



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 313 285**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05702349 .1**
96 Fecha de presentación : **27.01.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1709169**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.10.2006**

54 Título: **Estabilización de enzimas.**

30 Prioridad: **28.01.2004 ZA 04/0685**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

73 Titular/es: **CSIR**
Scientia
0002 Pretoria, ZA

72 Inventor/es: **Moolman, Francis Sean;**
Brady, Dean;
Chetty, Avashnee Shamparkesh;
Rolfes, Heidi y
Jordaan, Justin

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Estabilización de enzimas.

5 La presente invención se refiere a la estabilización de enzimas. Más particularmente, se refiere a un procedimiento para producir estructuras de enzima estabilizado, a estructuras de enzima estabilizado y a la utilización de dichas estructuras de enzima estabilizado.

10 Los enzimas resultan comúnmente necesarios como catalizadores en diversas industrias, tales como las industrias química, farmacéutica y cosmética. Sin embargo, al contrario que los catalizadores químicos, los enzimas presentan aplicabilidad y tiempo de almacenamiento limitados debido a su inestabilidad. Los enzimas son muy dependientes de la temperatura y del pH, dificultando su utilización en muchos procedimientos. Además, los enzimas solubles no pueden recuperarse con facilidad de medios acuosos, y la actividad del enzima generalmente se reduce durante el almacenamiento o el procesamiento, limitando la aplicación de los enzimas como catalizadores en el procesamiento químico.

15 La aplicación comercial de los enzimas como catalizadores puede mejorarse mediante la inmovilización del enzima, que proporciona la doble ventaja de incrementar la estabilidad del enzima, al rigidificarlo (mediante la inmovilización del mismo sobre o dentro de una fase sólida), e incrementar el tamaño total del catalizador, simplificando de esta manera la recuperación.

20 Por lo tanto, es común la práctica de inmovilizar los enzimas sobre soportes sólidos con el fin de estabilizar los enzimas y reducir los costes al convertirlos en reciclables. Sin embargo, los enzimas inmovilizados presentan limitaciones, siendo la más importante la actividad enzimática reducida por unidad de volumen de reactor, debido a que únicamente una fracción reducida del volumen inmovilizado constituye el catalizador activo (el enzima). El solicitante también conoce enzimas inmovilizados autosoportados en la forma de cristales de enzima reticulado (CLEC) y aglomerados de enzima reticulado (CLEA), tal como describen López-Serrano P., Cao L., van Rantwijk y Sheldon R.A. (2002), "Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases", Biotechnology Letters 24:1379-1383. Se han realizado reivindicaciones de actividad específica incrementada en ambos casos. Además, los 25 enzimas reticulados CLEC y CLEA son estables en medios de reacción y pueden separarse y reciclarse con facilidad. CLEA aparentemente proporciona un procedimiento más económico y eficiente en comparación con CLEC, en el que resultan necesarios protocolos de cristalización laboriosos. Sin embargo, tanto CLEC como CLEA son limitantes en el aspecto de que algunos sitios activos de los enzimas no se encuentran expuestos y por lo tanto en compensación los procedimientos que utilizan CLEA o CLEC requieren un exceso de catalizador enzimático (con un coste incrementado asociado) para una función particular. Además, dichos procedimientos no proporcionan un control fácil del tamaño de 30 partícula ni de la morfología en un amplio espectro de tamaños de partícula.

De esta manera, un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar un procedimiento para producir estructuras de enzima estabilizado adecuadas para la utilización como catalizador, en el que estas desventajas por lo 35 menos se reducen.

De esta manera, según un primer aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para producir estructuras enzimáticas, procedimiento que incluye:

45 proporcionar una emulsión de una primera fase líquida dispersada en una segunda fase líquida, siendo la primera fase líquida una fase hidrofílica y siendo la otra fase líquida una fase hidrofóbica que es inmiscible en la fase hidrofílica, y estando localizadas las moléculas de enzima en los límites interfaciales entre las gotículas y la segunda fase líquida o dentro de dichos límites; y

50 reticular las moléculas de enzima de las gotículas respectivas de manera que las estructuras individuales de enzima, que son estables y en las que los enzimas se encuentran inmovilizados con una mayoría de sitios activos de los enzimas orientados interna o externamente, se formen a partir de las gotículas individuales, y

55 recuperar las partículas individuales de enzima a partir de la segunda fase líquida.

Debido a que, en una emulsión, las gotículas de la primera fase líquida inmiscible normalmente son esféricas, las estructuras normalmente serán de esta manera de forma esférica hueca, encontrándose las superficies internas o el interior de las estructuras esféricas vacío o lleno. En otras palabras, cada estructura enzimática comprende una pared esférica de moléculas de enzima inmovilizado reticulado, y un centro, núcleo o interior hueco que puede encontrarse 60 vacío o contener un líquido, es decir estar lleno, tal como se describe a continuación en la presente memoria.

En una forma de realización de la invención, las estructuras individuales pueden presentar aberturas, de manera que las fases líquidas pueden salir de las estructuras o entrar en las mismas. Sin embargo, en otra forma de realización de la invención, las estructuras pueden ser impermeables a líquidos, es decir pueden encontrarse en la forma de cápsulas, 65 estando en este caso la primera fase líquida atrapada en el interior de las cápsulas, es decir llenando los núcleos huecos de las cápsulas. En el caso de que dichas cápsulas de enzima estabilizado se utilicen entonces en un sistema de reacción líquido, por ejemplo para catalizar el sistema de reacción, podrán separarse con facilidad de otros componentes del sistema de reacción, por ejemplo mediante flotación, seleccionando una primera fase líquida que presente una densidad

apropiada. Sin embargo, al utilizarlo en dicho tipo de sistema, no necesariamente deben separarse únicamente mediante flotación, debido al hecho de que las estructuras estabilizadas de enzima son autosoportantes, es decir pueden separarse fácilmente de los demás componentes en el sistema de reacción y reciclarse o reutilizarse.

- 5 Las moléculas de enzima con frecuencia contienen extremos o caras hidrofílicos e hidrofóbicos. Al utilizar estos enzimas, la recolección y/o la orientación de los mismos en los límites interfaciales de las gotículas y la segunda fase líquida resulta facilitada o garantizada. Pueden realizarse modificaciones de los enzimas nativos para incrementar dichas propiedades. De esta manera, puede añadirse un aditivo a la fase hidrofílica y/o a la fase hidrofóbica y/o a la emulsión para modificar la hidrofobicidad y/o carga del enzima. Entre los ejemplos de aditivos o modificadores
10 que pueden utilizarse para dicho fin se incluyen aminoácidos específicos; compuestos amino; proteínas, aldehídos de hidrocarburo de cadena larga; y otros modificadores que se unen covalentemente o de otra manera a los enzimas.

- Aunque el enzima puede seleccionarse de entre clases enzimáticas tales como esterases, proteasas, nitrilasas, hidratas de nitrilo, oxinitrilasas, epóxido hidrolasas, halohidrina deshalogenasas, polifenoloxidasas (por ejemplo lacasa),
15 penicilina amidasas, aminoacilasas, ureasas, uricasas, lisozimas, asparaginasas, elastasas, preferentemente es una lipasa.

- La lipasa puede seleccionarse de entre fuentes microbianas, animales o vegetales, incluyendo cualquiera de las siguientes: lipasa de *Pseudomonas cepacia*, lipasa de *Pseudomonas fluorescens*, lipasa de *Pseudomonas alcaligenes*,
20 lipasas de *Candida rugosa*, lipasa A de *Candida antarctica*, lipasa B de *Candida antarctica*, lipasa de *Candida utilis*, lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, lipasa de *Aspergillus niger*, lipasa de *Aspergillus oryze*, lipasa de *Penicillium* sp, lipasa de *Mucor javanicus*, lipasa de *Mucor miehei*, lipasa de *Rhizopus arrhizus*, lipasa de *Rhizopus delemer*, lipasa de *Rhizopus japonicus*, lipasa de *Rhizopus niveus* y lipasa pancreática porcina.

- 25 Al utilizar lipasa, las estructuras de lipasa estabilizadas puede utilizarse, en particular, en reacciones de hidrólisis, acidólisis, alcoholisis, esterificación, transesterificación, interesterificación, amoniólisis, aminólisis y perhidrolisis. Se utilizarán otras clases de enzima en otros mecanismos de reacción particularmente a su función.

- Más particularmente, la emulsión puede proporcionarse mediante disolución o solubilización del enzima en la
30 fase hidrofílica (denominada asimismo en la presente memoria “fase agua” o simplemente “W”) y formación de la emulsión mediante mezcla del enzima que contiene fase hidrofílica con la fase hidrofóbica (también denominada en la presente memoria “fase aceite” o simplemente “O”). De esta manera, la emulsión puede ser del tipo O/W, es decir, gotículas de aceite o de fase hidrofóbica en una fase agua o hidrofílica continua, W/O, es decir, gotículas de agua o de fase hidrofílica en una fase aceite o hidrofóbica continua, O/W/O, W/O/W o similar.

- 35 El procedimiento puede incluir además precipitar selectivamente el enzima en la interfase (para emulsiones O/W) o dentro del volumen de la gotícula (para emulsiones W/O), por ejemplo mediante el incremento de la concentración de una sal presente en la fase agua (“fraccionamiento salino”).

- 40 El reticulado de las moléculas de enzima puede llevarse a cabo por medio de un agente reticulante. De esta manera, el procedimiento puede incluir añadir el agente reticulante a la fase hidrofílica y/o a la fase hidrofóbica y/o a la emulsión. El agente reticulante típicamente se selecciona de manera que la reticulación únicamente se lleva a cabo transcurrido un periodo de tiempo suficiente, tras la formación de la emulsión, para que tenga lugar la orientación del enzima en la interfase de fases.

- 45 El agente reticulante, en caso de utilizarse, es un reactivo multifuncional, es decir una molécula que presenta dos o más grupos funcionales o sitios reactivos que pueden reaccionar con grupos en el enzima formando una macromolécula reticulada, es decir la estructura estabilizada. El agente reticulante puede seleccionarse de entre los siguientes: un isocianato, tal como diisocianato de hexametileno o diisocianato de tolueno; un aldehído, tal como glutaraldehído,
50 succinaldehído y glioxal; un epóxido; un anhídrido o similar. La utilización de diversos reactivos reticulantes también puede permitir la modificación de las propiedades físicas y/o químicas de las esferas.

- La protección de los sitios activos de un enzima frente a la ocupación o la reacción con el agente reticulante puede conseguirse mediante la adición de un protector temporal que puede ocupar los sitios activos durante la reticulación.
55 En el caso de una lipasa, este protector puede ser, por ejemplo, la tributirina. La tributirina, que es soluble en agua, puede a continuación eliminarse mediante lavado en agua. Enzimas específicos (incluso dentro de clases específicas requieren diferentes protectores para minimizar o evitar la pérdida de actividad durante la reticulación.

- Si la aglomeración de las estructuras o esferas de enzima estabilizadas resulta problemática, ésta puede reducirse o
60 inhibirse mediante la adición de aminoácidos tras la reticulación. Estos aminoácidos pueden reaccionar con cualquier grupo reticulante libre residual y de esta manera modificar las propiedades físicas de las esferas reticuladas. La modificación de las esferas con aminoácidos también puede incrementar la actividad del enzima hacia un sustrato específico mediante la manipulación de las propiedades superficiales de las esferas. La fenilglicina puede añadirse, por ejemplo,
65 a esferas reticuladas para mejorar la hidrofobicidad de las esferas, mientras que la modificación con ácido aspártico proporcionaría una hidrofiliidad mejorada de las esferas.

El procedimiento incluye recuperar o separar las estructuras de enzima estabilizado a partir de la segunda fase líquida, por ejemplo mediante flotación, filtración, centrifugación, magnetismo o similar. Las estructuras de enzima

estabilizado recuperadas de esta manera pueden lavarse, si se desea, y después secarse, si también resulta deseable. El secado de las estructuras de enzima estabilizadas puede realizarse por medio de secado por pulverización, secado en vacío o liofilización (secado por congelación).

El procedimiento además puede incluir, si se desea, extraer la primera fase líquida de las estructuras de enzima estabilizado, por ejemplo por medio de secado, secado por congelación o extracción con un solvente adecuado, tal como hexano o dióxido de carbono supercrítico (para líquidos hidrofóbicos) o agua (para líquidos hidrofílicos). De esta manera, en caso de desearse la extracción de la primera fase líquida (normalmente la fase aceite) de las cápsulas de enzima estabilizadas, ésta puede llevarse a cabo poniendo en contacto las cápsulas de enzima estabilizadas con un solvente orgánico que puede disolver la primera fase líquida, o poniendo en contacto las cápsulas con una mezcla de un surfactante adecuado en agua. Alternativamente, la primera fase líquida puede a continuación extraerse mediante extracción con líquido supercrítico. Por lo tanto, el líquido preferentemente es dióxido de carbono supercrítico. El punto crítico para el dióxido de carbono (31,2°C y 73,8 barías) es suficientemente bajo para que el procedimiento de extracción no dañe la estructura de enzima estabilizado.

Aunque la fase hidrofílica en la que se disuelven los enzimas puede comprender únicamente agua, se cree que pueden conseguirse resultados mejorados si incluye un tampón adecuado. El tampón debe incluirse para facilitar la reticulación de las moléculas de enzima, garantizando la estabilidad del enzima. De esta manera, por ejemplo, la fase hidrofílica puede comprender una solución de tampón de pH 7 a 8. Este tampón puede ser solución salina tamponada con fosfato (PBS), una solución acuosa que contiene tampón tris-(hidroximetil)aminometano (TRIS) o una solución de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$.

Alternativamente, la fase hidrofílica puede incluir o comprender un polietilenglicol (PEG). En el caso de utilizar polietilenglicol de bajo peso molecular, tal como PEG400 o PEG100, puede utilizarse por sí solo, es decir, la fase hidrofílica en este caso consistirá de polietilenglicol de bajo peso molecular. Sin embargo, alternativamente puede utilizarse opcionalmente un polietilenglicol de peso molecular más elevado, en este caso disuelto en agua para formar la fase hidrofílica. En el caso de que se utilice un isocianato como agente reticulante en una emulsión de agua en aceite, el agente reticulante reaccionará con el PEG, así como con el enzima, conduciendo a la formación de cápsulas de enzima estabilizadas reforzadas que contienen membrana con enzima incorporada con un soporte interno de hidrogel. Alternativamente, puede polimerizarse acrilamida para proporcionar un soporte similar. Lo expuesto anteriormente puede mejorar ventajosamente la resistencia mecánica de las cápsulas, mejorando, por ejemplo, la resistencia frente al cizallamiento.

La fase inmiscible en agua, es decir la fase hidrofóbica, puede comprender un aceite, tal como aceite mineral, de yoyoba o de aguacate; un hidrocarburo, tal como decano, heptano, hexano o isododecano; un éter, tal como éter dioctílico, éter difenílico o similar; un éster, tal como triglicérido, palmitato de isopropilo o miristato de isopropilo; o similares. Se cree que la emulsión utilizada en el procedimiento de la invención normalmente se encontrará en la forma de una emulsión de agua en aceite o emulsión W/O; sin embargo, tal como se ha indicado anteriormente, en su lugar pueden utilizarse emulsiones de aceite en agua o O/W, de aceite en agua en aceite, es decir O/W/O, o de agua en aceite en agua, es decir, W/O/W. De esta manera, por ejemplo en el caso de que el enzima sea una lipasa, puede utilizarse una emulsión de agua en aceite para garantizar que la mayoría de los sitios activos de la lipasa, que son hidrofóbicos, se encuentran orientados hacia afuera, incrementando de esta manera la actividad efectiva total de las estructuras.

Además, en el caso de que se utilice una emulsión de agua en aceite, puede disolverse ventajosamente un segundo enzima en la fase acuosa o hidrofílica. Si este segundo enzima también presenta la capacidad de acumularse en las interfases de gotícula/segunda fase líquida, las estructuras de enzima reticuladas resultantes contendrán ambos enzimas. Alternativamente, si el segundo enzima se selecciona de manera que no se acumule en las interfases, una estructura de enzima reticulada resultará que un enzima será un componente principal de la estructura, mientras que el segundo enzima se encontrará encapsulado o contenido dentro de la estructura. Dicha estructura enzimática de combinación puede utilizarse ventajosamente, por ejemplo, para catalizar múltiples reacciones en una sola etapa de reacción. Además, pueden incluirse cofactores o mediadores de reacción, modificados o no, en la gotícula, por ejemplo pueden incorporarse en la esfera un enzima redox y un mediador adecuado con el fin de regenerar un segundo enzima redox en la esfera.

En una forma de realización particular de la invención, puede utilizarse un triglicérido, que es hidrolizable por lipasa, como fase hidrofóbica o fase aceite, formándose una emulsión O/W; la fase dispersada o fase aceite, es decir el triglicérido, contenido dentro de las estructuras reticuladas estabilizadas resultan hidrolizadas por la lipasa durante la reacción de reticulación y después de la misma. Los productos hidrolizados son generalmente solubles en agua, y de esta manera puede lixiviarse con facilidad hacia el exterior, minimizando o reduciendo de esta manera el número de etapas de procesamiento necesarias para producir las estructuras estabilizadas.

Todavía en otra forma de realización de la invención, puede formarse una emulsión O/W inicial. Durante dicha formación, tiene lugar cierto grado de purificación de la lipasa, debido a que las impurezas presentes en la misma no se acumularán en los límites interfaciales en el mismo grado que la lipasa. En este caso el procedimiento puede incluir, antes de realizar la reticulación, la centrifugación de la emulsión y la separación de una emulsión concentrada de una fase agua diluida. Después, puede formarse una emulsión O/W adicional, utilizando la emulsión concentrada. Esta etapa puede, si se desea, repetirse una o más veces, para incrementar la pureza de la lipasa. Tras la última de

dichas etapa de purificación, la emulsión puede invertirse para formar una emulsión W/O, mediante la adición de surfactantes para rebajar los valores HLB, que pueden encontrarse comprendidos en el intervalo de entre 3 y 10, más preferentemente de entre 4 y 6. Lo expuesto anteriormente garantiza la orientación preferida de los sitios activos de lipasa hacia el exterior de las gotículas de la fase dispersada. A continuación, puede llevarse a cabo la reticulación de la lipasa tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria.

En el caso de que se utilice un enzima que se acumule en la interfase, y se utilice una emulsión W/O, puede controlarse la morfología interna de esfera del enzima reticulado mediante modificación de la concentración de enzima disuelto en la fase acuosa. Por ejemplo, puede formarse una esfera hueca de enzima mediante la utilización de una concentración reducida de enzima, y la actividad en peso mejorará debido a las distancias medias reducidas de difusión de los sustratos.

Para proporcionar propiedades específicas a las estructuras de enzima estabilizado, puede añadirse un modificador a la fase hidrofílica y/o a la fase hidrofóbica y/o a la emulsión. Puede añadirse uno o más de los modificadores siguientes de esta manera: un surfactante, un precipitador y un aditivo.

Puede utilizarse un surfactante en caso de que se desee proporcionar actividad enzimática incrementada (respecto a su utilización en una reacción catalizada posterior) y estabilidad de emulsión mejorada. El surfactante puede ser aniónico, catiónico, no iónico, zwitteriónico, polimérico o mezclas de dos o más de los mismos. En el caso de que se utilice un surfactante aniónico, puede ser un sulfato de alquilo, tal como laurilsulfato sódico o laureth sulfato sódico, o un sulfato de éter alquílico. En el caso de utilizar un surfactante catiónico, podría ser cloruro de centrimonio. En el caso de que se utilice un surfactante no iónico, puede ser un alquilfenol etoxilado, tal como polioxietilén (10) éter isooctilciclohexílico (Triton X100) o polioxietilén (9) éter nonilfenílico (nonoxinol-9). En el caso de que se utilice un surfactante zwitteriónico o anfifílico, éste puede ser decilbetaína. En el caso de que se utilice un surfactante polimérico, puede un copolímero tribloque de óxido de etileno-óxido de propileno-óxido de etileno, también conocido como poloxámero, tal como el disponible bajo la marca comercial Pluronic, de BASF, o puede ser un copolímero tribloque óxido de propileno-óxido de etileno-óxido de propileno, también conocido como meroxapol.

Puede utilizarse un precipitador en caso de desearse la precipitación del enzima sobre las interfases de la emulsión. El precipitador, en caso de encontrarse presente, puede ser una sal inorgánica, tal como sulfato amónico; un solvente orgánico, tal como 1,2-dimetiletano o acetona, o un polímero disuelto.

Se utilizan aditivos o adyuvantes para proporcionar las propiedades deseadas a la emulsión y/o a las estructuras de enzima estabilizado. Entre las propiedades que pueden modificarse mediante la utilización de dichos aditivos se incluyen el pH, mediante la utilización, por ejemplo, de un tampón; la fuerza iónica, mediante la utilización de, por ejemplo, sales; la viscosidad, mediante la utilización de, por ejemplo, PEG; las propiedades magnéticas, mediante la utilización de, por ejemplo, sales de hierro; la tendencia a la aglomeración, mediante la utilización de, por ejemplo, un surfactante que presente propiedades de impedimento estérico; y el potencial zeta, mediante la utilización de, por ejemplo, un surfactante aniónico.

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona una estructura enzimática, que comprende moléculas reticuladas de enzima, de manera que la estructura es estable, siendo hueca la estructura, y en la que los enzimas se encuentran inmovilizadas estando una mayoría de sitios activos de los enzimas orientados interna o externamente.

La estructura del enzima puede ser tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria haciendo referencia al primer aspecto de la invención.

Según un tercer aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para llevar a cabo una reacción, que incluye dejar que un medio de reacción experimente una reacción en presencia de una pluralidad de estructuras de enzima tales como las descritas anteriormente, estando catalizada la reacción de esta manera por las estructuras enzimáticas.

A continuación, se describe la invención con mayor detalle haciendo referencia a los ejemplos no limitativos siguientes y a los dibujos adjuntos.

En los dibujos,

la figura 1 es una fotografía de microscopía óptica de cápsulas de lipasa reticulada preparadas según el Ejemplo 1,

la figura 2 es un gráfico de distribución de tamaños de partícula de las cápsulas de lipasa reticulada preparadas en el Ejemplo 1,

la figura 3 es una fotografía de microscopía óptica de cápsulas de lipasa reticulada preparadas según el Ejemplo 2,

la figura 4 es un gráfico de distribución de tamaños de partícula de las cápsulas de lipasa reticulada preparadas en el Ejemplo 2.

Ejemplo 1

(No optimizado)

5 *Esferas (estructuras) de lipasa reticulada o estabilizada de emulsión de agua en aceite*

Se añadió 1 g de lipasa Amano AK a 195 g de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (pH 7,8) y 5 g de aceite mineral (Castrol). A continuación, esta mezcla se homogeneizó durante 5 minutos utilizando un homogeneizador rotor-stator de laboratorio Silverson L4R a 6.000 rpm. Se añadieron 1,5 g de diisocianato de hexametileno (Merck Schuchardt) a la emulsión. A continuación, la emulsión se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, se recuperaron estructuras reticuladas de enzima mediante filtración utilizando papel de filtro de 0,45 μm y se lavaron 5 veces con 50 ml de PBS cada vez (total: 250 ml de PBS). La figura 1 muestra esferas o estructuras de enzima estabilizado típicas obtenidas según el procedimiento. Se determinaron los tamaños de partícula utilizando dispersión de luz láser (Malvern Mastersizer 2000) y un diámetro medio Sauter de 49,4 μm (ver la fig. 2).

Se determinó la actividad de las estructuras de enzima estabilizado (lipasa) utilizando un procedimiento de ensayo con p-nitrofenilacetato, tal como describen Vorderwülbecke, T., Kiestlich, K. y Erdmann, H., 1992, Comparison of lipases by different assays, *Enzyme Microb. Technol.* 14:631-639; y López-Serrano P., Cao L., van Rantwijk y Sheldon R.A., 2002, Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases, *Biotechnology Letters* 24:1379-1383.

Dicho ensayo mide la liberación de p-nitrofenol a partir de un p-nitrofenil éster de un ácido graso. La reacción se llevó a cabo a pH 7,4 a 37°C y se midió el p-nitrofenil éster a 410 nm. La actividad obtenida fue de 63 U/g de lipasa, donde U es $\mu\text{moles/min}$.

Ejemplo 2

Esferas (estructuras) reticuladas o estabilizadas de lipasa de emulsión de agua en aceite

Se preparó una solución de lipasa mediante resuspensión de lipasa de *Candida rugosa* (Altus Biologics, Inc.) en tampón Tris-HCl 100 mM (tris(hidroximetil)aminometano) (pH 8,0) hasta una concentración final de 100 mg/ml. La muestra de enzima se diafiltró utilizando una celda de ultrafiltración Amicon provista de una membrana de poliéter sulfona 10 K (Microsep (Pty) Ltd., PO Box 391647, Bramley 2018, Sudáfrica) frente a 3 volúmenes de tampón Tris-HCl 100 mM (pH 8,0).

Se prepararon esferas de lipasa utilizando los reactivos siguientes en los volúmenes siguientes: 200 μl de solución de lipasa de *Candida rugosa* (tal como se ha preparado anteriormente); 50 μl de nonoxinol-4; 50 μl de tributirina; 5 ml de aceite mineral. Esta mezcla se emulsionó mediante agitación durante 1 minutos a 1.500 rpm. A esta solución, se añadieron 40 μl de glutaraldehído (solución acuosa al 25%) y se dejó bajo agitación durante 10 minutos adicionales. La emulsión se dejó reposar a 4°C durante 12 horas.

Tras la reticulación, la emulsión se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos utilizando una centrífuga Beckman J2-21 ME provista de un rotor JA 20.1, después de lo cual se separó la fase aceite. El pellet se lavó tres veces con 10 ml de tampón Tris-HCl 100 mM (pH 8,0) y se recuperó el pellet mediante centrifugación, tal como se ha indicado anteriormente. Tras el lavado, el pellet se resuspendió en 1 ml de tampón y se sometió a ensayo para la actividad enzimática. La figura 3 muestra las esferas de enzima obtenidas. Las esferas presentaban una distribución de tamaños estrecha de entre aproximadamente 10 y 100 μm (figura 4).

Se determinó la actividad de las estructuras de enzima estabilizado (lipasa) utilizando un procedimiento de ensayo de p-nitrofenilpalmitato y p-nitrofenilbutirato, tal como han descrito Vorderwülbecke, T., Kieslich, K. y Erdmann, H., 1992, Comparison of lipases by different assays, *Enzyme Microb. Technol.* 14:631-639, y López-Serrano P., Cao L., van Rantwijk y Sheldon, R.A., 2002, Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity application to lipases, *Biotechnology Letters* 24:1379-1383.

Dicho ensayo mide la liberación de p-nitrofenol a partir de un p-nitrofenil éster de un ácido graso. La reacción se llevó a cabo a pH 8,0 a 37°C y se midió el p-nitrofenol a 410 nm. La actividad sin tributirina como aditivo era 0,11% (para el p-nitrofenilpalmitato) respecto al enzima libre original en solución acuosa. Inesperadamente, la actividad obtenida con la tributirina como aditivo estaba comprendida entre aproximadamente 5% (para el p-nitrofenilpalmitato) y 124% (para el p-nitrofenilbutirato) comparados con el enzima libre original en solución acuosa.

Ejemplo 3

Aldehído de dextrano como reticulante

Se repitió el Ejemplo 2, con la excepción de que el agente reticulante utilizado era dextrano activado procedente de especie de *Leuconostoc*, peso molecular medio de 20 kDa (aldehído de dextrano), la fase aceite era aceite vegetal, la proporción de solución de lipasa a tampón Tris era de 1:1, y no se utilizó surfactante. Se preparó aldehído de dextrano mediante reacción de dextrano con exceso de metaperyodato sódico, tal como describen Hong, T., Guo, W., Yuan, H.,

ES 2 313 285 T3

Li, J. Liu, Y., Ma, L., Bai, Y. y Li, T., 2004, Periodate oxidation of nanoscaled magnetic dextran composites, Journal of Magnetism and Magnetic Materials, Journal of Magnetism and Magnetic Materials 269:95-100. La actividad obtenida era de 75% (para *p*-nitrofenilpalmitato) comparado con el enzima libre original en solución acuosa.

5 Ejemplo 4

Esferas de enzima reticulado de emulsiones de aceite en agua

10 Se repitió el Ejemplo 2, con la excepción de que se generó una emulsión de aceite en agua mediante la modificación de la proporción de fases líquidas a surfactante.

Ejemplo 5

Diferente clase de enzima (lacasa)

15 Se repitió el Ejemplo 3 con la excepción de que el enzima utilizado fue la lacasa de la especie *UD4*, tal como describen Jordaan, J., Pletschke, B.I. y Leukes, W.D., (2004), Purification and partial characterization of a thermostable laccase from an unidentified basidiomycete, *Enz. Microb. Technol.* 34:635-641, y la tributirina se sustituyó por ácido siríngico (solución saturada en etanol).

20 Las esferas se equilibraron con tampón de succinato-lactato 100 mM, pH 4,5. Las esferas se sometieron a ensayo para actividad de lacasa con ABTS como sustrato a 25°C y el producto se monitorizó espectrofotométricamente a 420 nm siguiendo el procedimiento de Jordaan, J. y Leukes, W.D., 2003, Isolation of a thermostable laccase with DMAB y MBTH oxidative coupling activity from a mesophilic white rot fungus, *Enz. Microb. Technol.* 33(2/3):212-219.

25 Ejemplo 6

Concentración de proteína

30 La reducción de la concentración de lipasa del Ejemplo 2 (sin tributirina) a la mitad, condujo a un incremento superior al 100% de la actividad de lipasa en peso.

35 Una posible explicación de la actividad incrementada alcanzada con una menor concentración de proteína (en comparación con una concentración más alta de proteína) es la acumulación preferida de la proteína (en este caso, la lipasa) en la interfase agua-aceite. Lo expuesto anteriormente conduciría a esferas “huecas” a concentración menor de lipasa. En porcentaje, las esferas huecas resultaría previsible que presentasen una actividad más alta en comparación con las esferas “llenas”, debido a las distancias medias de difusión más cortas para los sustratos y productos de reacción.

40 Ejemplo 7

Adición de un precipitador

45 La adición de acetona como precipitador a la emulsión del Ejemplo 2 (sin tributirina), condujo a un incremento de la actividad de 114%.

Ejemplo 8

Elección de fase aceite

50 La sustitución del aceite vegetal por aceite mineral en el procedimiento del Ejemplo 2 (sin tributirina) condujo a un incremento de cuatro veces de la actividad, aunque con una mayor dificultad de recuperación a partir de la solución de producto. Lo expuesto anteriormente posiblemente se debe a la presencia de aceite hidrolizado.

55 Ejemplo 9

Adición de protector

60 Tal como se ha comentado en el Ejemplo 2, la adición de tributirina como protector, condujo a un incremento de actividad de lipasa de *Candida rugosa* de 0,14% a 5% (para el *p*-nitrofenilpalmitato) comparado con la concentración de enzima libre original. Esta “capacidad protectora” no funciona para todos los enzimas. Por ejemplo, la adición de tributirina como protector a lipasa de *Rhizopus oryzae* condujo a una reducción de doce veces de la actividad, de 4,17% a 0,35% (para el *p*-nitrofenilbutirato) en comparación con los enzimas libres originales.

65

ES 2 313 285 T3

Ejemplo 10

Unión de grupos reticulantes libres residuales para reducir la agregación

5 Mediante la adición de un aminoácido al producto final, se redujo la agregación de las esferas. Lo expuesto anteriormente se cree que se debe a la unión de aminoácidos a los grupos reticulantes residuales sobre la superficie de las esferas. Inesperadamente, también se observó actividad mejorada en comparación con los controles, en los que no se utilizó un aminoácido, específicamente al utilizar fenilglicina como el aminoácido. Se observó una mejora de actividad de aproximadamente 100% para las esferas de lipasa (basadas tanto en p-nitrofenilbutirato y p-nitrofenilpalmitato) en comparación con el procedimiento normal del Ejemplo 2 (sin tributirina).

Ejemplo 11

Reciclado de esferas reticuladas de lacasa

15 Se prepararon esferas de lacasa según el procedimiento del Ejemplo 5. Las esferas se hicieron reaccionar seis veces con sal diamonio de ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico) (ABTS) como sustrato, con recuperación y lavado entre cada reacción. La actividad de lacasa tras estos seis ciclos era comparable a la actividad original de las esferas.

Ejemplo 12

Reciclado de esferas reticuladas de lipasa con NEE

25 Se prepararon esferas de lipasa según el procedimiento del Ejemplo 2. Las esferas se hicieron reaccionar tres veces con naproxén etil éster (NEE) como sustrato a 40°C, con recuperación y lavado entre cada reacción. La actividad se redujo en aproximadamente 70% en los tres ciclos para las esferas reticuladas de lipasa (CLECs del mismo enzima mostraron pérdidas de actividad similares. Brady, D., Steenkamp, L., Skein, E., Chaplin, J.A. y Reddy, S., (2004), Optimisation of the enantioselective biocatalytic hydrolysis of naproxen ethyl ester using ChiroCLEC-CR, Enz. Microb. Technol. 34:283-291).

Ejemplo 13

Reciclado de esferas reticuladas de lipasa con p-nitrofenilpalmitato

35 Se prepararon esferas de lipasa según el procedimiento del Ejemplo 2. Las esferas se hicieron reaccionar con p-nitrofenilpalmitato como sustrato, con recuperación y lavado entre cada reacción. La actividad se redujo a 79,6% de la actividad original de las esferas de lipasa en el ciclo final.

Ejemplo 14

Comparación de la recuperación de la actividad de esferas de lipasa con CLEA

45 Se prepararon esferas de lipasa de *Candida rugosa* según el procedimiento del Ejemplo 2. Se prepararon CLEA de lipasa de *Candida rugosa* según el Ejemplo 8 de la solicitud de patente estadounidense n° 20030149172; Cao, L. y Elzinga, J., con una proporción de glutaraldehído a etilendiamina de 1:7,88.

50 La retención de actividad de las esferas en comparación con las CLEA con p-nitrofenilpalmitato como sustrato se midió como 2,7% para las esferas de lipasa, y de 3,4% para las CLEA, mientras que la actividad con p-nitrofenilbutirato como sustrato se midió en 53,7% para las esferas de lipasa y de 6,5% para las CLEA.

Ejemplo 15

Comparación de emulsiones de aceite en agua y de agua en aceite (orientación de la lipasa)

55 Se prepararon esferas de lipasa de *Candida rugosa* de aceite en agua según el procedimiento del Ejemplo 2. Las esferas de lipasa de *Candida rugosa* de aceite en agua se prepararon según el procedimiento del Ejemplo 2, con la excepción de que se redujo el volumen de aceite a 0,2 ml y se incrementó el volumen de tampón a 5 ml. La actividad específica obtenida para la emulsión de agua en aceite fue 136,0% superior que la emulsión de aceite en agua con p-nitrofenilbutirato como sustrato, y se incrementó de 8,9 a 26,0 U/mg de emulsión O/W a emulsión W/O.

Ejemplo 16

Control del tamaño de esfera realizado mediante agitación mecánica

65 Se prepararon esferas de lipasa de *Candida rugosa* según el procedimiento en el Ejemplo 2, con la excepción de que se utilizó un homogeneizador Silverson para crear la emulsión, y no agitación. Se llevaron a cabo dos experimentos variando únicamente el ajuste de velocidad del homogeneizador, es decir, 1.000 y 3.000 rpm, respectivamente. Se

determinó la distribución de tamaños de partícula y los resultados indican un diámetro medio de $52,0\ \mu\text{m}$ y de $20,6\ \mu\text{m}$ para las esferas producidas utilizando 1.000 rpm y 3.000 rpm, respectivamente, mientras que la actividad específica se incrementó en 28% y en 83% para los sustratos p -nitrofenilpalmitato y p -nitrofenilbutirato, respectivamente.

5 De esta manera, la invención proporciona un procedimiento para estabilizar un enzima por medio de la reticulación, utilizando emulsiones como vehículo para la misma. Asimismo, la invención se refiere a la exposición de la máxima área superficial de enzima por unidad de volumen de la estructura, para la posterior reacción en el caso de que la estructura se utilice como catalizador. Además, las estructuras de enzima estabilizado resultan fácilmente reciclables, más económicas que la mayoría de productos de enzima inmovilizado, y encontrarán aplicación generalizada como
10 catalizadores en diversos procedimientos.

Además, debido a la orientación selectiva de las lipasas en la interfase de las fases hidrofílica/hidrofóbica, se concentrarán en dicha interfase. Por lo tanto, el procedimiento, al aplicarlo en el ejemplo de una emulsión de aceite en agua, purificará simultáneamente la lipasa deseada a partir de un lisado de células curdas. Lo expuesto anteriormente
15 resulta asimismo aplicable a otros enzimas con regiones hidrofóbicas externas, incluyendo muchos enzimas asociados a membrana.

La reticulación de lipasas en la interfase de fases las fija en el estado activado (tapa abierta).

20 La utilización de emulsiones de aceite en agua permite esferas monocapa de lipasa, proporcionando de esta manera un procedimiento de reticulación que proporciona la máxima proporción de área superficial a masa del enzima.

La utilización de emulsiones de agua en aceite permite esferas multicapa más densas de enzima.

25 Dicha forma de inmovilización de enzima permite la recuperación y reciclado de enzimas.

Se cree que el procedimiento de la presente invención, que proporciona estructuras esféricas huecas de enzima estabilizado, proporciona las ventajas siguientes al utilizar posteriormente las estructuras para catalizar reacciones:

- 30 1. Máxima área superficial expuesta del catalizador (cápsulas esféricas huecas).
2. Puede controlarse la flotabilidad del catalizador, por ejemplo, las partículas flotantes pueden separarse del medio de reacción con facilidad.
- 35 3. Puede controlarse el tamaño medio (diámetro) de la partícula de enzima inmovilizada mediante el control de la distribución de tamaños de la emulsión.
4. Mediante la utilización de la autoorientación natural de muchas lipasas y de algunos otros enzimas en las interfases de solvente, puede generarse la esfera de enzima inmovilizado de una manera controlada de manera que se orienten la mayoría de sitios activos hacia el lumen o externamente, según resulte necesario.
- 40 5. Debido a la presencia de una interfase hidrofílica/hidrofóbica, enzimas tales como las lipasas se inmovilizan en la forma activa.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir partículas de enzimas, comprendiendo el procedimiento:

proporcionar una emulsión de gotículas de una primera fase líquida dispersada en una segunda fase líquida, siendo una fase líquida una fase hidrofílica, y siendo la otra fase líquida una fase hidrofóbica que es inmiscible con la fase hidrofílica, y estando localizadas las moléculas de enzima en o dentro de los límites interfaciales de las gotículas y la segunda fase líquida o dentro de dichos límites;

reticular las moléculas de enzima de las gotículas respectivas de manera que las partículas individuales de enzima, que son estables y en las que los enzimas se encuentran inmovilizados estando una mayoría de los sitios activos de los enzimas orientados interna o externamente, se forman a partir de gotículas individuales; y

recuperar las partículas de enzima individuales a partir de la segunda fase líquida.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que las partículas individuales presentan aberturas de manera que las fases líquidas pueden salir o entrar en las partículas.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que las partículas individuales son impermeables a los líquidos.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende añadir a la fase hidrofílica y/o a la fase hidrofóbica y/o a la emulsión, un modificador para modificar la hidrofobicidad y/o carga del enzima.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el enzima es una lipasa.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que la lipasa se selecciona de entre lipasa de *Pseudomonas cepacia*, lipasa de *Pseudomonas fluorescens*, lipasa de *Pseudomonas alcaligenes*, lipasa de *Candida rugosa*, lipasa A de *Candida antarctica*, lipasa B de *Candida antarctica*, lipasa de *Candida utilis*, lipasa de *Mucor miehei*, lipasa de *Rhizopus arrhizus*, lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, lipasa de *Aspergillus niger*, lipasa de *Aspergillus oryzae*, lipasa de *Penicillium* sp., lipasa de *Mucor javanicus*, lipasa de *Rhizopus delemere*, lipasa de *Rhizopus japonicus*, lipasa de *Rhizopus niveus* y lipasa pancreática porcina.

7. Procedimiento según la reivindicación 5 ó 6, en el que la provisión de la emulsión se lleva a cabo disolviendo el enzima en la fase hidrofílica o W y formando la emulsión mediante mezcla de la fase hidrofílica que contiene el enzima con la fase hidrofóbica o fase O.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, que comprende precipitar selectivamente el enzima en las interfase cuando la emulsión sea una emulsión O/W en la que las gotículas de la fase hidrofóbica se encuentren dispersadas en una fase hidrofílica continua, o dentro del volumen de la gotícula, cuando la emulsión sea una emulsión W/O en la que las gotículas de la fase hidrofílica se encuentren dispersadas en una fase hidrofóbica continua.

9. Procedimiento según la reivindicación 7 u 8, en el que la reticulación de las moléculas de enzima se lleva a cabo por medio de un agente reticulante que se añade a la fase hidrofílica y/o a la fase hidrofóbica y/o a la emulsión.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, que comprende añadir a la fase hidrofílica y/o a la fase hidrofóbica y/o a la emulsión, un protector temporal que ocupa los sitios activos del enzima durante la reticulación, inhibiendo así la ocupación o la reacción con los sitios activos por el agente reticulante.

11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, que comprende añadir un aminoácido a la emulsión para inhibir la aglomeración de las partículas individuales de enzima.

12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, que comprende recuperar las partículas de enzima a partir de la segunda fase líquida.

13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, que comprende extraer la primera fase líquida a partir de las partículas de enzima.

14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, en el que la fase hidrofílica comprende agua y, opcionalmente, un tampón en el agua.

15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, en el que la fase hidrofílica comprende un polietilenglicol y, opcionalmente, agua mezclada con el polietilenglicol.

16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15, en el que la fase hidrofóbica comprende un aceite; un hidrocarburo; un éter; o un éster.

ES 2 313 285 T3

17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 16, en el que la emulsión es una emulsión W/O en la que las gotículas de la fase hidrofílica se encuentran dispersadas en una fase hidrofóbica continua, encontrándose presente un segundo enzima, cofactor y/o mediador en la fase hidrofílica.

18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 16, en el que se utiliza un triglicérido, que es hidrolizable por lipasa, como la fase hidrofóbica, con una emulsión O/W, en el que las gotículas de fase hidrofóbica se encuentran dispersadas en una fase hidrofílica continua, estando formada y siendo hidrolizada la fase hidrofóbica dispersada contenida dentro de las partículas reticuladas por la lipasa durante y después de la reacción de reticulación.

19. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 16, en el que una emulsión O/W inicial, en la que las gotículas de fase hidrofóbica se encuentran dispersadas en una fase hidrofílica continua, se forma, comprendiendo el procedimiento, antes de llevar a cabo la reticulación, la centrifugación de la emulsión y la separación de una emulsión concentrada de una fase hidrofílica diluida, con el fin de incrementar la pureza de la lipasa, y la inversión de la emulsión para formar una emulsión W/O en la que las gotículas de la fase hidrofílica se encuentran dispersadas en una fase hidrofóbica continua, mediante la adición de un surfactante con un valor HLB inferior.

20. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en el que, para proporcionar propiedades específicas a las partículas de enzima, se añade un modificador a la fase hidrofílica y/o a la fase hidrofóbica y/o a la emulsión.

21. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que el modificador es un surfactante, para proporcionar actividad enzimática incrementada y estabilidad de la emulsión mejorada.

22. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que el modificador es un precipitador para precipitar el enzima sobre las interfases de la emulsión.

23. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que el modificador es un aditivo para modificar el pH; fuerza iónica; viscosidad; propiedades magnéticas; tendencia a la aglomeración; y/o potencial zeta de la emulsión y/o de las partículas de enzima.

24. Partícula de enzima, que comprende moléculas de enzima reticuladas de manera que la partícula es estable, siendo la partícula hueca, y en la que los enzimas se encuentran inmovilizados, estando una mayoría de los sitios activos de los enzimas orientados interna o externamente.

25. Partícula de enzima según la reivindicación 24, que es esférica.

26. Partícula de enzima según la reivindicación 24 ó 25, que contiene, en su cavidad, un líquido.

27. Partícula de enzima según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, en la que el enzima es una lipasa.

28. Partícula de enzima según la reivindicación 27, en la que la lipasa se selecciona de entre lipasa de *Pseudomonas cepacia*, lipasa de *Pseudomonas fluorescens*, lipasa de *Pseudomonas alcaligenes*, lipasa de *Candida rugosa*, lipasa A de *Candida antarctica*, lipasa B de *Candida antarctica*, lipasa de *Candida utilis*, lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, lipasa de *Aspergillus niger*, lipasa de *Aspergillus oryzae*, lipasa de *Penicillium* sp., lipasa de *Mucor javanicus*, lipasa de *Mucor miehei*, lipasa de *Rhizopus arrhizus*, lipasa de *Rhizopus delemere*, lipasa de *Rhizopus japonicus*, lipasa de *Rhizopus niveus* y lipasa pancreática porcina.

29. Procedimiento para llevar a cabo una reacción, que comprende dejar que un medio de reacción experimente una reacción en presencia de una pluralidad de las partículas de enzima según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 28, estando catalizada la reacción así por las partículas de enzima.

ES 2 313 285 T3

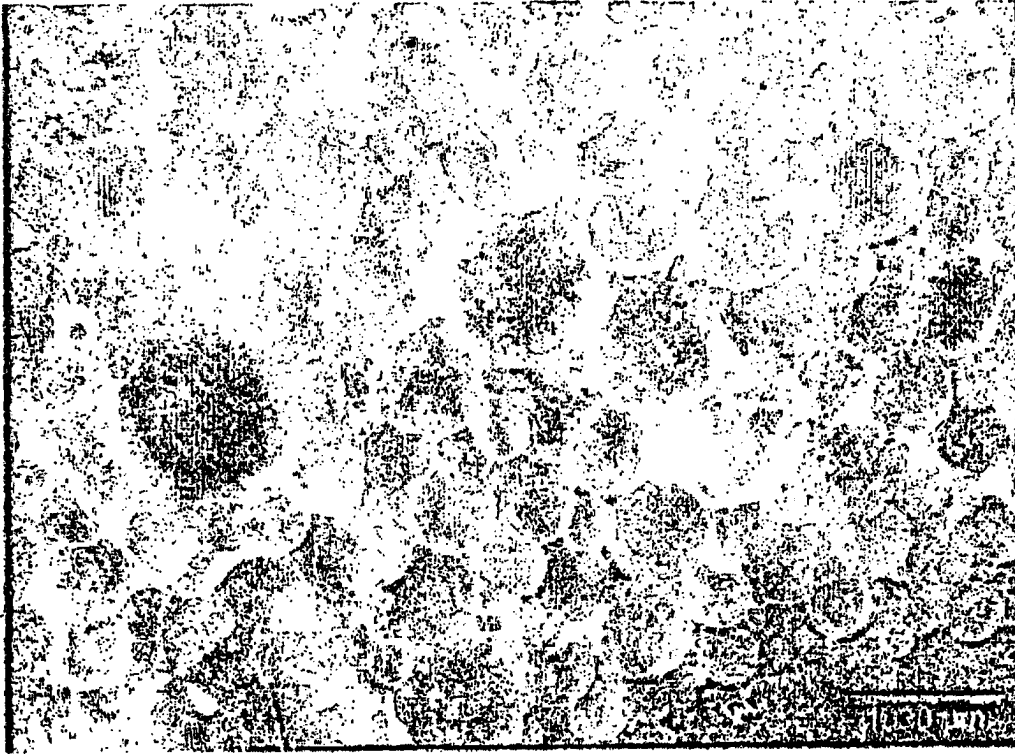


FIG 1

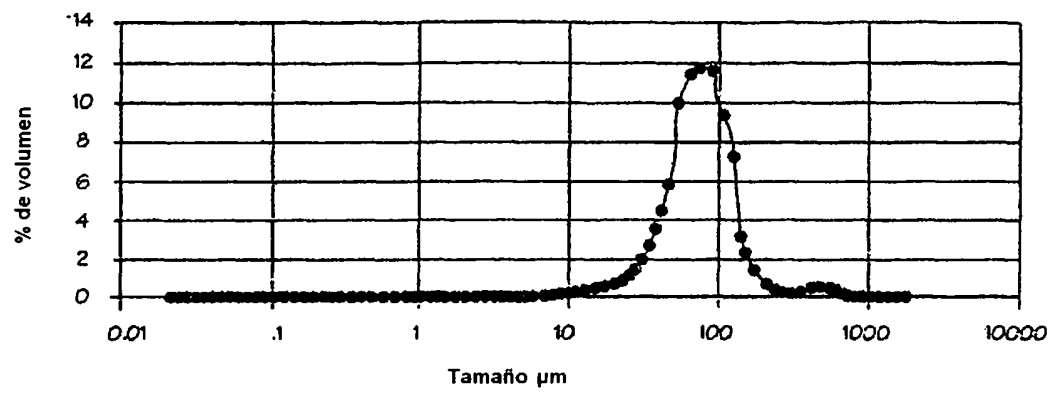
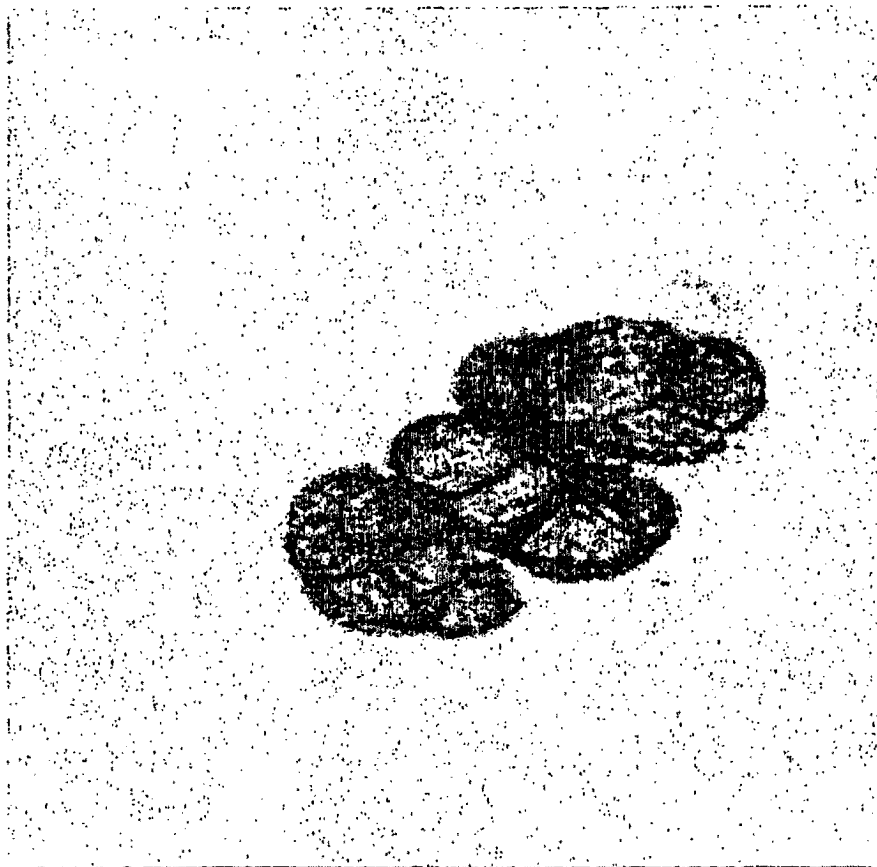


FIG 2



2.

Figura 3. Esferas de lipasa obtenidas según el Ejemplo 2

FIG 3

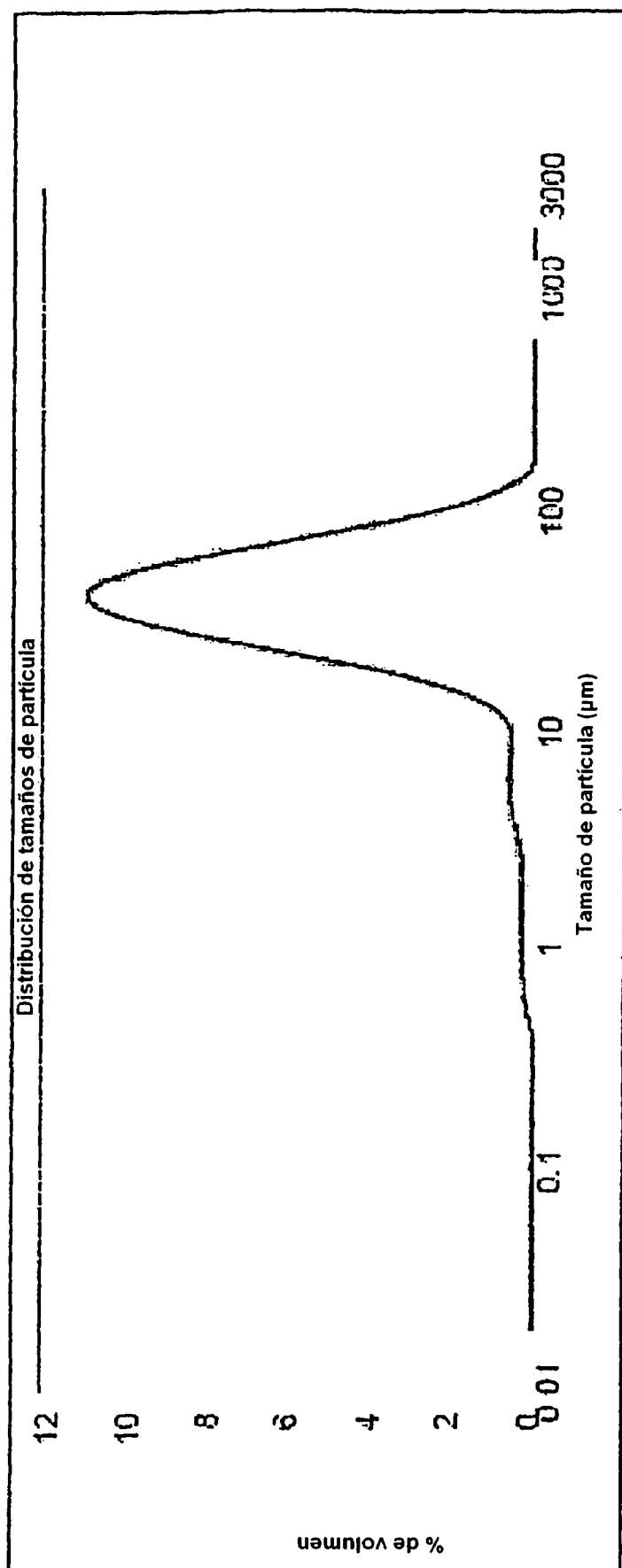


Figura 4. Distribución de tamaños de partícula de esferas de lipasa según el Ejemplo 2

FIG 4