Se repitió el método Ie), excepto que también se añadió una cantidad de 6,9 mg del éter corona dibenzo-18-corona-6 junto con los 3 ml de DME.

Las preparaciones de lipasa reticuladas se mantuvieron en suspensión, en agua o DME, denominadas preparaciones Ia-e.

Ejemplo 2

Ensayos de actividad

La actividad de los CLEA preparados según las preparaciones Ia-e) se ensayó con tres reacciones. Estas reacciones se realizaron en una solución acuosa o en una solución orgánica.

ES 2 323 572 T3

Para los ensayos IIb e IIc, se siguió el siguiente procedimiento general, antes de realizar el ensayo:

- De suspensiones acuosas, muestras de 0,5 ml de suspensión de CLEA se liofilizaron cada una en tubos Eppendorf de 2 ml.
- De suspensiones orgánicas, muestras de 0,5 ml de suspensión de CLEA se centrifugaron cada una en un tubo Eppendorf de 2 ml y el sobrenadante se decantó.
- Enzima nativa, usada como control, se usó directamente de la solución madre (50 μ l) o en forma de polvo (5 mg), sin tratamiento adicional.

Para los ensayos IIb y IIc, se realizaron análisis usando un cromatógrafo de gases GC Varian Star 3600 (Varian). Columna: CP WAX 52 CB 50 m x 0,53 mm. Gas transportador: nitrógeno.

Ensayo IIa)

Hidrólisis de propionato de p-nitrofenilo (realizada en agua)

La preparación enzimática (50 μ l) se suspendió en 0,5 ml de agua (1,5 ml en el caso de SP525) y 200 μ l (50 μ l en el caso de SP525) de la suspensión se añadieron a 2,5 ml de solución de éster (propionato de p-nitrofenilo 0,4 mM en agua a 25°C). La medición del aumento de absorbancia a 348 nm (aparición de p-nitrofenol) en la hidrólisis de propionato de p-nitrofenilo se supervisó usando un espectrofotómetro UV Cary 3-Bio de Varian. Los valores se dan como porcentaje de la actividad de la enzima nativa.

El resultado se resume en la tabla 1.

TABLA 1

Hidrólisis de propionato de p-nitrofenilo en agua						
Enzima	Ia	Ib	Ic	Id	Ie	Nativa
Lipozyme	152	218	44	0	0	100
SP525	93	40	129	151	177	100
% de actividad de la enzima nativa						

Ensayo IIb)

Transesterificación de octanoato de etilo con octanol (realizada en éter diisopropílico)

Se añaden 0,5 ml de éter diisopropílico al tubo Eppendorf que contiene la enzima. Se añaden 50 mg de zeolita NaA activada (Aldrich). Se añade una solución de 0,5 ml de octanoato de etilo 86 mM, octanol 400 mM y decano 50 mM en éter diisopropílico y se deja agitar a temperatura ambiente. En el momento especificado, la mezcla de reacción se centrifuga, se extrae una alícuota (100 μ l), se disuelve en 0,5 ml de DME y se analiza mediante cromatografía de gases (GC).

El resultado se resume en la tabla 2.

TABLA 2

Transesterificación de octanoato de etilo con octanol en i-Pr ₂ O						
Enzima	Ia	Ib	Ic	Id	Ie	Nativa
Lipozyme	0,16	3,48	0,33	23,79	18,89	0,16
Pal	0,15	7,11	24,18	0,11	0,27	17,55
Actividad expresada como μ moles de octanoato de octilo producidos en 24 h.						

ES 2 323 572 T3

Ensayo IIc)

Hidrólisis de octanoato de etilo (realizada en una mezcla de DME/agua)

- 5 Se añaden 50 μ l de H₂O y 0,95 ml de solución de octanoato de etilo 43 mM y decano 25 mM a un tubo Eppendorf que contiene la enzima y se deja agitar a temperatura ambiente. En el momento especificado, se añade Na₂SO₄ anhidro a la mezcla de reacción, se agita y se centrifuga. A continuación, se extrae una alícuota (100 μ l), se disuelve en 0,5 ml de DME y se analiza mediante GC.
- 10 El resultado se resume en la tabla 3.

TABLA 3

15

Hidrólisis de octanoato de etilo en DME/agua						
Enzima	Ia	Ib	Ic	Id	Ie	Nativa
20 Lipozyme	24,34	<u>40,48</u>	25,37	22,85	22,73	16,34
24 h						
Pal 3 h	35,82	32,02	<u>40,26</u>	0,49	0,37	3,34
25 Actividad expresada como μ moles de ácido octanoico producidos en 24 ó 3 h.						

- 30 Como muestran los anteriores resultados, la adición de un tensioactivo o un éter corona según la presente invención, puede tener un efecto beneficioso sobre la actividad enzimática.

Ejemplo 3

35 *Ensayo de lavado*

- Se repitió el método Ia usando SP525. El sobrenadante se decanta y el sedimento se resuspende en 5 ml de agua, se centrifuga y el sobrenadante se decanta.
- 40 El sedimento obtenido se somete al mismo procedimiento de lavado con 3*5 ml de agua o DME. Después de la última etapa de lavado, el CLEA se mantiene en 5 ml del mismo disolvente.
- Los dos CLEA se ensayaron usando la transesterificación de octanoato de etilo con octanol (como se ha descrito en el ensayo IIc).
- 45 Se añaden 0,5 ml de DME a 50 μ l de preparación enzimática en un Eppendorf de 2 ml. La enzima lavada solamente con agua se liofilizó previamente en el tubo Eppendorf. Se añaden 50 mg de zeolita NaA activada. Se añaden 0,5 ml de solución de octanoato de etilo 86 mM, octanol 400 mM y decano 50 mM en DME y se deja agitar a temperatura ambiente. Después de 1 hora, la mezcla de reacción se centrifuga, se extrae una alícuota (100 μ l), se disuelve en 0,5 ml de DME y se analiza mediante GC.
- 50

TABLA 4

55

Transesterificación de octanoato de etilo con octanol (en DME)	
Disolvente de procesamiento	Actividad
60 Agua	5,41
DME	14,03
65 Actividad expresada como μ moles de octanoato de octilo producidos en 1 h.	

ES 2 323 572 T3

Ejemplo 4

Se prepararon CLEAs de lipasa según el procedimiento descrito en el ejemplo 1 y se ensayaron en la hidrólisis de mandelato de metilo. La enzima se añadió a una solución de mandelato de metilo 50 mM en tampón dimetoxietano-fosfato potásico pH 7 (95:5 v/v). Después de 48 horas, la conversión y el exceso enantiomérico del sustrato (ee_s) se analizaron usando HPLC (véase Tabla 5).

TABLA 5

Precipitante	Aditivo	Conv. (%)	ee_s	E
Dimetoxietano	-	31,0	0,31 (R)	7
Dimetoxietano	CR	33,5	0,33 (R)	7
Acetona	-	26,7	0,26 (R)	8
$(NH_4)_2SO_4$	SDS	27,9	0,27 (R)	8
$(NH_4)_2SO_4$	TR	23,2	0,24 (R)	10
Enzima libre	-	33,9	0,33 (R)	6
CR: Éter corona dibenzo-18-corona-6 SDS: Dodecilsulfato sódico TR: Triton X-100 ee_s : exceso enantiomérico del sustrato E: Proporción enantiomérica				

A partir de la tabla 5 puede observarse que la Proporción enantiomérica puede aumentar usando el método según la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Método de preparación de agregados enzimáticos reticulados que comprende las etapas de

- a) precipitar una enzima disuelta presente en un medio líquido; y
- b) reticular con un reticulante,

caracterizado porque,

la etapa a) se realiza en presencia de un compuesto seleccionado entre un éter corona o un tensioactivo.

2. Método, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el agregado enzimático reticulado se lava con un segundo líquido de composición orgánica diferente a la del líquido usado en la etapa a).

3. Método, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque las etapas a) y b) se realizan simultáneamente.

4. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el compuesto se retira después de la reticulación.

5. Método, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la enzima es una lipasa.

6. Método para realizar una reacción catalizada por lipasa, seleccionándose dicha reacción entre el grupo que comprende i) transesterificación; ii) hidrólisis; y iii) amoniolisis, **caracterizado** porque se prepara un agregado de lipasa reticulado, según la reivindicación 5, y dicho agregado de lipasa reticulado se pone en contacto con un sustrato.