

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 367**

21 Número de solicitud: 201330952

51 Int. Cl.:

C12N 9/00 (2006.01)

C12N 1/16 (2006.01)

C07K 14/39 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

25.06.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.02.2015

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)**

**Serrano, 117
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**GUISÁN SEIJAS, José Manuel;
MATEO GONZÁLEZ, César;
FERNÁNDEZ LORENTE, Gloria y
MARCIELLO, Marzia**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **Nuevos catalizadores altamente estabilizados de la enzima β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* inmovilizada sobre soportes glioxil.**

57 Resumen:

Nuevos catalizadores altamente estabilizados de la enzima β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* inmovilizada sobre soportes glioxil.

La presente invención se refiere a un procedimiento de estabilización de una β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*, preferentemente inmovilizada en un soporte, que comprende unir la enzima a un polímero activado con al menos un agente conservante de estabilización de enzimas, dicho polímero activado comprendiendo grupos aldehído y/o carboxilo, y donde la unión es de tipo covalente y/o electrostática entre al menos un grupo amino de la enzima con un grupo aldehído o carboxilo del polímero activado.

Es asimismo objeto de la presente invención, el catalizador de β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* obtenido por el procedimiento anterior, así como sus diferentes usos tales como la hidrólisis de lactosa en leche y sueros ácidos, la síntesis de galactooligosacáridos o su uso en reactores de tanque agitado, de lecho fijo o de lecho fluidizado.

ES 2 529 367 A1

DESCRIPCIÓN

NUEVOS CATALIZADORES ALTAMENTE ESTABILIZADOS DE LA ENZIMA β -GALACTOSIDASA DE *Kluyveromyces lactis* INMOVILIZADA SOBRE SOPORTES GLIOXIL

5

Sector de la técnica

La presente invención se enmarca dentro de los sectores químico y farmacéutico, más concretamente dentro del campo de la biocatálisis para procesos de hidrólisis de lactosa o de síntesis de galactooligosacáridos. También se refiere al campo de la alimentación, y específicamente a la industria de los productos lácteos en procesos de hidrólisis de lactosa tanto en leche como en sueros ácidos. Así, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de una β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* inmovilizada y estabilizada en un soporte altamente activado con grupos glioxil, así como sus usos en biocatálisis y en la producción de distintos productos de origen lácteo. Esto incluye tanto la hidrólisis de lactosa como la síntesis de galactooligosacáridos que son compuestos muy interesantes útiles como probióticos y que se adicionan a alimentos para favorecer la flora microbiana intestinal.

20

Estado de la técnica

La hidrólisis de lactosa a nivel de cartón de leche es un proceso bien estudiado consistente en la incubación de la leche en presencia de bajas concentraciones de β -galactosidasa soluble. Sin embargo, el uso de β -galactosidasa (β -gal) inmovilizada y estabilizada en reactores en continuo tiene diferentes aplicaciones muy relevantes como: (i) preparación de grandes cantidades de leche y derivados de la misma libres de lactosa, como helados cremosos, leche condensada y queso (Rogalski, Dawidowicz & Leonowi, 1994), (ii) producción de suero de leche libre de lactosa (Szcodrak, 2000), y (iii) síntesis de oligosacáridos (Prenosil, Stuker & Bourne, 1987).

30

Lactozym es una β -gal comercial de *Kluyveromyces lactis* proporcionada por Novozymes. Esta β -galactosidasa es un homotetrámero con un peso molecular de aproximadamente 118 KD por subunidad (Pereira-Rodriguez et al. DOI:10.2210/pdb3oba/pdb) siendo esta muy activa (3000 IU/mL). Esta enzima ya ha sido descrita su gran utilidad tanto en procesos de hidrólisis de lactosa y suero así como en proceso de síntesis de galactooligosacáridos u

35

otros compuestos de gran interés que tienen galactosa en su estructura (Rodríguez-Colinas et al, 2011). Sin embargo esta enzima tiene una relativamente baja estabilidad incluso en condiciones de pH neutro. De esta manera, es clave disponer de catalizadores heterogéneos que tengan una buena estabilidad en diferentes condiciones de reacción, tanto en pH neutro como en otras condiciones de pH o incluso en presencia de codisolventes orgánicos. Esto haría tener una mayor versatilidad en diferentes procesos como hidrólisis de lactosa en leche o sueros a pH neutro, hidrólisis de lactosa en sueros ácidos o bien síntesis o hidrólisis en otras condiciones que pudieran tener interés como pH básico o presencia de codisolventes. Esta enzima ha sido inmovilizada usando diferentes técnicas, pero las estabilizaciones observadas no han sido muy altas. De este modo cuando la enzima fue inmovilizada sobre sílica o agarosa activadas con diferentes grupos funcionales los derivados obtenidos tuvieron una estabilidad similar a la de la enzima soluble (Giacomini, Villarino, Franco-Fraguas & Batista-Viera, 1998). Esta enzima fue inmovilizada también sobre soportes activados con glutaraldehído obteniéndose derivados con estabilidad muy similar a la de la enzima soluble (Ladero, Santos & Garcia-Ochoa, 2000), y en Duolite A-568 obteniéndose derivados 7 veces más estables que la enzima soluble (Maugard, Gaunt, Legoy, & Besson, 2003).

Los soportes glioxil agarosa han sido utilizados satisfactoriamente para la inmovilización y estabilización de enzimas mediante un proceso de inmovilización covalente multipuntual o multisubunidades en el caso de proteínas multiméricas (Blanco, Calvete & Guisan, 1988; Mateo et al, 2006). Los factores de estabilización utilizando estos soportes han sido diferentes dependiendo de la estructura de la enzima estando estos entre 60,000 veces para el caso de la quimotripsina hasta 10 veces en el caso de la uroquinasa (Mateo et al. 2006). Mientras generalmente está descrito que el incremento del grado de multipuntualidad de la unión covalente está relacionado con un incremento en la estabilidad de los derivados obtenidos, se ha podido comprobar cómo en algunos casos este incremento del grado de multipuntualidad está relacionado con un descenso en la estabilidad de los derivados obtenidos. Este efecto es particularmente pronunciado en el caso de enzimas multiméricas (Fernandez-Lafuente 2009).

En los soportes glioxil (GS), los grupos glioxil reaccionan con grupos amino primarios para formar iminas. Este proceso es reversible pero pueden ser convertidos en irreversibles tras un proceso de reducción de la imina para convertirse en una amina secundaria. Durante este mismo proceso de reducción, los grupos aldehído que no han reaccionado con la enzima son reducidos también para producir grupos hidroxilo inertes (figura 1). Sin embargo,

estos soportes solo pueden inmovilizar enzimas si consiguen interactuar simultáneamente a través de varios puntos de enlace covalente con la proteína. Teniendo en cuenta este mecanismo multipuntual, las enzimas serán así inmovilizadas por la región de su superficie más rica en lisinas y además la inmovilización debe ser generalmente realizada a pH

5 alcalino, condición en la cual las lisinas estarán desprotonadas y por tanto reactivas. Tras el primer proceso de inmovilización, ha sido descrito que un alto número de grupos reactivos, altas temperaturas y tiempos de incubación enzima-soporte largos provocan que se aumente el número de interacciones entre la proteína y el soporte (Guisan, 1988). Previamente se ha podido demostrar el aumento de la multiinteracción tras medir la

10 desaparición de lisinas en los derivados glioxil comparado con las lisinas que tiene la enzima soluble (Blanco, Calvete & Guisan, 1989; Pedroche et al. 2007). Sin embargo, mientras el aumento de enlaces covalentes normalmente aumenta la rigidez y estabilidad de la estructura de la proteína, esto generalmente va acompañado de una pérdida parcial de actividad dependiendo de la distorsión que induzca este proceso.

15

Además esta técnica de inmovilización podría prevenir la degradación proteolítica causada por la plasmina, una proteasa similar a la tripsina presente en la leche (Crudden, Fox & Kelly, 2005; Vlakh et al, 2003). Esto es debido a que la interacción multipuntual enzima-soporte involucra residuos lisina, lo que hace de estos derivados en principio más

20 resistentes a un ataque hidrolítico y el hecho de que sean derivados inmovilizados por unión covalente multipuntual les protege de las proteasas y les da rigidez a la estructura enzimática.

25

Por otro lado, otra estrategia de estabilización de enzimas consiste en adicionar aditivos solubles a las diferentes preparaciones enzimáticas. Estos compuestos pueden ser

30 polímeros de gran tamaño como dextranos, PEG, polietileniminas, u otros; o diferentes compuestos de pequeño tamaño como glicerol, otros azúcares como la trehalosa o diferentes compuestos cargados como aminoácidos o incluso inhibidores de la enzima. Si bien la adición de estos compuestos a escala de laboratorio es un método eficiente de estabilización, esto es imposible de hacer a escala industrial debido a que sería necesario adicionar grandes cantidades del compuesto con el alto coste que esto generaría. Además, el tratamiento con diferentes compuestos solubles produciría la contaminación de los productos de reacción, que en algunos casos podrían ser similares a estos aditivos. Esto generaría la necesidad de realizar costosos procesos de purificación.

35

Descripción detallada

La presente invención describe una estrategia novedosa consistente en la unificación de un procedimiento de inmovilización de la enzima β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* sobre soportes glioxil, el cual permite obtener derivados muy estables, con la adición posterior de diferentes conservantes que promuevan una mayor estabilización de la enzima. Más concretamente, estos conservantes irán anclados en polímeros desplegados como son por ejemplo los dextranos, que posteriormente serán inmovilizados sobre la enzima previamente inmovilizada sobre el soporte (Figura 2). Con esta técnica se pueden estabilizar aún más los derivados enzimáticos previamente estabilizados durante el proceso de inmovilización. La utilización de esta metodología nos permite obtener derivados con mayores factores de estabilización que los solamente inmovilizados, pero sin tener que adicionar grandes cantidades de conservantes en el proceso de reacción.

Asimismo, la presente invención también describe el protocolo o procedimiento de inmovilización de la enzima β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* sobre soportes glioxil, como por ejemplo la glioxil agarosa, de manera que se han obtenido derivados altamente activos y estabilizados si se comparan con la enzima soluble. La enzima es inmovilizada sobre soportes activados con grupos glioxil y además han sido optimizadas todas las condiciones de inmovilización. Dentro de las condiciones de inmovilización cabe destacar la optimización del tiempo de contacto entre la enzima y el soporte de cara a maximizar la estabilidad del derivado así obtenido.

Según el procedimiento de inmovilización descrito en esta invención, los derivados enzimáticos de β -galactosidasa inmovilizados que se obtienen son al menos 100 veces más estables que la enzima soluble (de hecho, con el tratamiento de adición de conservantes anclados en polímeros, mencionado anteriormente, se puede conseguir estabilizar a su vez en torno a 120 veces la enzima previamente inmovilizada y estabilizada en el soporte glioxil, lo que acumulando estabilizaciones correspondería a unas 12000 veces respecto a la enzima soluble) y pueden catalizar reacciones en condiciones más drásticas que otros derivados inmovilizados de β -galactosidasa previamente descritos en la literatura, o que la propia enzima soluble. Dichas estabilidades, determinadas a pH 7 y a una temperatura entre 50 °C y 60 °C, se refieren a la relación entre la vida media de los derivados de β -galactosidasa inmovilizados y la vida media de la enzima soluble o de un derivado de referencia, de tal manera que la vida media de las β -galactosidasas inmovilizadas que se obtienen pueden ser entre 100 y 12000 veces mayor que la vida media de la β -

galactosidasa soluble. Concretamente, los derivados enzimáticos inmovilizados por el procedimiento aquí descrito son más estables, no solo en condiciones fisiológicas (pH neutro y temperatura ambiente), sino también en condiciones de alta temperatura (próximas a la temperatura de pasteurización) o pH extremos (pH 4 y pH 9). Además, comparando la estabilidad térmica, los derivados inmovilizados de la misma enzima que se conocen hasta el momento son al menos un orden de magnitud menos estables que los ejemplos descritos en la presente invención.

La presente invención tiene una alta aplicabilidad en diferentes procesos tanto de hidrólisis de lactosa como en procesos de síntesis de galactooligosacáridos, y proporciona una serie de ventajas respecto a otros derivados inmovilizados de la enzima diferentes previamente descritos. Los derivados de β -galactosidasa inmovilizados y altamente estabilizados según el procedimiento de la invención permiten, por un lado, trabajar en condiciones de temperatura más elevadas, en algunos casos temperaturas próximas a la pasteurización, lo que es muy relevante en procesos de hidrólisis de lactosa en leche. También permiten trabajar en reacciones alejadas del pH óptimo de la enzima como es el caso de la hidrólisis de lactosa en sueros ácidos de diferentes leches en diferentes industrias como queserías, etc. Además en los procesos de síntesis de galactooligosacáridos puede tener gran relevancia la utilización de codisolventes orgánicos o incluso pH básico de manera que se puedan optimizar las reacciones de interés utilizando condiciones que permitan maximizar los rendimientos de reacción. Para la utilización de estas condiciones drásticas es clave disponer de catalizadores que tengan una estabilidad altamente mejorada tanto con respecto a la de la enzima soluble como frente a otros derivados de la misma enzima. Además, al estar la enzima en forma inmovilizada el catalizador podrá ser recuperado fácilmente y reutilizado en numerosos ciclos de reacción, y por otro lado, se dispone de un catalizador con propiedades mejoradas respecto a las de la enzima soluble.

Adicionalmente, se ha demostrado que estos nuevos derivados enzimáticos han sido notoriamente más estables frente a la acción de proteasas presentes en suero y leches (como por ejemplo plasmina) o incluso ante la adición de proteasas externas (por ejemplo, tripsina, etc). El hecho de ser derivados mucho más estables en un más amplio rango de condiciones permite que estos derivados puedan ser utilizados en procesos no solo de hidrólisis de lactosa en leche a relativamente alta temperatura, sino que además permite la hidrólisis de lactosa en sueros ácidos de leche, o incluso permite la utilización de pH alcalino o presencia de codisolventes orgánicos, hecho este de gran interés en procesos de síntesis de galactooligosacáridos.

Un primer aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de estabilización de una β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*, en adelante procedimiento de la invención, que comprende unir la enzima a un polímero activado con al menos un agente conservante de estabilización de enzimas, dicho polímero activado comprendiendo grupos aldehído y/o carboxilo (tipo ácido carboxílico y/o carboxilato), y donde la unión es de tipo covalente y/o electrostática entre al menos un grupo amino de la enzima con un grupo aldehído o carboxilo del polímero activado. Es decir, se trata de un procedimiento de estabilización de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*, donde la enzima inmovilizada en un soporte activado con grupos glioxil se estabiliza por unión a un polímero activado con al menos un agente conservante, y que comprende incubar la β -galactosidasa, preferentemente inmovilizada, con un polímero activado con al menos un agente conservante para estabilización de enzimas, y donde dicha incubación se realiza en condiciones adecuadas para conseguir su unión covalente y/o electrostática. De este modo, se consigue producir el anclaje de un polímero activado con al menos un agente conservante (o lo que es lo mismo, un polímero con al menos un agente conservante unido covalentemente a su estructura) sobre la enzima, que preferentemente se encuentra previamente inmovilizada en un soporte. Dicho anclaje se refiere a la unión que se produce entre la enzima, preferentemente previamente inmovilizada, y el polímero activado con el agente conservante, donde dicha unión puede ser de tipo covalente y/o electrostática.

Una de las principales ventajas de anclar covalentemente y/o electrostáticamente los polímeros con agentes conservantes consiste en que de este modo no se tienen que adicionar altas cantidades de conservante al medio de reacción (Figura 2). Los derivados enzimáticos de β -galactosidasa previamente estabilizados durante un proceso de inmovilización en un soporte activado con grupos glioxil, se pueden estabilizar aún más mediante la adición posterior de diferentes conservantes. Según propone la presente invención, dichos conservantes pueden ir anclados en polímeros desplegados, como son entre otros los dextranos o los polietilenglicoles, y posteriormente ser inmovilizados sobre la enzima, obteniéndose derivados de β -galactosidasa de *K. lactis* con mayores factores de estabilización que los derivados solamente inmovilizados sin anclaje de conservantes.

El anclaje del polímero activado con conservantes mediante unión covalente a la enzima se puede llevar a cabo, y sin que sirva de limitación, mediante reacción de los grupos amino de las lisinas de la enzima previamente inmovilizada, con grupos carboxilo (química de la amida) y/o con grupos glioxilo o aldehído (química del aldehído) comprendidos en el polímero unido al conservante. Mediante la química de la amida, la unión covalente se

produce por reacción de las aminos de las lisinas con los grupos carboxilo libres del conservante (p. ej. glicina o aspártico) unida al polímero con agentes de acoplamiento como EDCI o carbodiimidias similares. Para la unión covalente a través de la química del aldehído, se realiza la modificación química del polímero para que presente en su superficie grupos
5 aldehído o glioxilo, por ejemplo mediante oxidación de los grupos OH libres presentes en el polímero. De este modo, dichos grupos aldehído o glioxilo son capaces de reaccionar covalentemente con los grupos amino de las lisinas de la enzima, mediante la formación de la imina y posterior reducción a amina, en las condiciones habituales de reacción (pH básico para la formación de la imina, seguido de reducción con borohidruro).

10

En cuanto a la unión electrostática, el polímero activado con conservantes se ancla a la enzima, preferentemente inmovilizada, a través de interacciones electrostáticas que se producen entre grupos amino y/o carboxilo que contiene dicho polímero (por ejemplo los grupos amino y carboxilo provenientes de la glicina) con los grupos ionizables de la enzima.
15 Aunque dicha unión electrostática es reversible, la interacción que se produce entre el polímero y la enzima, preferentemente soportada, es altamente multipuntual y muy fuerte.

Según la invención, el anclaje del polímero con conservantes a la enzima, preferentemente inmovilizada en un soporte glioxil, se selecciona entre unión covalente mediante química de
20 la amida, unión covalente mediante química del aldehído, unión electrostática o una combinación de las mismas. Preferentemente, la unión covalente se lleva a cabo bien por reacción de grupos amino de la enzima con grupos aldehído o carboxilo del polímero activado, mientras que la unión electrostática se lleva a cabo por interacción iónica multipuntual entre grupos ionizables de la enzima y el polímero activado.

25

La unión covalente mediante química del aldehído comprende la reacción, preferentemente a pH básico, entre grupos amino de lisinas de la enzima inmovilizada en el soporte con los grupos aldehído (o glioxil) del polímero activado con conservantes, estableciendo enlaces imina que posteriormente se reducen a amina. De manera general, las etapas para producir
30 la unión covalente de la enzima con grupos aldehído del polímero, que preferentemente se llevan a cabo a una temperatura comprendida entre 4 °C y 25 °C, comprende:

- poner en contacto la enzima con el polímero activado con agentes conservantes;
- hacer reaccionar la enzima y el polímero en solución acuosa a pH básico, preferentemente entre 9,8 y 10,2, hasta formar al menos un enlace imina;
- 35 - adicionar posteriormente un agente reductor de aldehídos e iminas hasta reducir los enlaces imina; y

- neutralizar el pH después de la reducción, preferentemente a un valor comprendido entre 6 y 8 unidades de pH.

No obstante, en estas condiciones también se puede producir unión electrostática a través de interacciones entre grupos cargados que se encuentren presentes en la enzima y el polímero después de la etapa de incubación en las condiciones anteriores.

Típicamente, las condiciones de química del aldehído para el anclaje del polímero activado a la enzima deben permitir formar al menos un enlace imina entre la enzima y el polímero, sin perder una excesiva actividad de la enzima, pudiendo variar en función de si la enzima se encuentra previamente inmovilizada en un soporte o en forma soluble. A pH básico, una β -galactosidasa inmovilizada en soporte glioxil puede conservar hasta el 90 % de su actividad tras 48 horas en esas condiciones de pH. Preferentemente, el pH básico para formar el enlace imina está comprendido entre 9,8 y 10,2, resultando preferido un valor de pH 10 para mantener una mejor estabilidad de la enzima. A ese valor de pH, la enzima soluble conserva su actividad al menos durante 1 hora incluso a 25 °C.

La unión covalente mediante química de la amida comprende la reacción entre grupos amino de lisinas de la enzima, preferentemente inmovilizada en un soporte, con los grupos carboxílicos presentes en el polímero activado con conservantes, estableciendo enlaces amida mediante el empleo de un agente de acoplamiento peptídico. De manera general, las etapas para producir la unión covalente de la enzima con grupos carboxílicos del polímero, que preferentemente se llevan a cabo a una temperatura comprendida entre 4 °C y 25 °C, comprende:

- poner en contacto la enzima con el polímero activado con agentes conservantes;
- y
- hacer reaccionar la enzima y el polímero en solución acuosa en presencia de un agente de acoplamiento, para formar al menos un enlace amida entre los grupos amino de la enzima y el carboxilo del polímero, preferentemente a pH ácido comprendido entre 4,5 y 5,0.

No obstante, en estas condiciones también se puede producir unión electrostática a través de interacciones entre grupos cargados que se encuentren presentes en la enzima y el polímero después de la etapa de incubación en dichas condiciones anteriores. Ejemplos de agentes de acoplamiento peptídico adecuados son por ejemplo carbodiimidias habitualmente empleadas en síntesis peptídicas como son por ejemplo la EDCI (1-etil-3-(3-

dimetilaminopropil)carbodiimida), DCC (diciclohexilcarbodiimida) o DIC (diisopropilcarbodiimida).

5 Típicamente, las condiciones de química de la amida para el anclaje del polímero activado a la enzima deben permitir formar al menos un enlace amida entre la enzima y el polímero, sin perder una excesiva actividad de la enzima, pudiendo variar en función de si la enzima se encuentra previamente inmovilizada en un soporte o en forma soluble. A pH ácido, un derivado de β -galactosidasa soluble presenta una vida media cercana a las 20 horas, mientras que una β -galactosidasa inmovilizada en soporte glioxil puede llegar a conservar
10 un 71 % de su actividad tras 42 horas en esas condiciones de pH.

La unión electrostática comprende dejar interaccionar la enzima, preferentemente inmovilizada en un soporte, con el polímero activado con conservantes, en condiciones adecuadas para que se establezcan enlaces iónicos entre los grupos ionizables presentes
15 tanto en el polímero como en dicha enzima. De manera general, las etapas para producir la unión electrostática entre grupos ionizables presentes en la enzima y el polímero, que preferentemente se llevan a cabo a una temperatura comprendida entre 4 °C y 25 °C, comprende:

- poner en contacto la enzima con el polímero activado con agentes conservantes;
20 y
- dejar reaccionar la enzima y el polímero en solución acuosa a pH neutro comprendido preferentemente entre 6,0 y 8,0, en condiciones de baja fuerza iónica de manera que se favorezcan los procesos de intercambio iónico con los aminoácidos de la superficie de la proteína que permitan formar al menos un
25 enlace o interacción electrostática entre al menos un grupo amino de la enzima y un grupo carboxilo del polímero.

Para obtener mayores factores de estabilización, la unión entre la enzima y el polímero activado con conservantes se lleva a cabo preferentemente por unión covalente de la
30 enzima con grupos aldehído del polímero (química del aldehído) o por unión electrostática de la enzima al polímero, obteniéndose factores de estabilización hasta 122 veces superior a los de la enzima inmovilizada y estabilizada en el soporte glioxil.

Por tanto, para llevar a cabo la unión o anclaje del polímero a la enzima, en una realización preferida, la incubación según el procedimiento de la invención comprende:

- a. poner en contacto la enzima y el polímero,

b. hacer reaccionar la enzima y el polímero anteriores en medio acuoso a pH entre 4,5 y 10,2 hasta formar al menos un enlace entre un grupo amino de la enzima y un grupo aldehído o carboxilo del polímero, dicho enlace seleccionado del grupo que consiste en:

- enlace covalente entre un grupo amino de la enzima y un grupo aldehído del polímero;
- enlace covalente entre un grupo amino de la enzima y un grupo carboxilo del polímero;
- enlace electrostático entre un grupo amino de la enzima y un grupo carboxilo (carboxilato) del polímero;

5

o una combinación de dos o más de los anteriores.

10

En una realización preferida del procedimiento de la invención, o de su realización anterior, cuando el polímero activado con el agente conservante comprende grupos aldehído o grupos aldehído y carboxilo, para formar el enlace covalente entre el grupo amino de la enzima y el grupo aldehído del polímero, se hace reaccionar la enzima y el polímero en condiciones de química del aldehído, y preferentemente comprende al menos las siguientes etapas:

15

b.1. mantener el medio acuoso que contiene la enzima a pH entre 9,8 y 10,2 hasta formar al menos un enlace imina,

20

b.2. reducir el enlace imina con un agente reductor de iminas y aldehídos, como por ejemplo, y sin que sirva de limitación, borohidruro de sodio,

b.3. neutralizar el pH del medio acuoso a un valor comprendido entre 6,0 y 8,0, una vez finalizada la etapa de reducción anterior.

25

En otra realización preferida del procedimiento de la invención, o de cualquiera de sus realizaciones anteriores, cuando el polímero activado con el agente conservante comprende grupos carboxilo o grupos carboxilo y aldehído, para formar el enlace entre el grupo amino de la enzima y el grupo carboxilo del polímero se deja reaccionar la enzima y el polímero en al menos una o ambas de las siguientes condiciones:

30

- en condiciones de química de la amida si se desea formar un enlace de tipo covalente, comprendiendo preferentemente al menos la siguiente etapa:

b.4. mantener el medio acuoso que contiene la enzima a pH entre 4,5 y 5,0, en presencia de un agente de acoplamiento peptídico, hasta formar un enlace covalente tipo amida entre los grupos amino y carboxilo;

35

- en condiciones de producir interacciones de tipo iónico entre grupos ionizables de la enzima (p. ej. grupos ionizables de las cadenas laterales de los aminoácidos, tales como

grupos amonio) y del polímero activado (p. ej. los grupos los grupos carboxilato del agente conservante) si se desea formar un enlace de tipo electrostático, y que comprende preferentemente al menos la siguiente etapa:

- 5 **b.5.** ajustar el pH del medio acuoso que contiene la enzima entre 6,0 y 8,0 hasta formar al menos un enlace electrostático entre un grupo amino de la enzima y un grupo carboxilo del polímero.

10 Según se entiende la invención, en el procedimiento de la invención o en cualquiera de sus realizaciones aquí descritas, la enzima se hace reaccionar con el polímero entre 1 y 20 horas, más preferentemente entre 1 y 3 horas, aun más preferentemente entre 90 minutos y 2 horas. Además, en el procedimiento de la invención o en cualquiera de sus realizaciones descritas en el presente documento, la unión de la enzima al polímero se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 4 °C y 25 °C, resultando preferida una temperatura de 4 °C.

15 En el ámbito de la invención, los polímeros que pueden ser activados con agentes conservantes, se refiere a polímeros extendidos, hidrofílicos y fácilmente activables, como son entre otros los dextranos, las polietileniminas o los polietilenglicoles. Estos polímeros son fácilmente activables debido a que tienen dioles que se oxidan muy fácilmente oxidando, p. ej. con periodato de sodio, para obtener grupos aldehído, que posteriormente
20 unen moléculas que tengan un grupo amino primario en su estructura, como por ejemplo es la glicina.

En el procedimiento de la invención o de cualquiera de sus realizaciones aquí descritas, el polímero activado con agente conservante que se une a la enzima β -galactosidasa se
25 encuentra preferentemente activado entre un 50% y un 100% con dicho agente conservante, presentando además entre un 0% y un 50% de grupos aldehído o glioxilo en el esqueleto de su estructura polimérica.

Para producir el anclaje del soporte mediante química del aldehído, el polímero ha de estar
30 químicamente modificado a grupos aldehído, habiéndose encontrado los mejores resultados para aquellos polímeros donde entre un 5% y un 50% de los grupos OH activables de dicho polímero han sido modificados a grupos aldehído o glioxilo. Por tanto, en una realización preferida del procedimiento de la invención o de cualquiera de sus realizaciones aquí
35 descritas, el polímero además de agentes conservantes, está modificado químicamente con grupos aldehído, preferentemente entre un 5% y un 50%, más preferentemente entre un 5% y un 15%.

Según la invención, agentes conservantes (o conservantes) válidos son los aditivos o conservantes habitualmente empleados para la estabilización de enzimas, como por ejemplo azúcares como la glicerina, trehalosa, etc., o aminoácidos como pueden ser entre otros glicina y/o ácido aspártico. El conservante se encuentra covalentemente unido al polímero, de tal manera que se obtienen los mejores resultados de estabilización cuando dicho polímero comprende preferentemente entre un 50% y un 100% de agente conservante, resultando preferido el 100% de agente conservante para producir un anclaje principalmente mediante interacción electrostática, o el intervalo comprendido entre un 85% y un 95% de agente conservante, para producir un anclaje del soporte preferentemente mediante química del aldehído. Dichos porcentajes se refieren al porcentaje de grupos OH del polímero que han sido activados con un agente conservante, con respecto a todos los OH activables en dicho polímero.

Según la invención, grupos OH activables hace referencia a los grupos OH que contiene el polímero antes de unir un agente conservante o de reducirlo a aldehído o glioxil.

En realizaciones preferidas del procedimiento de la invención o de cualquiera de sus realizaciones aquí descritas, dicho polímero es un dextrano.

De los agentes estabilizantes estudiados, se ha comprobado que en solución, la glicina conduce a los mejores resultados de estabilización (Figura 10). En consecuencia, en el procedimiento de la invención, o de cualquiera de sus realizaciones aquí descritas, el agente conservante es glicina.

En una realización preferida distinta de las anteriores, independientemente de cómo se realice la unión a la enzima inmovilizada, el polímero activado con al menos un agente conservante es un dextrano activado con glicina, donde dicho dextrano preferentemente comprende entre un 50% y un 100% de sus grupos OH activados con glicina, y entre un 0% y un 50% de sus grupos OH oxidados a grupos aldehído o glioxilo.

En una realización preferida del procedimiento de la invención o de cualquiera de sus realizaciones cuando el dextrano está activado con glicina, dicho dextrano comprende el 100% de sus grupos OH activados con glicina, de tal manera que la β -galactosidasa obtenida por el procedimiento anterior es altamente estable (79 veces más que el derivado solo inmovilizado) mediante adsorción (unión) iónica de dicho dextrano.

En otra realización preferida del procedimiento de la invención o de cualquiera de sus realizaciones cuando el dextrano está activado con glicina, dicho dextrano comprende entre un 50% y un 95% de sus grupos OH activados con glicina, y entre un 5% y un 50% de sus grupos OH oxidados a grupos aldehído o glioxilo, de tal manera que la suma de los porcentajes de glicina y dextrano sea igual o inferior al 100%. En una realización más preferida de la anterior, el dextrano comprende entre un 95-90% de sus grupos OH activados con glicina, y entre un 5-10% de sus grupos OH oxidados a grupos aldehído o glioxilo, respectivamente.

Los porcentajes de activación del dextrano con glicina, así como los porcentajes de modificación química del dextrano con grupos aldehído anteriores, hacen referencia al porcentaje de grupos OH del dextrano que han sido activados con glicina, y/o modificados químicamente con grupos aldehído, según los casos, con respecto al total de los grupos OH presentes en el polímero previa a dicha activación o modificación química.

En una realización preferida del procedimiento de la invención o de cualquiera de sus realizaciones, cuando se une a la β -galactosidasa un dextrano activado con glicina, dicha unión es electrostática y/o covalente con los grupos aldehído del polímero.

En una realización preferida del procedimiento de la invención o de cualquiera de sus realizaciones anteriores, dicho procedimiento comprende además obtener el polímero activado previamente a su unión con la enzima. Preferentemente, cuando el polímero activado es un dextrano activado con glicina, la obtención de dicho dextrano comprende:

i.1. oxidar un dextrano entre un 50% y un 100% a grupos aldehído o glioxilo;

i.2. unir glicina covalentemente al dextrano mediante reacción del dextrano oxidado con glicina, preferentemente a pH neutro o básico (p. ej. pH entre 7 y 10,5), seguido de reducción con un agente reductor de aldehídos e iminas (p. ej. borohidruro de sodio) y posterior neutralización del pH;

y cuando la oxidación del dextrano es inferior al 100%, además puede comprender:

i.3. reoxidar a grupos aldehído o glioxilo el dextrano previamente unido a glicina.

La oxidación y/o la reoxidación del dextrano anteriores pueden llevarse a cabo con agentes oxidantes conocidos en el estado de la técnica, como son por ejemplo y sin limitarse las sales de periodato, tales como periodato de sodio. En cuanto a la unión del dextrano a glicina, ésta puede realizarse por reacción de los mismos para formar enlaces imina, por ejemplo en condiciones de pH neutro ($\text{pH} = 7$) o de pH básico tal como se describen

anteriormente en las condiciones de química del aldehído para el anclaje del polímero activado a la enzima.

Según la presente invención, se ha conseguido optimizar la inmovilización de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* en soportes activados con grupos glioxil para obtener una estabilización máxima. Por tanto, para conseguir los mejores resultados de estabilización, en una realización preferida del procedimiento de la invención, o de cualquiera de sus realizaciones anteriores, la β -galactosidasa se encuentra inmovilizada en un soporte activado con grupos glioxil. Y en una realización preferida de la anterior, el procedimiento comprende además las siguientes etapas para inmovilizar y estabilizar la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* en dicho soporte:

ii.1. hacer reaccionar la β -galactosidasa con un soporte altamente activado con grupos glioxil en solución tamponada libre de sodio a pH 10 y en presencia de al menos un catión estabilizador de la enzima en concentración adecuada para mantener la actividad de dicha enzima;

ii.2. reducir el producto de la reacción anterior con un agente reductor de aldehídos e iminas.

En general, la etapa de reducción ii.2 se lleva a cabo según las condiciones habituales descritas en procesos de inmovilización de enzimas sobre soportes glioxil (típicamente mediante reacción con el agente reductor durante 30 minutos a pH básico), donde el agente reductor se usa en concentraciones moderadas (p. ej. 1 mg/mL en caso de NaBH_4) para que no se vea afectada la actividad enzimática de la β -galactosidasa al final de dicha etapa de reducción. Preferentemente, en el ámbito de la presente invención, dichas condiciones son similares a las descritas para la unión de la enzima a un polímero activado con agente conservante mediante la química de la amida.

La inmovilización de la β -galactosidasa sobre estos soportes glioxil normalmente no se produce a pH neutro, debiéndose hacer a pH alcalino, condiciones en las que las lisinas de la enzima se encuentran mayoritariamente desprotonadas y, por tanto, reactivas. Sin embargo, para que se produzca la inmovilización de la β -galactosidasa de *K. lactis* sin que se inactive, debe mantenerse controlado el pH a valores próximos a 10 (entre 9,5 y 10,5).

Se ha comprobado que cuando la β -galactosidasa de *K. lactis* se disuelve en tampón bicarbonato de sodio a pH 10, dicha enzima se inactiva completamente en menos de 20 minutos. Además, la utilización de al menos un catión estabilizador de la enzima soluble a

ese valor de pH, permite conservar la actividad enzimática de dicha β -galactosidasa. En consecuencia, para optimizar la reacción de la β -galactosidasa con el soporte de la etapa ii.1 se ha de llevar a cabo en presencia de cualquier tampón capaz de mantener las condiciones de pH adecuadas para la inmovilización que comprenda al menos un catión estabilizador de la enzima soluble como magnesio, potasio o manganeso, y que al mismo tiempo carezca de cationes sodio que hacen perder la actividad catalítica de dicha β -galactosidasa. Dichos cationes pueden incorporarse al medio de reacción o al tampón en forma de sales o hidróxidos de estos cationes, como son entre otros KCl, $MgCl_2$, KOH, $Mg(OH)_2$, $MnSO_4$, etc. Según lo anterior, un ejemplo de tampón adecuado es el bicarbonato de potasio, pudiendo comprender adicionalmente al menos una sal o hidróxido de un catión estabilizador.

La concentración de los cationes estabilizadores con respecto a la composición global del tampón (incluyendo las sales y/o hidróxidos adicionales) se ajustará de acuerdo a las concentraciones que permitan estabilizar y mantener la actividad de la β -galactosidasa de *K. lactis* al pH de inmovilización. Para ello, en el caso del catión K^+ , dicha concentración puede estar comprendida entre 0,05 M y 0,3 M, en el caso del catión Mg^{2+} , la concentración puede estar comprendida entre 0,5 y 5 mM, y en el caso del catión Mn^{2+} la concentración puede estar comprendida entre 0,1 y 1 mM. En realizaciones preferidas, la inmovilización de la β -galactosidasa de *K. lactis* se lleva a cabo en presencia de catión potasio a una concentración comprendida entre 0,05 y 0,3 M y en presencia de catión magnesio a una concentración comprendida entre 0,5 y 5 mM.

En una realización preferida, la reacción de la β -galactosidasa con el soporte a pH 10, se lleva a cabo empleando un tampón que comprende bicarbonato de potasio (preferentemente a una concentración 100 mM), KCl 0,1 M y $MgCl_2$ 2 mM.

Según la invención, y sin carácter limitante, ejemplos de “soportes activados con grupos glioxil” pueden ser entre otros glioxil-agarosa (o agarosa activada con grupos glioxil), glioxil-sílica, glioxil-sepabeads, así como cualquier otro tipo de soporte donde los grupos OH de su superficie han sido previamente activados con grupos glioxil. Dicha activación de los grupos OH del soporte puede obtenerse de acuerdo a procedimientos habitualmente empleados, como por ejemplo mediante una previa activación de los grupos hidroxilo formando un diol con glicidol, o epiclorhidrina más hidrólisis ácida, y posterior oxidación del diol con periodato (p. ej. periodato de sodio). En algunos casos, como en el caso de los sepabeads comerciales, el soporte puede estar funcionalizado con dioles, donde dichos dioles se oxidan posteriormente para dar grupos aldehído (glioxilo).

En una realización preferida, el soporte activado es glioxil agarosa o una agarosa (p. ej. agarosa 6BCL, glioxil agarosa 4BCL, etc.) activada con grupos glioxilo. Preferentemente, dicha glioxil agarosa es agarosa 6BCL activada con grupos glioxilo (o también referida en la memoria como glioxil agarosa 6BCL).

5

Dependiendo del soporte, el número de grupos susceptibles de ser activados a grupos glioxilo puede variar. Así por ejemplo, el número de grupos OH primarios que se pueden activar en el caso de agarosa 4BCL es aproximadamente de 40 micromoles/mL soporte, mientras que en el caso de agarosa 6BCL oscila entre 75 y 100 micromoles/mL de soporte.

10 La activación a grupos glioxilo de dichos grupos OH susceptibles puede ser controlada directamente mediante el proceso de oxidación, obteniéndose el mismo número de moles de grupos OH activados como el número de moles de reactivo oxidante (es decir, 1 mol de periodato oxida 1 mol de dioles produciendo 1 mol de aldehídos – en este caso glioxilos–). En un ejemplo de realización, la agarosa 6BCL es activada con 75 μ moles de grupos
15 aldehído por mililitro de soporte.

En relación a otras propiedades del soporte como el tamaño de partícula y el tamaño de poro, cabe destacar que aunque los soportes de agarosa utilizados en este trabajo tienen un tamaño de partícula medio de entre 50-150 μ m y un tamaño medio de poro de 800-1000 Å,
20 los cuales permiten la inmovilización de proteínas de gran tamaño, también se podrían utilizar agarosas, u otros soportes adecuados según se definen en la presente invención, de otros tamaños, como pueden ser otras agarosas menos comunes, como las agarosas del 8%.

25 Se ha encontrado que la estabilidad de la enzima inmovilizada y estabilizada depende fuertemente del tiempo que se deja reaccionar a la β -galactosidasa con el soporte, de tal manera que en un periodo de tiempo de entre 20 minutos y 20 horas, la máxima estabilidad se observa cuando la reacción dura entre 1 y 2 horas, y que dicha estabilidad decrece gradualmente, observándose la menor estabilidad tras un periodo de incubación (o tiempo
30 de reacción) de 20 horas (Figura 5).

En una realización preferida, la reacción entre la enzima y el soporte se deja reaccionar entre 1 y 2 horas.

35 Debido a que a pH básico la enzima soluble presenta una menor estabilidad, y que dicha estabilidad disminuye con el aumento de la temperatura, la temperatura de reacción de la

etapa ii.1 está comprendida entre 4 y 35 °C y más preferentemente en el intervalo comprendido entre 4 y 25 °C.

5 Un segundo aspecto de la invención se refiere a un catalizador de β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* obtenido por el procedimiento de la invención o por cualquiera de sus realizaciones preferidas según se han descrito anteriormente.

10 Un tercer aspecto de la invención se refiere al uso de una β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* obtenida por el procedimiento de la invención o por cualquiera de sus realizaciones preferidas según descritos anteriormente, en un reactor de tanque agitado, de lecho fijo o de lecho fluidizado.

15 Un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso de una β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* obtenida por el procedimiento de la invención o por cualquiera de sus realizaciones preferidas según descritos anteriormente, para hidrolizar lactosa en leche.

20 Un quinto aspecto de la invención se refiere al uso de una β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* obtenida por el procedimiento de la invención o por cualquiera de sus realizaciones preferidas según descritos anteriormente, para hidrolizar lactosa en sueros ácidos.

25 Un sexto aspecto de la invención se refiere al uso de una β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* obtenida por el procedimiento de la invención o por cualquiera de sus realizaciones preferidas según descritos anteriormente, como catalizador enzimático en procesos de transglicosilación para producir galactooligosacáridos (GOS).

Breve descripción de las figuras

30 **Figura 1.** Esquema de la inmovilización de la β -galactosidasa sobre soportes glioxil.

Figura 2. Esquema de la estrategia de estabilización del derivado de β -galactosidasa inmovilizada-estabilizada por unión de polímeros con moléculas de conservante en su estructura.

Figura 3. Curso de inactivación de diferentes preparaciones de β -galactosidasa de *K. lactis* a 50 °C y pH 7. ■, derivado glioxil inmovilizado durante 1 hora; ▲, enzima soluble o derivado CNBr de referencia.

5 **Figura 4.** Inactivación de β -galactosidasa de *K. lactis* inmovilizada durante 1 hora en soportes glioxil agarosa (■) en distintas condiciones, comparada con la inactivación de la enzima soluble o derivado de referencia inmovilizado en soporte CNBr (▲): (A) inactivación a pH 5 y 25 °C; (B) inactivación a pH 9 y 25°C; (C) inactivación en 30% de dioxano a pH 7 y 4 °C.

10

Figura 5. Inactivación de β -galactosidasa de *K. lactis* inmovilizada en soportes glioxil durante diferentes tiempos de inmovilización y en diferentes condiciones: (A) pH 7.0 y, 50 °C, (B) pH 5 y 25 °C, (C) pH 9 y 25 °C, y (D) 30% dioxano a pH 7 y 4 °C. Los tiempos de inmovilización fueron 1 hora (◆), 2 horas (■), 3 horas (▲) y 20 horas (●).

15

Figura 6. SDS-PAGE de los diferentes derivados de β -galactosidasa de *K. lactis*. Carril 1: marcadores de peso molecular, carril 2: enzima comercial de *K. lactis*, carril 3: enzima inmovilizada en soportes CNBrS, y carril 4: enzima inmovilizada en soportes GS.

20 **Figura 7.** Curso de inactivación de diferentes derivados de β -gal preparados, incubados en presencia de 4 mg mL⁻¹ de plasmina: β -gal GS (□), enzima soluble (△), solución referencia de β -gal GS en ausencia de plasmina (■), y enzima soluble en ausencia de plasmina (▲).

25 **Figura 8.** Capacidad de carga de los soportes GS. El experimento se hizo añadiendo diferentes cantidades de enzima a 1 g de soporte a pH 10 y 25 °C.

30 **Figura 9.** Curso de inactivación de los diferentes derivados inmovilizados de β -galactosidasa de *K. lactis*, incubados a pH 7 y 60° C. (◆) Derivado de glioxil-agarosa de referencia; (□) derivado de referencia recubierto con un polímero con 10% de glicina + 90% oxidado; (△) derivado recubierto con polímero con 50% de glicina + 50% oxidado (●) derivado recubierto con polímero con 90% de glicina + 10% oxidado; (▲) derivado recubierto con polímero utilizando EDCI 0.1 mM (■) derivado recubierto con polímero con polímero con 100 % de glicina con anclaje electrostático..

Figura 10. Curso de inactivación de la enzima β -galactosidasa de *K. lactis* soluble, incubada a pH 7 y 50° C con diferentes aditivos. (■) Trehalosa 20%; (▲) Dextrano 20KD 20%; (△) Glicina 3 M; (●) Glicerol 20%; (◆) Tampón fosfato 50 mM.

5 **Figura 11.** Curso de inactivación de la enzima β -galactosidasa de *K. lactis* soluble, incubada a pH 7 y 60° C con diferentes concentraciones de glicina. (◆) glicina 0,5 M; (■) glicina 1 M; (▲) glicina 2 M; (●) glicina 3 M.

Ejemplos

10

Se ha estudiado la inmovilización de la β -galactosidasa de *Kluiveromyces lactis* (Lactozym) en soportes glioxil-agarosa en diferentes condiciones. La actividad y estabilidad de estos nuevos derivados de dicha β -galactosidasa inmovilizados ha sido evaluada bajo diferentes condiciones experimentales, incluyendo pHs extremos y en presencia de codisolventes orgánicos, y los resultados han sido comparados con aquellos obtenidos para la enzima soluble e inmovilizada sobre agarosa activada con grupos bromuro de cianógeno. Además de esto se ha estudiado la estabilidad de las diferentes preparaciones en presencia de proteasas.

15

20 A continuación se presentan los resultados de distintos ejemplos preparados para este estudio, así como las condiciones experimentales de realización.

1. Materiales y métodos

25

Los soportes agarosa entrecruzada activada con grupos bromuro de cianógeno 4BCL-CNBr, agarosa 6BCL y marcadores de peso molecular fueron comprados en GE Healthcare (Uppsala, Suecia). *o*-nitrofenil- β -*D*-galactopiranosido (*o*-NPG), borohidruro de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio y plasmina de plasma humano fueron suministrados por Sigma-Aldrich Chem. Co (St. Louis, Missouri, USA). La enzima β -galactosidasa (β -gal) de *Kluiveromyces lactis* (Lactozym 3000L) fue generosamente donada por Novozymes (Copenhague, Dinamarca). Las concentraciones de proteína fueron determinadas utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976). El reactivo Coomassie (Bradford) protein assay kit fue comprado en Pierce (Rockford, Illinois, USA).

30

35

1.1. Ensayo enzimático

Las actividades de la enzima soluble y de los derivados inmovilizados fueron medidas utilizando un espectrofotómetro visible (Shimadzu UV-1240, Kyoto, Japón) equipado con
5 termostatación y agitación. Una dilución de Lactozym (20-400 μL) fue adicionada a una cubeta conteniendo 2 mL de 13.3 mM de *o*-NPG en 100 mM de fosfato de potasio a pH 7 y 25 $^{\circ}$ C. La actividad se midió como el incremento de absorbancia producido por la producción de *o*-nitrofenol (con coeficiente de extinción molar de 3100 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 405 nm y pH 7) de la hidrólisis de *o*-NPG. Una unidad de actividad (IU) se define como la cantidad de enzima
10 requerida para hidrolizar 1 μmol of *o*-NPG por minuto a pH 7 y 25 $^{\circ}$ C. La suspensión de los soportes no interfiere con las medidas espectrofotométricas.

1.2. Inmovilización

15 Una solución de β -gal fue añadida a una cantidad dada de soporte y la mezcla fue incubada en agitación suave al pH y temperatura especificados. A diferentes tiempos se midieron los sobrenadantes y suspensiones. Del mismo modo se siguió la actividad de una solución de referencia en las condiciones de inmovilización pero con soporte inerte para evaluar la influencia del soporte en los experimentos. A pesar de que en los procesos industriales se
20 requieren catalizadores con la mayor actividad catalítica posible, una baja carga de enzima fue utilizada (100 IU mL^{-1}) para evitar posibles problemas de difusión que podrían alterar la actividad y estabilidad de los derivados inmovilizados.

1.2.1. Inmovilización en agarosa CNBr

25 Los soportes de agarosa fueron preparados de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El soporte (1 g) se mezcló con una solución compuesta de 0.03 mL de una solución de β -gal (3000 IU mL^{-1}) en 6.0 mL of 0.1 M fosfato de potasio suplementado con 0.1 M de KCl y 2 mM de MgCl_2 a pH 7. La suspensión fue incubada a temperatura ambiente y agitación suave
30 durante 1 hora. El derivado fue entonces filtrado y lavado con el mismo tampón utilizado en el proceso de inmovilización. Posteriormente, los grupos reactivos restantes fueron bloqueados por reacción con 1 M de etanolamina a pH 8 y 25 $^{\circ}$ C durante 2 horas bajo agitación suave. Finalmente el derivado se lavó con el tampón de inmovilización (0.1 M de KCl y 2 mM de MgCl_2 a pH 7).

35

1.2.2. Inmovilización en glioxil agarosa

La agarosa 6BCL se activó hasta soportes glioxil tal como fue descrito (Guisan, 1988). La inmovilización se hizo suspendiendo 1 g de soporte en 5 mL de 100 mM de bicarbonato de potasio, 0.1 M de KCl y 2 mM de $MgCl_2$ a pH 10, con 0.03 mL de una solución de β -gal (3000 IU mL^{-1}). A diferentes tiempos se midieron las actividades del sobrenadante y la suspensión con un blanco incluido para controlar el proceso de inmovilización. Cuando la enzima fue inmovilizada, la suspensión se incubó a 4°C durante diferentes tiempos (1-20 horas). Finalmente, los grupos reactivos restantes fueron reducidos por reacción con 4 mg de borohidruro de sodio durante 30 minutos a la temperatura de inmovilización, como previamente fue descrito (Mateo et al, 2006). Finalmente el derivado fue lavado con tampón de inmovilización (0.1 M de KCl y 2 mM de $MgCl_2$ a pH 7).

1.3. SDS-PAGE de las diferentes preparaciones.

Los experimentos de SDS-PAGE se realizaron acorde al método descrito previamente (Laemmli, 1970). 50 mg de los derivados de β -gal o 10 μ L de la enzima soluble fueron mezclados con 250 μ L de tampón desnaturante (conteniendo mercaptoetanol y SDS) y entonces hervido durante 5 minutos para así desorber toda subunidad o proteína no covalentemente unida al soporte. 12 μ L de cada una de estas muestras previamente desnaturadas fueron analizadas utilizando geles de poliacrilamida del 12% de entrecruzamiento. Las muestras fueron sometidas a un voltaje fijo (150 V), y teñidas durante 1 hora utilizando 0.25% de azul de Coomassie disuelto en una solución de agua, metanol y ácido acético (5: 5: 1), y desteñido utilizando una solución compuesta de agua, metanol y ácido acético (6.6: 5.7: 1).

1.4. Análisis de los aminoácidos de las diferentes preparaciones.

El análisis de los diferentes aminoácidos se hizo acorde con el método previamente descrito (Alaiz et al., 1991). Ácido D,L- α -aminobutírico fue utilizado como estándar interno. La cantidad de enlaces fue calculada como la desaparición de las lisinas en los diferentes derivados comparado con las lisinas de la enzima soluble. Otros aminoácidos fueron estudiados y se comprobó que permanecieron constantes en todos los derivados.

35

1.5. Activación de dextranos con glicina:

La unión de glicina al dextrano polimérico consiste en 3 pasos: i) el dextrano comercial fue oxidado en un 90% de su posible oxidación total; ii) el polímero oxidado fue puesto en
5 contacto con glicina para establecer la unión del dextrano oxidado con el aminoácido y una reducción final; iii) finalmente el dextrano-glicina fue reoxidado en el 10% restante no oxidado durante el paso i.

1.5.1. Oxidación del dextrano:

10

Para oxidar el dextrano al 100%, 1.67 g de dextrano y 4.36 g de periodato de sodio fueron disueltos en 50 mL de agua. La mezcla de reacción se dejó en agitación durante 90 minutos. Finalmente esta solución fue dializada con un exceso de agua. Para el resto de porcentajes de oxidación se varía la cantidad de periodato para adaptarla a dicho porcentaje
15 considerando el anteriormente descrito como el 100%.

1.5.2. Reacción del dextrano oxidado con glicina:

Para unir la glicina al dextrano oxidado, 1 mL de dextrano oxidado fue mezclado con un
20 volumen equivalente de glicina 3 M a pH 7. Tras 16 horas de reacción la mezcla fue reducida (para estabilizar las iminas formadas y reducir los aldehídos que hubieran podido quedar sin reaccionar) adicionando 20 mg de borohidruro de sodio durante 2 horas. Finalmente el pH fue bajado a 7 utilizando ácido clorhídrico y dializado frente a agua.

25 1.6. Unión del dextrano-glicina a los derivados de enzima inmovilizada:

Unión del dex-glicina-aldehido: a 1g de derivado inmovilizado se le añadieron 10 mL de polímero activado con glicina y posteriormente oxidado en los porcentajes especificados. La reacción se dejó durante 90 minutos. Finalmente el pH de la suspensión fue reducida. Para
30 ello se incrementó el pH hasta 9 y la suspensión fue reducida utilizando 1 mg de borohidruro de sodio durante 30 minutos y lavado con agua.

Unión de dex-glicina: a 1g de derivado inmovilizado se le añadieron 10 mL de polímero activado con glicina al 100% como se ha descrito. Esto se dejó durante 90 minutos y se lavó
35 con agua. En el caso de la unión mediante formación de amidas el pH del polímero con la

carbodiimida se ajustó a 4.75 y se adicionó al derivado inmovilizado. Tras 90 minutos el derivado se lavó con agua.

EJEMPLO 1: Inmovilización de β -galactosidasa (β -gal) de *Kluyveromyces lactis* en soportes glioxil (GS)

La β -galactosidasa (β -gal) de *Kluyveromyces lactis* es una enzima tetramérica que tiene 83 lisinas por subunidad (Pereira-Rodriguez et al. DOI:10.2210/pdb3oba/pdb), de esta manera la inmovilización sobre estos soportes se espera que sea muy conveniente en este caso. La inmovilización de enzimas sobre estos soportes normalmente no se produce a pH neutro (Mateo et al, 2006). De este modo la inmovilización se debe hacer a pH alcalino, condiciones estas en las que las lisinas están mayoritariamente desprotonadas y por tanto reactivas. Como era de esperar, la inmovilización de la β -gal de *K. lactis* no se produjo cuando se intentó a pH neutro (dato no mostrado). La enzima se disolvió en tampón bicarbonato de sodio a pH 10 para su inmovilización posterior. La enzima en estas condiciones resultó completamente inactivada en menos de 20 minutos en estas condiciones. Estos resultados probablemente son consecuencia de la presencia de cationes sodio que promueven la inactivación de la enzima por desplazamiento de los cationes presentes en la estructura de la enzima (Case, Sinnott & Tenu, 1973). Además, el uso de tampones conteniendo potasio y magnesio promueven la estabilización de la enzima soluble (Garman, Coolbear & Smart, 1996; Voget, Flores, Faloci & Ertola, 1994). La enzima fue incubada en presencia de un agente quelante como el EDTA, resultando en una pérdida instantánea de la actividad. Esto debe ser provocado por la presencia de 4 átomos de manganeso en la estructura de la enzima (Pereira-Rodriguez et al. DOI:10.2210/pdb3ob8/pdb). Debido a esto los posteriores experimentos se realizaron en tampón bicarbonato de potasio 100 mM en presencia de 0.1 M KCl y 2 mM MgCl₂. Estas nuevas condiciones conservaron la actividad de la enzima soluble por al menos 1 hora, incluso tras incubar a 25°C.

La β -gal de *K. lactis* fue inmovilizada en soportes GS a pH 10. En estas condiciones la enzima fue completamente inmovilizada en menos de 20 minutos reteniendo el 82% de su actividad comparada con la de la enzima soluble. Cuando la enzima fue incubada con el soporte por tiempos más largos (20 horas) en estas condiciones de pH, la actividad decreció hasta el 60%. Esta pérdida de actividad podría ser producida por el incremento de rigidez de la enzima causada por la inmovilización covalente multipuntual que puede causar el desensamblaje de las subunidades que componen la enzima. La inmovilización de la enzima

debe ser producida por la región con una mayor superficie expuesta que es la más rica en lisinas. Esta región sería la que contiene un mayor número de subunidades de la enzima (Pereira-Rodriguez et al. DOI: 10.2210/pdb3oba/pdb). Esto se confirmó analizando las lisinas libres tras un proceso de hidrólisis ácida de las diferentes preparaciones. Los derivados inmovilizados durante 2 y 20 horas se unieron a través del 41 y 53% de las lisinas totales respectivamente. Además la β -gal fue inmovilizada en soportes CNBrS en condiciones muy suaves para tener derivados que tengan un bajo grado de unión multipuntual. Este protocolo de inmovilización permite la producción de derivados con propiedades similares a las de la enzima soluble previniendo procesos de agregación o de proteólisis (Alonso-Morales et al, 2004). Tras 1 hora, el 80% de la enzima fue inmovilizada con una retención del 92% de la actividad enzimática inicial. Este derivado fue utilizado en estudios posteriores como derivado de referencia en sustitución de la enzima soluble para comparar con otros derivados enzimáticos.

15 **EJEMPLO 2: Estabilidad térmica de los derivados de β -gal**

Los diferentes derivados GS inmovilizados a pH 10 durante diferentes tiempos (1h, 2h, 3h y 20 h) y CNBrS β -gal fueron incubados a pH 7 y 50°C para evaluar su estabilidad térmica. La vida media del derivado β -gal CNBrS fue de 35 minutos, mientras que el derivado β -gal GS retuvo el 58% de su actividad catalítica tras incubación durante 24 horas en estas mismas condiciones (Figura 3). Este aumento de la estabilidad térmica puede ser explicado por el aumento del grado de unión covalente multipuntual que viene correlacionado con la inmovilización a través de la zona más rica en lisinas de la superficie de la enzima. Como ya se comentó, el incremento en la multiinteracción va relacionado con un incremento de la rigidez de la estructura tridimensional que normalmente promueve la estabilización de la preparación.

EJEMPLO 3: Estabilidad en otras condiciones extremas

30 En multitud de casos estos catalizadores podrían ser utilizados en procesos en los que el pH es muy diferente a 7, como los procesos de hidrólisis de lactosa en sueros ácidos (a pH 5) o la síntesis de oligogalactosacáridos, en las cuales, la utilización de condiciones diferentes como pH alcalino o el uso de codisolventes orgánicos podría ser necesario para mejorar las relaciones de síntesis/hidrólisis. Especialmente importante es el uso de disolventes orgánicos en procesos de síntesis si se tiene en cuenta que la enzima es naturalmente una hidrolasa. Así la utilización de disolventes orgánicos no solo puede modificar el ensamblaje

del sitio activo de la enzima sino que pueden desplazar el equilibrio termodinámico hacia la síntesis de oligosacáridos. Por esta razón, la preparación de estos catalizadores muy estables en un amplio rango de condiciones es fundamental. Las estabilidades en diferentes condiciones (pH 5, 9 o en presencia de dioxano) de los diferentes catalizadores inmovilizados fue estudiada. En general, el derivado glioxil fue mucho más estable que el inmovilizado sobre CNBrS tras incubación en las diferentes condiciones. El derivado β -gal CNBrS incubado a pH 5 tuvo una vida media de 19 horas (Figura 4A). Por el contrario la β -gal inmovilizada en soportes GS retuvo el 71% de su actividad catalítica tras 42 horas de incubación en las mismas condiciones. El derivado glioxil también fue más estable que el CNBrS tras incubación a pH 9 y en presencia de disolventes orgánicos como dioxano (Figuras 4B y 4C). Remarcablemente, el derivado glioxil incubado a pH 9 y 25°C retuvo el 90% de su actividad tras 48 horas de incubación mientras que la vida media del derivado CNBrS fue de 9 horas. Cuando los diferentes derivados fueron incubados en presencia del 30% de dioxano, el derivado glioxil conserva el 55% de su actividad tras 8 horas mientras que la vida media del derivado CNBrS fue de 2.6 horas.

Estos resultados de estabilización sobre soportes glioxil agarosa fueron los mejores encontrados en la literatura, en la que la mayor parte de los derivados descritos tienen una estabilidad similar a la de la enzima soluble siendo en torno a 7 veces el máximo factor de estabilización encontrado si se compara con la enzima soluble (Giacomini, Villarino, Franco-Fraguas & Batista-Viera, 1998; Ladero, Santos & Garcia-Ochoa, 2000; Maugard, Gaunt, Legoy, & Besson, 2003).

EJEMPLO 4: Optimización de los derivados de β -gal inmovilizados en soportes GS

El tiempo de inmovilización (o tiempo de reacción entre la enzima y el soporte) juega un papel fundamental en el proceso de estabilización porque afecta la extensión de los procesos de interacción enzima-soporte, debido a que dicha interacción aumenta mucho con el tiempo de incubación (Blanco, Calvete & Guisan, 1988). De este modo, los derivados inmovilizados en soportes glioxil fueron incubados a pH alcalino durante diferentes tiempos, entre 1 y 20 horas, obteniéndose diferentes derivados. Estos fueron posteriormente inactivados mediante incubación en diferentes condiciones como diferentes pHs (5.0, 7.0 y 9.0) y en presencia de dioxano, que en este caso fue el 70% (v/v). En general la máxima estabilidad se obtuvo tras 2 horas de inmovilización. Cuando las preparaciones fueron incubadas en dioxano la estabilidad máxima se obtuvo entre 1 y 2 horas. Posteriormente la estabilidad decreció gradualmente y la menor estabilidad fue observada tras incubación de

20 horas (Figura 5). El primer proceso de estabilización puede ser explicado por un incremento en la extensión del proceso de multiinteracción durante las 2 primeras horas, resultando en una rigidificación de la estructura 3D que viene junto con una mejora de la estabilidad. Un incremento mayor en la multiinteracción podría causar un descenso de la estabilidad de la enzima. Esto podría ser explicado teniendo en cuenta la naturaleza multimérica de la enzima. En este caso, una excesiva multiinteracción podría promover la modificación del ensamblaje de las subunidades o bien una excesiva modificación de su estructura, provocando un descenso en la estabilidad de la enzima producida en condiciones distorsionantes. La optimización del proceso de interacción covalente multipuntual entre la enzima y el soporte permite obtener catalizadores más estables que los preparados usando un método de inmovilización covalente unipuntual. Estos nuevos derivados glioxil de β -gal GS son potencialmente interesantes en diferentes procesos como la hidrólisis de lactosa en leche a pH neutro, hidrólisis de lactosa en sueros ácidos o bien la síntesis de galactooligosacáridos en diferentes condiciones de pH, temperatura o incluso en presencia de disolventes orgánicos. Un interés especial tiene la posibilidad de utilizar los derivados en disolventes orgánicos porque como ha sido descrito los codisolventes en general alteran la estructura de la enzima (Klibanov, 2001). Esto podría producir ligeros cambios en el sitio activo modulando la actividad catalítica de la enzima. Este efecto es particularmente pronunciado en el caso de enzimas multiméricas debido a que esto puede modificar el ensamblaje de las subunidades (Mateo et al, 2003). Este hecho es de gran interés en procesos de síntesis en los cuales además se puede favorecer los rendimientos en los compuestos de interés.

La utilización de este protocolo optimizado de inmovilización ofrece derivados con factores de estabilización diferentes dependiendo de las condiciones de inmovilización. Estos factores fueron de 100-, 14-, 70- y 3-veces más estables que la enzima soluble y el derivado inmovilizado de forma unipuntual tras incubación a pH 7, 5, 9 y en presencia del 30% de dioxano, respectivamente.

30 **EJEMPLO 5: Estabilización estructural de los diferentes derivados**

La estabilización funcional de la enzima fue correlacionada con una estabilización estructural. Los resultados de electroforesis del derivado β -gal CNBrS en condiciones de disociación nos enseña cómo se produce la desorción de algunas subunidades lo que significa que la enzima no fue unida al soporte simultáneamente a través de todas las subunidades de manera covalente, sino mayoritariamente a través de una sola subunidad.

Además, cuando la enzima fue inmovilizada sobre soportes glioxil, la desorción de subunidades al medio no fue observada (Figura 6). Esto significa que se produjo la inmovilización covalente de la enzima al menos por un punto de cada subunidad lo que permite la estabilización de la estructura cuaternaria de la enzima.

5

EJEMPLO 6: Estabilización frente a la acción de proteasas

Un cierto número de proteasas, incluyendo la plasmina, están presentes en la leche y derivados como queso o suero, y además estas no son completamente inactivadas tras el tratamiento térmico a que son sometidos dichos medios pudiendo catalizar la hidrólisis de diferentes proteínas. La concentración de esta proteína es diferente dependiendo de la fuente del producto lácteo. A modo de ejemplo, está descrito que la actividad de la plasmina expresada como $\mu\text{g g}^{-1}$ de proteína varía entre 16.3 y 330 dependiendo de la muestra de suero (Hayes & Nielsen, 2000) y en leche de cabra la concentración fue de 3.22 mg mL^{-1} (Santillo et al, 2009). De este modo la estabilidad del derivado óptimo fue evaluada y comparada con la de la enzima soluble tras incubación en presencia de plasmina. La enzima soluble perdió el 95% de su actividad tras incubación en 4 mg mL^{-1} de plasmina tras 168 horas de incubación. Por el contrario, el derivado glioxil óptimo solamente perdió el 5% de su actividad durante incubación en estas condiciones durante el mismo tiempo (Figura 7). Este resultado indica que la rigidificación de la estructura de la enzima en estos soportes protege la enzima de la acción de esta proteasa. Además es también probable que la unión de la enzima al soporte a través de las lisinas proteja también frente a la acción de ciertas proteasas que tengan preferencia por la hidrólisis a través de las lisinas como es el caso de la plasmina o de la tripsina.

25

EJEMPLO 7: Estabilización promovida por el anclaje de polímeros cargados con conservantes (glicina).

La actividad de los diferentes derivados de β -gal depende de la química utilizada para el anclaje de los diferentes polímeros (tabla 1). Así cuando la química de formación de la amida fue utilizada la actividad recuperada fue menor al incrementar la concentración de EDCI (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida). Mediante esta química se hace la unión de los polímeros a través de los grupos carboxilo de las glicinas sobre las lisinas de la enzima inmovilizada. Alternativamente a la EDCI se pueden utilizar otros agentes de acoplamiento similares empleados en la formación de enlaces amida por acoplamiento de grupos carboxilos y aminas. Los derivados más activos fueron los obtenidos utilizando la

35

química del aldehído o bien los adsorbidos iónicamente con una recuperación de en torno al 80%. En el caso de emplear la química del aldehído, el polímero activado de segundas con grupos glioxil (es decir, después de la unión de la glicina) se une al derivado inmovilizado mediante formación de iminas con lisinas del soporte, y en un segundo paso, se reducen tal y como se hacia al inmovilizar la enzima sobre soportes glioxil. En el caso del polímero activado con agentes conservantes ionicos, el polímero con solo glicina se pone en contacto con el derivado y se fija a la enzima mediante todas las interacciones electrostáticas producidas entre los grupos amino y carboxilo de la glicina y los grupos ionizables de la enzima. Si bien este método es reversible, la interaccion es altamente multipuntual y muy fuerte.

Además de esto, se estudio la estabilidad de estos derivados comparados con la enzima solamente inmovilizada-estabilizada sobre soportes glioxil. Los mejores fueron aquellos en los que se utilizaron polímeros altamente cargados con glicina y posteriormente reoxidados en pequeños porcentajes (10%) para unirse mediante estos grupos aldehído a las lisinas de la superficie de la enzima inmovilizada (tabla 1 y figura 9). El factor de estabilización de estos derivados óptimos fue de 122 veces respecto al solamente inmovilizado.

Tabla 1. Caracterización de los diferentes derivados de β -gal. Los factores de estabilización se calcularon como la relación de la vida media de las diferentes preparaciones después de incubación a pH 7 y 60 °C con respecto al derivado de glioxil agarosa. *Nd: No determinado.*
* El factor de estabilización se calculó como la relación entre la vida media de las diferentes preparaciones comparadas con el glioxil derivado de referencia inicial.

Química utilizada		Actividad (IU/g soporte)	Actividad Conservada (%)	Factor de estabilizacion*
Glioxil agarosa (referencia)		28.9	100	1
Unión electrostática		21.4	74	79
Formación de la amida	0.1 mM EDCI	7.51	26	1.27
	0.5 mM EDCI	2.54	9	Nd
	1 mM EDCI	1.36	5	Nd
Reacción del aldehído	10% glicina + 90% aldehído	19.0	66	1.3
	50% glicina + 50% aldehído	17.3	60	1.7
	90% glicina + 10% aldehído	20.9	72	122

25

Referencias

- 5 Alaiz, M., Navarro, J. L., Giron, J. & Vioque, E. (1992). Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. *Journal of Chromatography*, 591, 181-186.
- 10 Alonso-Morales, N., Lopez-Gallego, F., Betancor, L., Hidalgo, A., Mateo, C., Fernandez-Lafuente, R. & Guisan, J. M. (2004). Reversible immobilization of glutaryl acylase on Sepabeads coated with polyethyleneimine. *Biotechnology Progress*, 20, 533-536.
- Blanco, R. M., Calvete, J. J., & Guisan, J. M. (1989). Immobilization–stabilization of enzymes. Variables that control the intensity of the trypsin (amine)-agarose (aldehyde) multi-point covalent attachment. *Enzyme and Microbial Technology*, 11, 353–359.
- 15 Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- 20 Case, G. S., Sinnott, M. L. & Tenu, J. P. (1973). The role of magnesium ions in beta-galactosidase hydrolyses. Studies on charge and shape of the β -galactopyranosyl binding site. *Biochemistry Journal*, 133, 99-104.
- Crudden, A., Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2005). Factors affecting the hydrolytic action of plasmin in milk. *International Dairy Journal*, 15, 305-313.
- 25 Fernandez-Lafuente, R. (2009). Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme and Microbial Technology*, 45, 405-418.
- 30 Fink, D. J., Na, T., Schultz, J. S. (1973). Effectiveness factor calculations for immobilized enzyme catalysts. *Biotechnology and Bioengineering*, 15, 879-888.
- Garman, J., Coolbear, T. & Smart, J. (1996). The effect of cations on the hydrolysis of lactose and the transferase reactions catalysed by β -galactosidase from six strains of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46, 22-27.

35

Giacomini, C., Villarino, A., Franco-Fraguas, L. & Batista-Viera, F. (1998). Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: comparison of different methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 4, 313–327.

5 Guisan, J. M. (1988). Aldehyde gels as activated support for immobilization–stabilization of enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 10, 375–382.

Hayes, K. D. & Nielsen, S. S. (2000). Plasmin levels in fresh milk whey and commercial whey protein products. *Journal of Dairy Science*, 83, 387-394.

10

Klibanov, A. M. (2001). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, 409, 241-246.

15

Ladero, M., Santos, A. & Garcia-Ochoa, F. (2000). Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 583–592.

20

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Mateo, C.; Archelas, A.; Fernandez-lafuente, R.; Guisan, J.M.; Furstoss, R. (2003) "Enzymatic transformations. Immobilized *A. niger* epoxide hydrolase as a novel biocatalytic tool for repeated-batch hydrolytic kinetic resolution of epoxides". *Org. Biomol. Chem.* 1, 2739-2743.

25

Mateo, C., Palomo, J. M., Fuentes, M., Betancor, L., Grazu, V., Lopez-Gallego, F., Pessela, B. C. C., Hidalgo, A., Fernandez-Lorente, G., Fernandez-Lafuente, G., & Guisan, J. M. (2006). Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 274–280.

30

Maugard, T., Gaunt, D., Legoy, M. D. & Besson, T. (2003). Microwave-assisted synthesis of galacto-oligosaccharides from lactose with immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biotechnology Letters*, 25, 623–629.

35

Pedroche, J., Yust, M. M., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J., Guisán, J.M. & Millán, F. (2007). Effect of the support and experimental

conditions in the intensity of the multi-point covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports. Correlation between enzyme-support linkages and thermal stability. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1160-1166.

- 5 Pereira-Rodriguez, A., Fernandez-Leiro, R., Becerra, M., Gonzalez-Siso, I., Cerdan, M. E. & Sanz-Aparicio, J. Structure of the betha-galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. DOI:10.2210/pdb3oba/pdb.

- 10 Pereira-Rodriguez, A., Fernandez-Leiro, R., Becerra, M., Gonzalez-Siso, I., Cerdan, M. E. & Sanz-Aparicio, J. Structure of the betha-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* in complex with galactose. DOI:10.2210/pdb3ob8/pdb.

- 15 Prenosil, J. E., Stuker, E. & Bourne, J. R. (1987). Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose hydrolysis: part i: state of art. *Biotechnology and Bioengineering*, 30, 1019-1925.

Rogalski, J., Dawidowicz, A., & Leonowi, A. (1994). Lactose hydrolysis in milk by immobilized β -galactosidase. *Journal of Molecular Catalysis*, 93, 233-245.

- 20 Santillo, A., Kelly, A. L., Palermo, C., Sevi, A. & Albenzio, M. (2009). Role of indigenous enzymes in proteolysis of casein in caprine milk. *International Dairy Journal*, 19, 655–660.

- 25 Szczodrak, J. (2000). Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10, 631-637.

- 30 Vlakh, E. G., Platonova, G. A., Vlasov, G. P., Kasper, C., Tappe, A., Kretzmer, G., & Tennikova, T. B. (2003). In vitro comparison of complementary interactions between synthetic linear/branched oligo/poly-L-lysines and tissue plasminogen activator by means of high-performance monolithic-disk affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, 992, 109-119.

- 35 Voget, C. E., Flores, M. V., Faloci, M. M., & Ertola, R. J. J. (1994). Effects of the Ionic environment on the Stability of *Kluyveromyces lactis* β -Galactosidase. *LWT-Food Science and Technology*, 27, 324-330.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de estabilización de una β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*, caracterizado porque comprende unir la enzima a un polímero activado con al menos un agente conservante de estabilización de enzimas, dicho polímero activado comprendiendo grupos aldehído y/o carboxilo, y donde la unión es de tipo covalente y/o electrostática entre al menos un grupo amino de la enzima con un grupo aldehído o carboxilo del polímero activado.
2. Procedimiento según la reivindicación 1 donde para llevar a cabo la unión de la enzima al polímero comprende:
- a. poner en contacto la enzima y el polímero,
 - b. hacer reaccionar la enzima y el polímero en medio acuoso a pH entre 4,5 y 10,2 hasta formar al menos un enlace entre un grupo amino de la enzima y un grupo aldehído o carboxilo del polímero, dicho enlace seleccionado del grupo que consiste en:
 - enlace covalente entre un grupo amino de la enzima y un grupo aldehído del polímero;
 - enlace covalente entre un grupo amino de la enzima y un grupo carboxilo del polímero;
 - enlace electrostático entre un grupo amino de la enzima y un grupo carboxilo del polímero;o una combinación de dos o más de los anteriores.
3. Procedimiento según la reivindicación 2 en el que, cuando el polímero activado comprende grupos aldehído o grupos aldehído y carboxilo, para formar el enlace covalente entre el grupo amino de la enzima y el grupo aldehído del polímero, se hace reaccionar la enzima y el polímero comprendiendo las siguientes etapas:
- b.1. mantener el medio acuoso que contiene la enzima a pH entre 9,8 y 10,2 hasta formar al menos un enlace imina,
 - b.2. reducir el enlace imina con un agente reductor de iminas y aldehídos,
 - b.3. neutralizar el pH del medio acuoso a un valor comprendido entre 6,0 y 8,0, una vez finalizada la etapa de reducción anterior.
4. Procedimiento según la reivindicación 2 ó 3 en el que, cuando el polímero comprende grupos carboxilo, para formar el enlace entre el grupo amino de la enzima y el grupo

carboxilo del polímero, se hace reaccionar la enzima y el polímero comprendiendo al menos una de las siguientes etapas:

b.4. mantener el medio acuoso que contiene la enzima a pH entre 4,5 y 5,0, en presencia de un agente de acoplamiento peptídico, hasta formar un enlace covalente tipo amida entre los grupos amino y carboxilo;

5

y/o

b.5. ajustar el pH del medio acuoso que contiene la enzima entre 6,0 y 8,0 hasta formar al menos un enlace electrostático entre un grupo amino de la enzima y un grupo carboxilo del polímero.

10

5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el polímero está activado entre un 50% y un 100% con dicho agente conservante, y además entre un 0% y un 50% con grupos aldehído o glioxilo.

15

6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el polímero es un dextrano.

7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el agente conservante es glicina.

20

8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, donde la enzima se hace reaccionar con el polímero entre 1 y 20 horas.

25

9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la unión de la enzima al polímero se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 4 °C y 25 °C.

10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, donde la enzima se deja reaccionar con el polímero entre 1 y 3 horas.

30

11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende obtener el polímero activado previamente a su unión con la enzima.

12. Procedimiento según la reivindicación 11, que cuando el polímero activado es un dextrano activado con glicina, la obtención del mismo comprende:

35

i.1. oxidar un dextrano entre un 50% y un 100% a grupos aldehído o glioxilo;

i.2. unir glicina covalentemente al dextrano mediante reacción del dextrano oxidado con glicina, seguido de reducción con un agente reductor de aldehídos e iminas y posterior neutralización del pH.

5 **13.** Procedimiento según la reivindicación 12 que, cuando la oxidación del dextrano es inferior al 100%, además comprende:

i.3. reoxidar a grupos aldehído o glioxilo el dextrano previamente unido a glicina.

10 **14.** Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde la β -galactosidasa se encuentra inmovilizada en un soporte activado con grupos glioxil.

15. Procedimiento según la reivindicación 14 que comprende además inmovilizar la β -galactosidasa previamente a su unión con el polímero activado, donde dicha inmovilización comprende:

15 ii.1. hacer reaccionar la β -galactosidasa con un soporte altamente activado con grupos glioxil en solución tamponada libre de sodio a pH 10 y en presencia de al menos un catión estabilizador de la enzima en concentración adecuada para mantener la actividad de dicha enzima;

20 ii.2. reducir el producto de la reacción anterior con un agente reductor de aldehídos e iminas.

16. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15, donde el soporte es glioxil agarosa.

25 **17.** Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16 donde, donde la glioxil agarosa es agarosa 6BCL activada con 75 micromoles de grupos aldehído por mililitro de soporte.

30 **18.** Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, donde la solución tamponada es bicarbonato de potasio.

19. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, donde el catión estabilizador se selecciona del grupo que consiste en: catión potasio a una concentración comprendida entre 0,05 M y 0,3 M, catión magnesio a una concentración comprendida entre 35 0,5 mM y 0,3 mM, y una combinación de los mismos.

20. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, donde se deja reaccionar la β -galactosidasa con el soporte entre 20 minutos y 20 horas.
21. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20, donde se deja reaccionar la β -galactosidasa a una temperatura comprendida entre 4 °C y 35 °C.
22. Un catalizador de β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* obtenido por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21.
23. Uso de una β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* obtenida por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, como catalizador enzimático en un reactor de tanque agitado, de lecho fijo o de lecho fluidizado.
24. Uso de una β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* obtenida por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, para hidrolizar lactosa en leche o en sueros ácidos.
25. Uso de una β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* obtenida por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, como catalizador enzimático en procesos de transglicosilación para producir galactooligosacáridos.

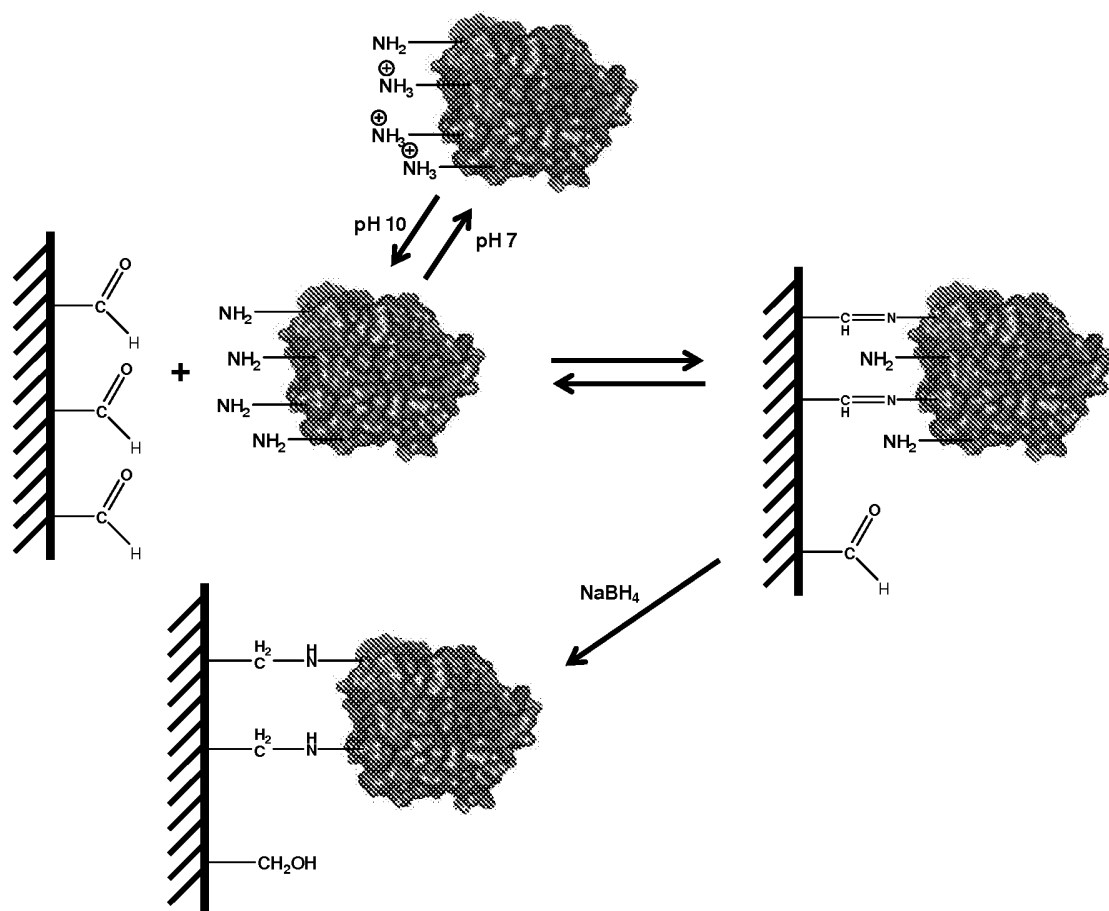


Figura 1

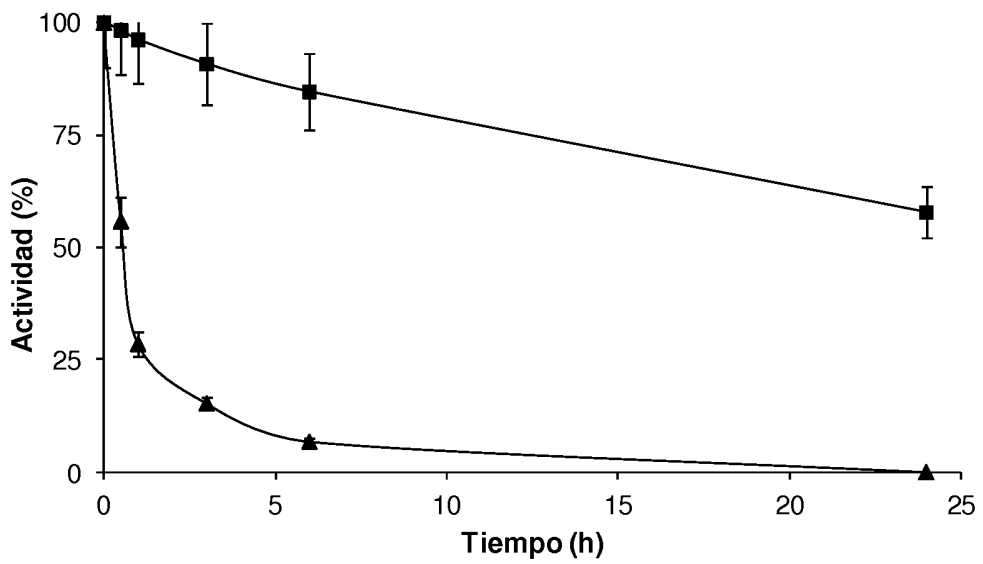
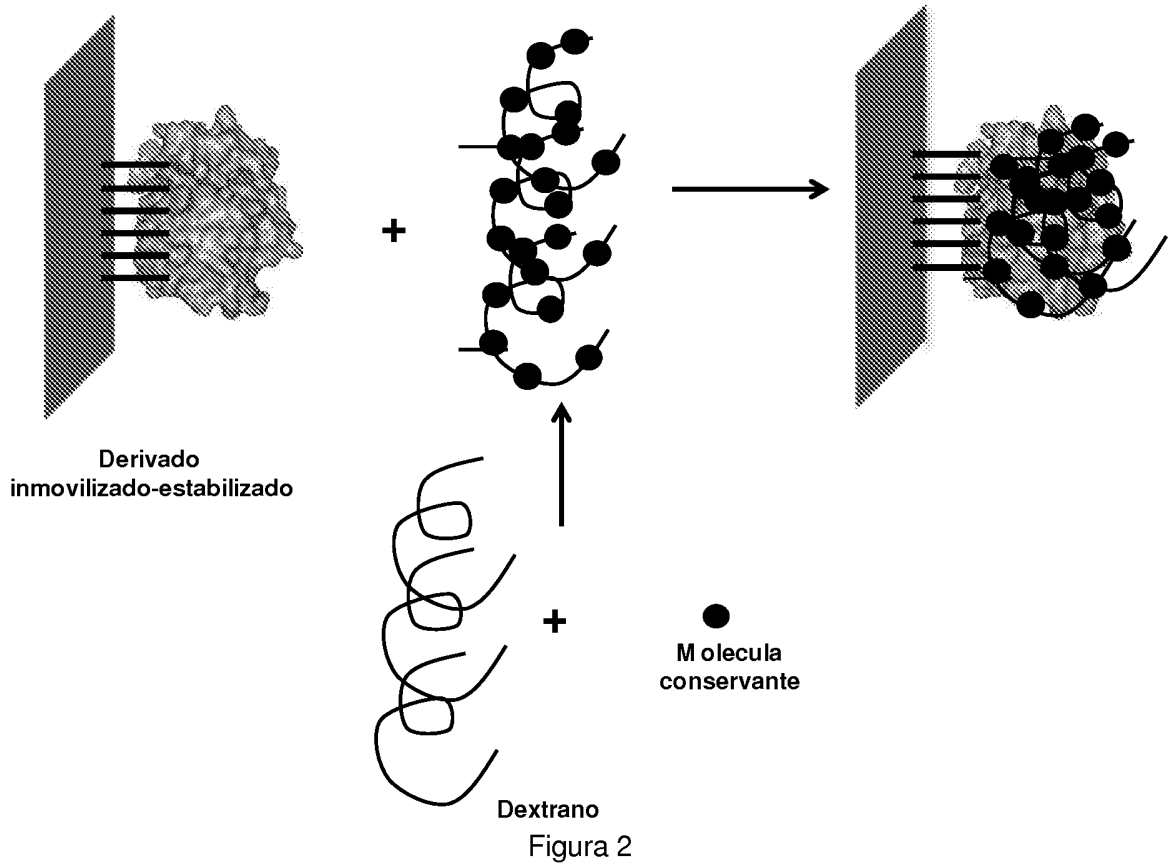


Figura 3

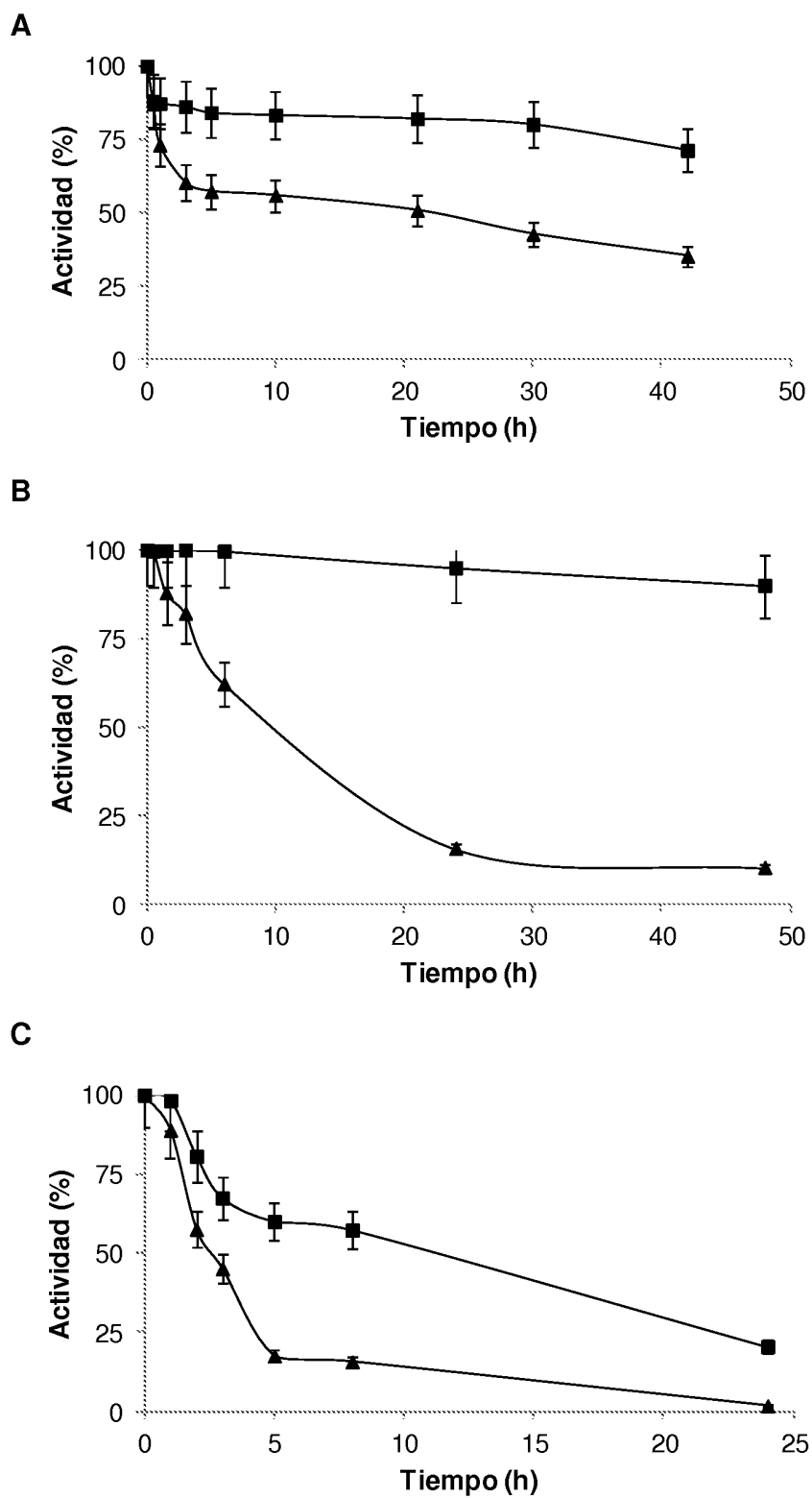


Figura 4

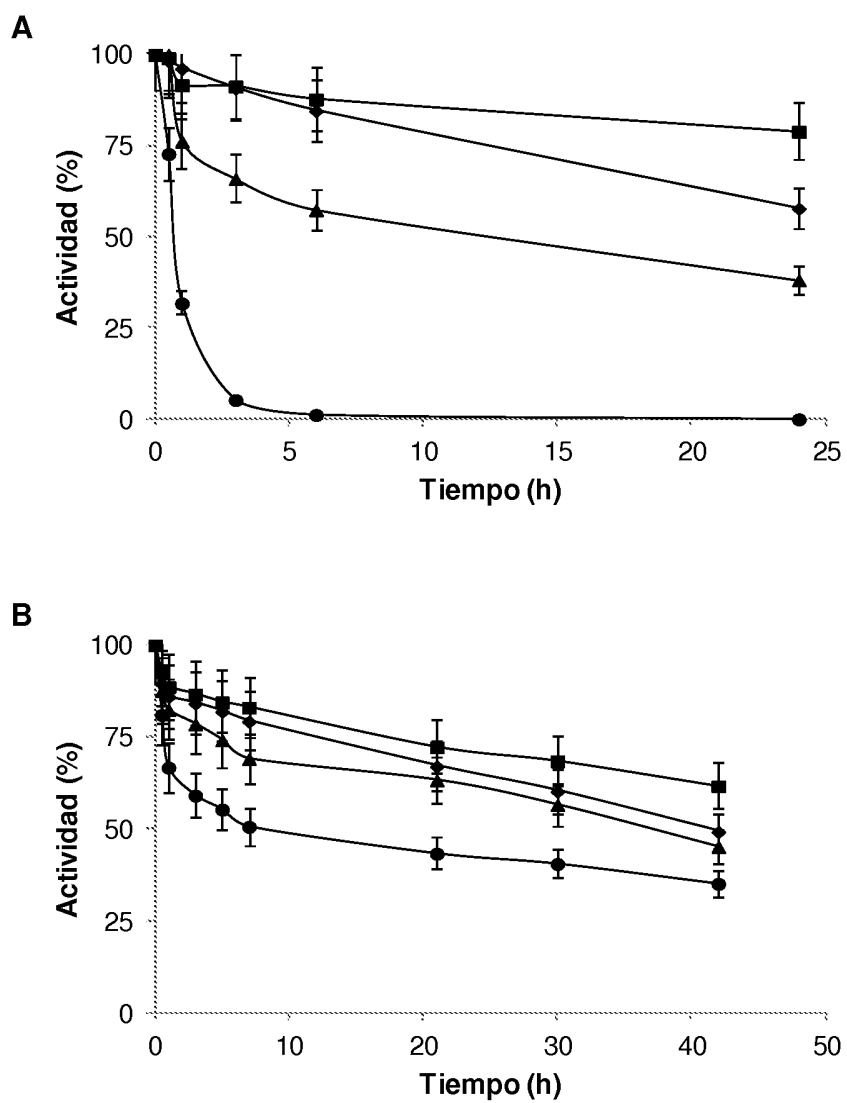


Figura 5

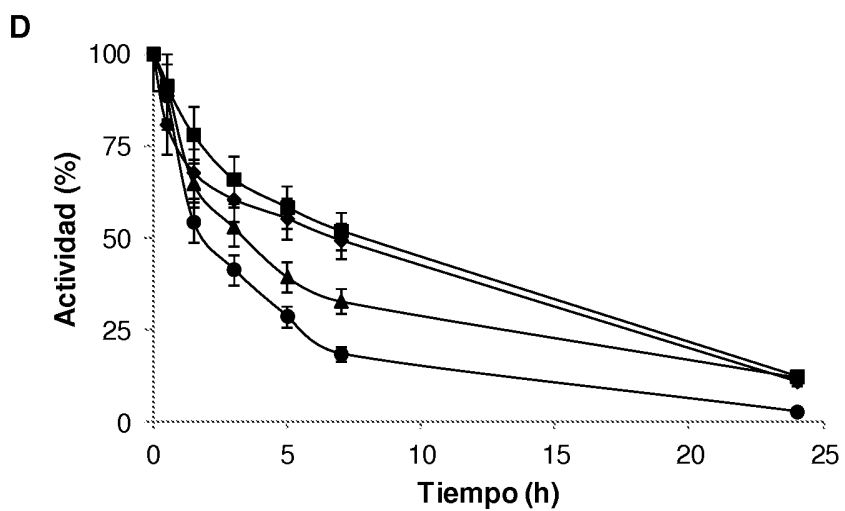
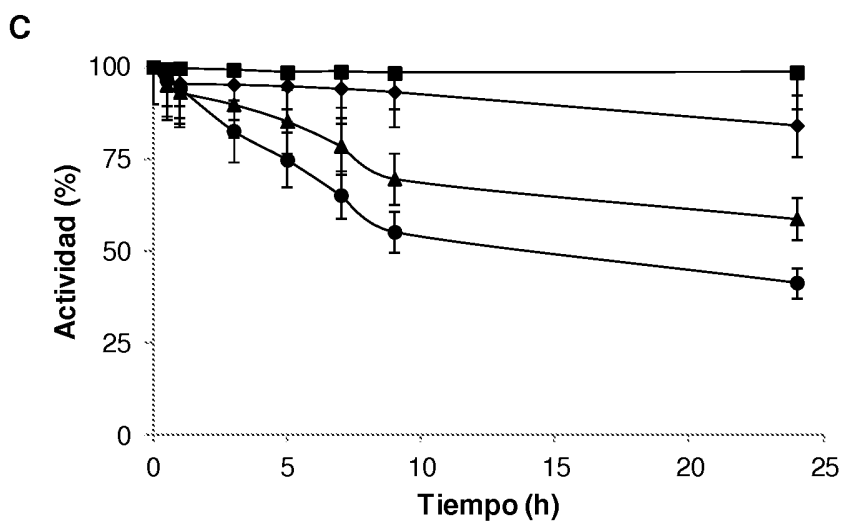


Figura 5 (cont.)

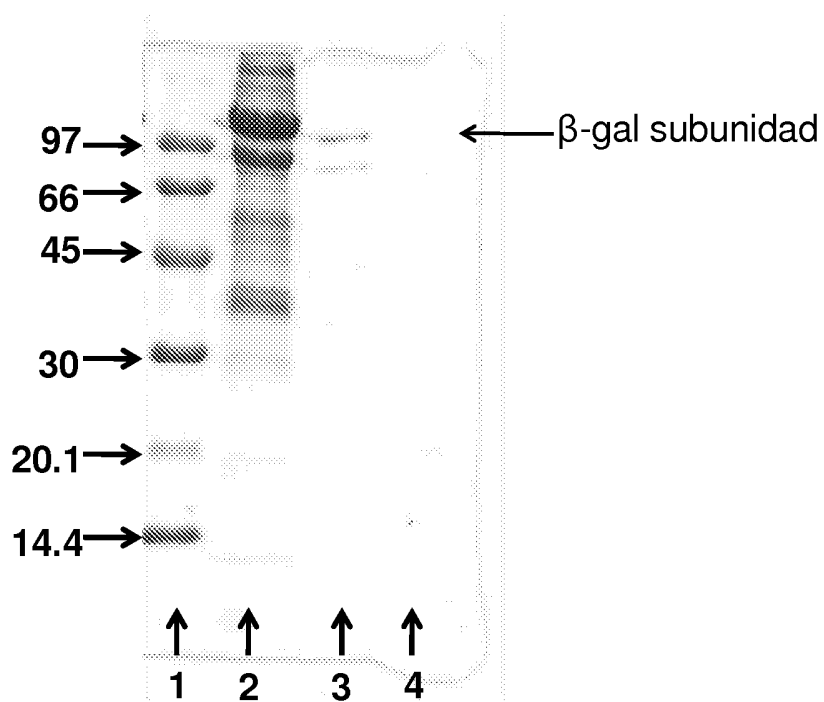


Figura 6

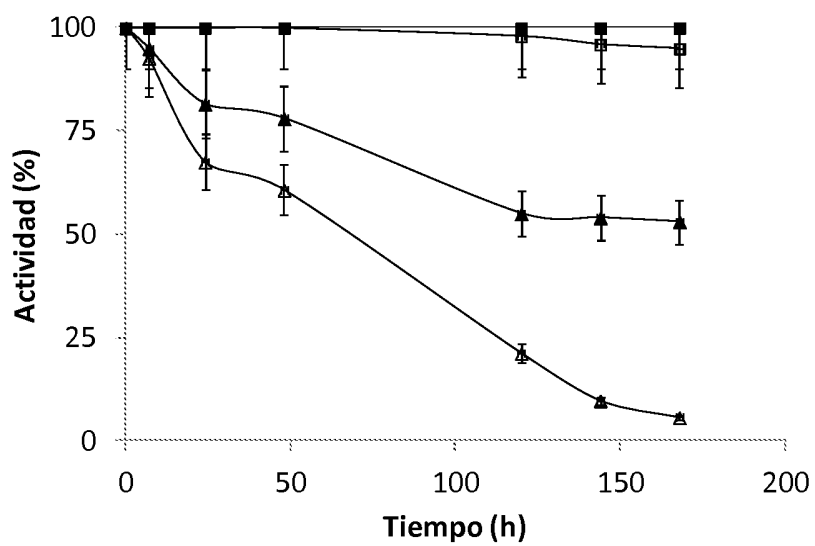


Figura 7

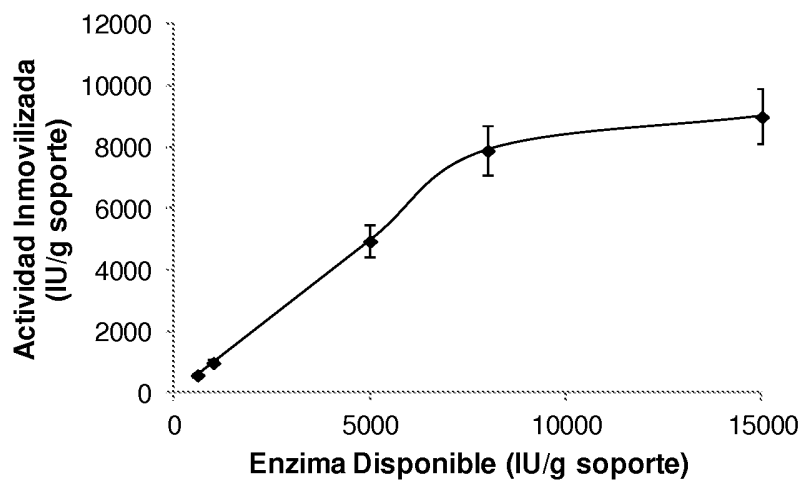


Figura 8

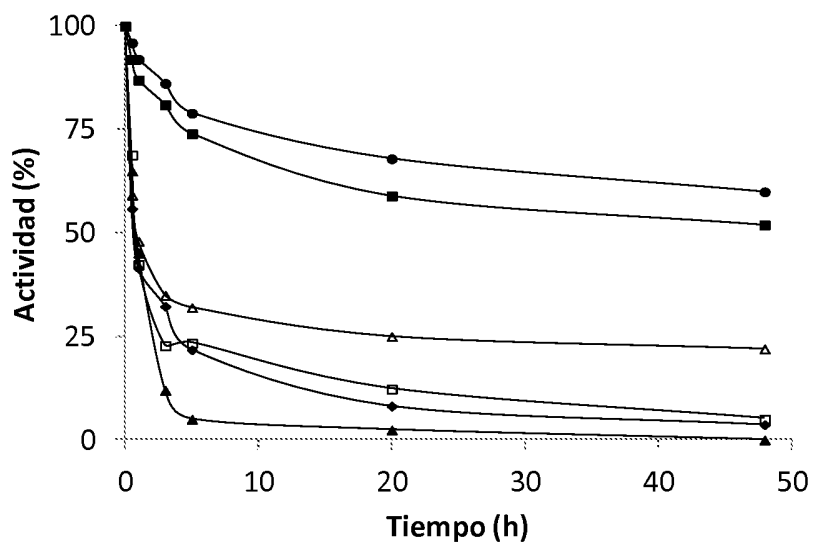


Figura 9

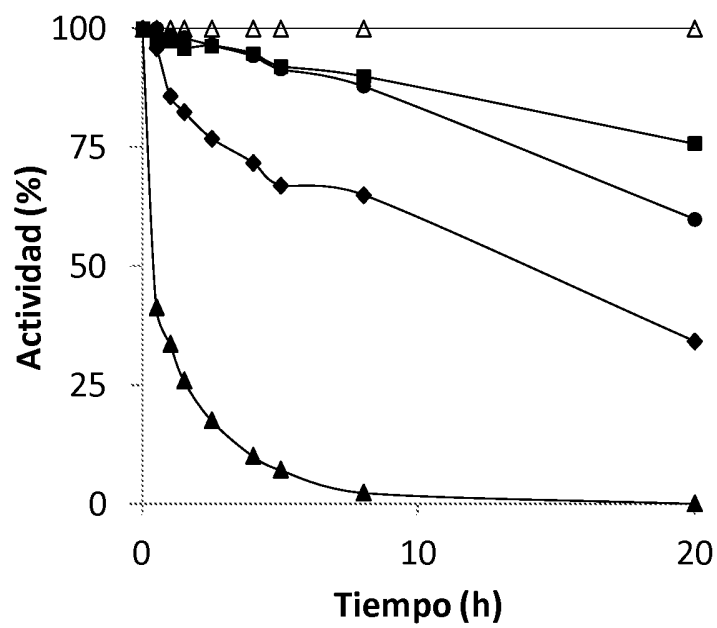


Figura 10

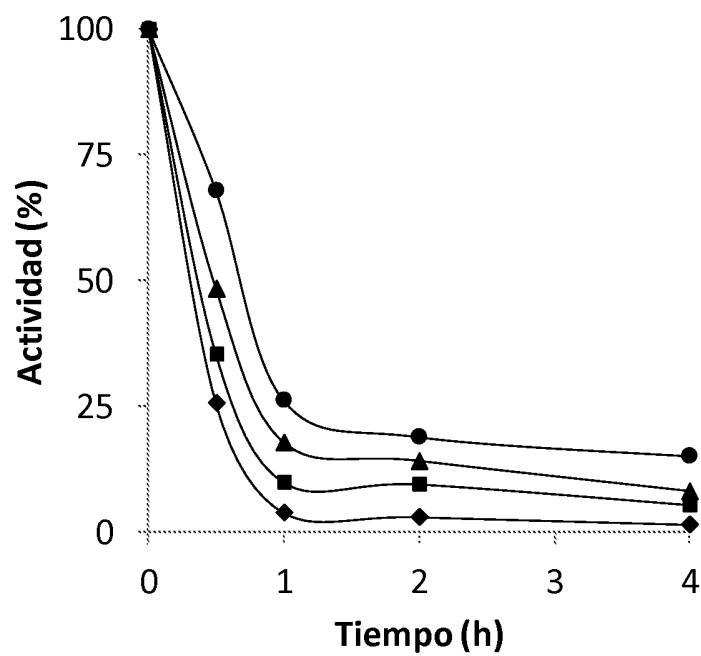


Figura 11



- ① N.º solicitud: 201330952
② Fecha de presentación de la solicitud: 25.06.2013
③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	FERNÁNDEZ-LAFUENTE R., et al. "Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (1999) Vol. 7, páginas 181-189. Página 181-184, 187 y tabla 1.	1-25
A	MATEO C., et al. "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques." Enzyme and Microbial Technology (2007) Vol. 40, páginas 1451-1463. Apartado 3.2.1 y 3.3	1-25
A	BERNAL C. et al. "Immobilization and stabilization of beta-galactosidase from <i>Kluyveromyces lactis</i> using a glyoxyl support." International Dairy Journal (2013) Vol. 28, páginas 76-82. Página 77: "Immobilization on glyoxyl sepharose".	1-25
A	BOLIVAR J. M. et al. "Heterofunctional supports for the one-step purification, immobilization and stabilization of large multimeric enzymes: amino-glyoxyl versus amino-epoxy supports." Process Biochemistry (2010) Vol. 45, páginas 1692-1698. Todo el documento.	1-25

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
27.11.2014

Examinador
M. J. García Bueno

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N9/00 (2006.01)

C12N1/16 (2006.01)

C07K14/39 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C07K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, INVENES, TXTE, TXTF, XPESP, NPL, GOOGLE SCHOLAR.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.11.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-25	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-25	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	FERNÁNDEZ-LAFUENTE R., et al. "Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic (1999) Vol. 7, páginas 181-189. Página 181-184, 187 y tabla 1.	1999
D02	MATEO C., et al. "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques." Enzyme and Microbial Technology (2007) Vol. 40, páginas 1451-1463. Apartado 3.2.1 y 3.3	2007
D03	BERNAL C. et al. "Immobilization and stabilization of beta-galactosidase from <i>Kluyveromyces lactis</i> using a glyoxyl support." International Dairy Journal (2013) Vol. 28, páginas 76-82. Página 77: "Immobilization on glyoxyl sepharose".	02.2013
D04	BOLIVAR J. M. et al. "Heterofunctional supports for the one-step purification, immobilization and stabilization of large multimeric enzymes: amino-glyoxyl versus amino-epoxy supports." Process Biochemistry (2010) Vol. 45, páginas 1692-1698. Todo el documento.	2010

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de invención consiste en un procedimiento de estabilización de una beta-galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* que comprende unir la enzima a un polímero que comprende grupos aldehído y/o carboxilo y está activado con al menos un agente conservante de estabilización de enzimas, de manera que se evita tener que adicionar altas cantidades de conservante al medio de reacción (reivindicaciones 1-21).

La presente solicitud de invención también consiste en un catalizador de beta-galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* obtenido por el procedimiento anterior (reivindicación 22), y sus diferentes usos como catalizador enzimático en reactores de tanque agitado (reivindicación 23), en la hidrólisis de lactosa en leche y sueros ácidos (reivindicación 24), y en la síntesis de galactooligosacáridos (reivindicación 25).

El documento D01 consiste en un estudio de la estabilización de enzimas multiméricas tras su inmovilización en soportes glioxil. Dicha estabilización se realiza mediante la unión de la enzima con macromoléculas como puede ser el dextrano. Dicho estudio, se ha realizado con enzimas multiméricas pero indica que se puede esperar que este sistema permita la estabilización de la mayoría de las enzimas multiméricas más simples: las diméricas, entre los que se encuentra la beta-galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* (ver página 181-184, 187 y tabla 1).

Sin embargo, el documento D01 no divulga el uso de conservantes de estabilización de la enzima unidos al dextrano.

El documento D02 consiste en un estudio sobre la mejora de la actividad de las enzimas y su estabilidad mediante diferentes técnicas de inmovilización. Entre esas técnicas se encuentra la inmovilización sobre soporte de glioxil agarosa, los cuales pueden ser complementados mediante la unión química con polímeros polifuncionales (Apartado 3.2.1 y 3.3).

El documento D02 también divulga la intención de probar el potencial de estas técnicas con dos lactasas diferentes, lactasa de *Kluyveromyces lactis* y lactasa de *Thermus* sp.

Sin embargo, el documento D02 no divulga si el polímero está unido a un agente conservante de estabilización de enzimas y si dicho polímero comprende un aldehído o un grupo carboxilo.

El documento D03 consiste en un estudio de la inmovilización y estabilización de beta-galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* mediante el uso de soportes activados con grupos glioxil, en concreto glioxil agarosa 6BCL. Dicha inmovilización se lleva a cabo mediante una suspensión de 1 gramo del soporte en 5 ml por cada 100 mM de bicarbonato potásico, 0,1 M de cloruro potásico y 2 mM de cloruro de magnesio a pH 10, con 0,03 ml de solución de beta-galactosidasa. Una vez inmovilizada la enzima, la suspensión se incubaba a 4°C entre 1 y 20 horas, y el producto resultante de la reacción se reduce con un agente reductor de aldehídos e iminas (ver página 77: Immobilization on glyoxyl sepharose).

El documento D04 consiste en una inmovilización y estabilización de enzimas con un nuevo soporte que contiene baja concentración de grupos ionizados amino y una alta concentración de grupos glioxil. El documento D04 divulga también la unión química de las subunidades de la enzima inmovilizada con polímeros, como dextrano (ver todo el documento).

Sin embargo el documento D04 no divulga el uso de la enzima beta-galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* en este estudio (ver todo el documento).

Ninguno de los documentos citados, o cualquier combinación relevante de ellos revela la unificación de un procedimiento de inmovilización de la enzima beta-galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* sobre soportes glioxil con la adición posterior de diferentes polímeros activados con conservantes que promuevan una mayor estabilización de la enzima.

Por lo tanto, los documentos D01-D04 son solo documentos que reflejan el estado de la técnica. En consecuencia las reivindicaciones 1-25 son nuevas e implican actividad inventiva en el sentido de los artículos 6.1 y 8.1 Ley 11/1986.