

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 631**

21 Número de solicitud: 201530756

51 Int. Cl.:

C12N 11/04

(2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

29.05.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.01.2017

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2016/070397

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
C/ Serrano, 117
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**CASTRO MIGUEL, Elsa;
GASCÓN PÉREZ, Victoria;
SÁNCHEZ SÁNCHEZ, Manuel;
BLANCO MARTÍN, Rosa María y
DÍAZ GARCÍA, Manuel**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **PROCEDIMIENTO GENERAL DE OBTENCIÓN DE BIOCATALIZADORES QUE COMPRENDE LA INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS DURANTE LA SÍNTESIS DE MATERIALES METALO-ORGÁNICOS**

57 Resumen:

Procedimiento general de obtención de biocatalizadores que comprende la inmovilización de enzimas durante la síntesis de materiales metalo-orgánicos.

La presente invención propone un procedimiento general de obtención de biocatalizadores que comprende la inmovilización in-situ de enzimas, en la mesoporosidad intercristalina formada por la agregación de nanocristales durante la síntesis de un material metalo-orgánico (MOF). El procedimiento de la invención permite alcanzar un alto contenido de enzima sobre el soporte, minimizar la reducción de la eficiencia catalítica en relación con la de la misma enzima libre y reducir las pérdidas por lixiviado, solventando de esta forma las limitaciones identificadas en los métodos de obtención de biocatalizadores conocidos basados en la inmovilización de enzimas in-situ. La invención también se refiere a los biocatalizadores directamente obtenidos por el procedimiento.

ES 2 595 631 A1

**PROCEDIMIENTO GENERAL DE OBTENCIÓN DE BIOCATALIZADORES QUE
COMPRENDE LA INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS DURANTE LA SÍNTESIS DE
MATERIALES METALO-ORGÁNICOS**

5 **DESCRIPCIÓN**

SECTOR DE LA INVENCION

La presente invención se engloba dentro del ámbito del desarrollo de catalizadores que
10 pueden ser de aplicación en muy diferentes campos, como por ejemplo, químico,
farmacéutico, agrícola, energético y biotecnológico. Específicamente se refiere a un
procedimiento de obtención de biocatalizadores que es general, y que permite la
inmovilización de cualquier enzima durante la síntesis de materiales metalo-orgánicos
nanocristalinos (MOFs), aprovechando la mesoporosidad intercristalina, generada por
15 aglomeración o agregación de nanocristales.

ESTADO DE LA TECNICA

La inmovilización sobre soportes sólidos de enzimas permite su heterogeneización, es decir,
20 tener la biomolécula soportada en fase sólida. La obtención de biocatalizadores sólidos
favorece, entre otros aspectos, la separación de dichas enzimas del medio de reacción y su
reutilización en sucesivos ciclos de reacción.

La naturaleza química y las propiedades texturales de los materiales utilizados como
25 soportes confieren distintas propiedades al catalizador final. La unión de una enzima sobre
un soporte preexistente (en adelante inmovilización post-síntesis) puede llevarse a cabo a
través de enlaces covalentes o no covalentes, y en cualquier caso es conveniente una
elevada afinidad química entre ambas especies. Para alojar altas cargas de una enzima el
soporte debe ofrecer una alta superficie específica, por lo que son deseables materiales que
30 presenten alta porosidad con diámetro de poro superior a las dimensiones moleculares de la
enzima a inmovilizar.

Estas dos características (naturaleza química y propiedades texturales) restringen las
posibilidades de hallar un método general o universal para inmovilizar cualquier enzima,
35 independientemente de sus características, y hace necesario un diseño "a medida" de

acuerdo con la composición química de la superficie de la enzima y con sus dimensiones moleculares.

5 Como alternativa a la inmovilización post-síntesis, la posibilidad de atrapamiento de la enzima durante el proceso de síntesis del soporte, en adelante inmovilización in-situ (así es singularmente conocida la síntesis de materiales silíceos en presencia de enzimas) ha sido explorada por varias vías.

10 Entre los materiales porosos con proyección más emergente, destacan los materiales metalo-orgánicos (MOFs). En el contexto de una posible aplicación en la inmovilización de enzimas, estos materiales cumplen con las dos premisas principales anteriormente indicadas (superficie específica y diámetro de poro). Así, por un lado, su versatilidad estructural es tal que, a diferencia de otros materiales microporosos convencionales, algunas de sus estructuras poseen poros que se adentran ampliamente en el intervalo de
15 los mesoporos (Deng *et al.*, Science, 2012, 336, 1018). Por otro lado, su versatilidad de composición, que abarca la práctica totalidad de los elementos de la Tabla Periódica o de las funcionalidades orgánicas conocidas, garantiza la posibilidad de diseñar MOFs, que en caso de ser necesarios sean afines químicamente hacia cada enzima a través del control de la hidrofobicidad o de la presencia/concentración de cargas electrostáticas y/o grupos
20 funcionales prediseñados en el entorno poroso.

Dentro de la literatura patente son conocidos procedimientos de obtención de biocatalizadores que comprenden la inmovilización post-síntesis de enzimas en MOFs. Así, es especialmente destacable el documento WO2012174402A2 que refiere la mezcla de un
25 MOF mesoporoso como el Tb-mesoMOF, con una solución conteniendo la enzima microperoxidasa-11, y que se incuba durante aproximadamente de 10 a 150 horas a una temperatura aproximada de 37 grados centígrados, consiguiendo la inmovilización de la enzima en las celdas nanoscópicas del MOF. Por su parte, el documento US2014342429A1 trata sobre un método para inmovilizar cualquier tipo de biomolécula, incluyendo enzimas,
30 sobre materiales porosos como los MOFs, y singularmente sobre el MOF MIL-53(Al).

Por su parte, dentro de la literatura no patente también se divulga la obtención de biocatalizadores que comprenden MOFs sobre los que posteriormente se incorporan enzimas de tamaño pequeño con un diámetro inferior a 3,3 nm (Deng *et al.*, Science, 2012,

336, 1018; Lykourinou *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 10382; Chen *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 13188).

Sin embargo, la inmovilización post-síntesis en MOFs presenta varias limitaciones. En primer lugar, la inmensa mayoría de los materiales MOFs son microporosos por lo que no poseen poros suficientemente grandes para inmovilizar enzimas en su interior, y los que los poseen requieren de un gran esfuerzo en su preparación, porque están constituidos por ligandos orgánicos no comerciales, caros y difíciles de sintetizar, necesariamente en pasos previos a la formación del propio MOF (Deng *et al.*, Science, 2012, 336, 1018). En segundo lugar, los poros que ofrecen estos MOFs no son suficientemente grandes para que muchas biomoléculas difundan a su través, y por tanto, el método está lejos de poder considerarse universal.

En lo que respecta a la inmovilización in-situ de enzimas sobre MOFs, en el estado de la técnica únicamente se conoce el documento de Shieh *et al.* (J. Am. Chem. Soc. 2015, 137, 4276) que difunde un método para sintetizar MOFs en presencia de una enzima a temperatura ambiente y en condiciones acuosas, y que consiste en mezclar una disolución acuosa de nitrato de zinc con otra disolución acuosa conteniendo imidazolato-2-carboxaldehído (ICA), catalasa y un agente tamponador. Sin embargo, el catalizador así obtenido se caracteriza por estar formado por microcristales; una muy reducida eficiencia de encapsulación que se sitúa en un 5% en peso de la enzima (lo que se correspondería aproximadamente con un porcentaje de incorporación de la enzima inferior al 64%, considerando un rendimiento inferior al 100% y una completa formación del MOF); y además una muy reducida eficiencia catalítica de la enzima encapsulada (33 veces inferior a la de la misma enzima libre).

En base a lo anterior, se considera de interés un procedimiento general, sencillo y rápido, que basándose en la inmovilización in-situ de enzimas, durante la formación de MOFs, permita obtener biocatalizadores con alta carga enzimática, con una alta capacidad de retención de enzima y con una eficiencia catalítica que no se vea excesivamente mermada con respecto a la actividad de la biomolécula sin inmovilizar.

EXPLICACION DE LA INVENCION

En un primer aspecto la invención se refiere a un procedimiento de obtención de un biocatalizador porque comprende:

5 a) sintetizar parcial o totalmente un material metalo-orgánico (MOF) en presencia de al menos una enzima, hasta obtener un sólido y,

b) aislar el sólido sintetizado según la etapa a), preferentemente por centrifugación o filtración,

10 y donde el MOF sintetizado inmoviliza la enzima en la mesoporosidad intercristalina formada entre cristales o entre dominios aglomerados o agregados de partículas nanocristalinas de tamaño homogéneo.

Preferentemente, la mesoporosidad intercristalina comprende al menos un, y
15 preferentemente más de uno, volumen hueco entre 2 y 50 nm.

El procedimiento de la invención se caracteriza porque en la etapa (a), la síntesis del MOF comprende poner en contacto dos disoluciones en presencia de al menos una enzima, donde dichas disoluciones pueden ser acuosas, orgánicas o una mezcla acuosa-orgánica, y
20 donde preferentemente la primera disolución es una disolución de una fuente metálica y la segunda, una disolución de ligando orgánico.

La segunda disolución de ligando orgánico se elige entre una disolución acuosa de una sal de ligando orgánico o una disolución acuosa de ligando orgánico protonado en presencia de un agente desprotonante.

25 Preferentemente el procedimiento de la invención se desarrolla a temperaturas entre 4 y 70 °C y más preferentemente entre 20 y 30 °C.

Preferentemente la enzima que se utiliza es β -glucosidasa.

30 En un segundo aspecto, la invención se refiere al biocatalizador directamente obtenido por el procedimiento del primer aspecto de la invención

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

El problema técnico que resuelve la presente invención es el desarrollo de un procedimiento general o universal, sencillo, rápido y económico, que pueda ser utilizado de forma extensiva para obtener biocatalizadores que comprenden un soporte MOF y cualquier enzima que se inmovilice en el mismo durante su síntesis, y que resuelva los problemas detectados en el estado de la técnica para otros biocatalizadores que se basan en la inmovilización in-situ, singularmente la reducida capacidad de carga enzimática, la limitada capacidad de retención de las enzimas inmovilizadas, y una excesiva merma de la eficiencia catalítica con respecto a la de la biomolécula sin inmovilizar.

La presente invención se basa en un procedimiento de inmovilización in-situ de la enzima β -glucosidasa de *Aspergillus niger* (β -Glu) sobre distintos MOFs, que permite obtener biocatalizadores que se caracterizan por comprender partículas policristalinas formadas por nanocristales (de unos 40 nm) de tamaño homogéneo, que en su agregación generan volúmenes huecos, estables y ordenados mesoporos (entre 2 y 50 nm de diámetro), y que les permiten inmovilizar en su interior una importante cantidad de la enzima, que alcanza al menos un 15% en peso de la enzima y más de un 86% de la enzima expuesta en el medio de reacción ver Ejemplos 1 a 5) y adicionalmente, reduce las pérdidas por lixiviado de las mismas (ver Ejemplo 6).

Por otra parte, las condiciones de reacción que se emplean en esta invención para obtener los biocatalizadores, favorecen el mantenimiento de la actividad catalítica de las enzimas confiriéndoles una elevada eficiencia catalítica (ver Ejemplos 1 a 5), obteniendo valores muy superiores a los indicados por Shieh *et al.* (J. Am. Chem. Soc. 2015, 137, 4276) que registraron una eficiencia 33 veces inferior en el biocatalizador con respecto a la enzima libre, mientras que siguiendo el procedimiento que se incluye en la presente invención la caída es sólo de unas 6-12 veces comprobado para la enzima β -glucosidasa en medio acuoso (Ejemplos 1-3), incluso considerando que la actividad de la enzima libre se ha medido en condiciones optimizadas de pH, dilución, concentración de tampones, mientras que la actividad del biocatalizador se ha medido tomando directamente una alícuota (suspensión) del sistema de síntesis (y, por tanto, en presencia de una base, sin control de pH, sin presencia de tampones, etc.).

Finalmente, el procedimiento de obtención de biocatalizadores que se incluye en la invención, permite la estabilización de la estructura y de la actividad de la enzima durante al menos 48 horas en medios a priori poco propicios para ella, como por ejemplo la N,N-dimetilformamida, donde la enzima libre es completamente inactivada tras pocos minutos (ver Ejemplos 4 y 5).

Ciertos ejemplos de realización de esta invención se describen con detalle en este documento (ver Ejemplos 1 a 5). Sin embargo, la presente invención puede llevarse a cabo en un amplio rango de realizaciones más allá de las explícitamente descritas.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de obtención de un biocatalizador, en adelante procedimiento de obtención de la invención, que comprende las siguientes etapas:

a) sintetizar parcial o totalmente un material metalo-orgánico (MOF) en presencia de al menos una enzima, hasta obtener un sólido, y

b) aislar el sólido sintetizado según la etapa a),

y donde el MOF sintetizado inmoviliza la enzima, en la mesoporosidad intercrystalina formada entre nanocristales o entre nanodominios aglomerados o agregados en partículas micrométricas.

Es precisamente el hecho de que la inmovilización se produzca en esta mesoporosidad intercrystalina, es decir, en volúmenes mesoporosos huecos, estables y ordenados, delimitada por la aglomeración de nanocristales, a diferencia de la (micro)porosidad intrínseca a la estructura cristalina de un MOF, lo que le confiere al procedimiento de obtención de la invención sus considerables ventajas técnicas.

El documento de Sánchez-Sánchez *et al.* (Green Chem. 2015, 17, 1500) de los propios inventores, reivindica un procedimiento de preparación de MOFs, que se preparan en agua y a temperatura ambiente utilizando sales como fuente de los ligandos orgánicos o, en su defecto, de la forma protonada de los correspondientes ligandos orgánicos previamente desprotonada por la acción de una base. Estos MOFs, que son los que se usan como base en la presente invención, se caracterizan por carecer de poros intercrystalinos

suficientemente grandes para encapsular biomoléculas del tamaño de las enzimas. Además, los cristales que forman estos materiales son nanocristalinos con una gran tendencia a aglomerarse o agregarse entre sí en el medio de reacción, dando lugar a partículas lo suficientemente compactas como para poder considerarse no disgregables en sus cristales o dominios cristalinos, y que contienen mesoporos entre los cristales, lo que potencialmente cubre los tamaños requeridos para albergar un amplio rango de enzimas en su interior.

En la presente invención por “mesoporosidad intercrystalina” se entiende la presencia en el MOF de al menos un, y preferentemente más de uno, volumen hueco intercrystalino, estable, ordenado y en el rango de los mesoporos, que se establece entre partículas formadas por aglomeración o agregación de cristales o dominios de partículas nanoporosas de tamaño homogéneo, lo suficientemente compactas como para poder considerarse no disgregables en sus cristales o dominios cristalinos.

Según la clasificación de la IUPAC y en el contexto de esta patente, se entiende por mesoporo todo volumen hueco en un material cuyo diámetro está comprendido entre 2 y 50 nm, que preferentemente tendrán una distribución de poro que se ajuste a las dimensiones de la enzima a inmovilizar (en el caso de la β -glucosidasa con valores cercanos a 10 nm). A los poros por debajo de 2 nm se les denomina microporos.

La mesoporosidad intercrystalina en partículas sólidas, a diferencia de la porosidad intrínseca a la estructura cristalina, es la generada por la aglomeración o agregación de cristales. Por tanto, tiene una distribución de poro mucho más ancha que la intrínseca y, más importante, está bajo control experimental pues depende de la modificación de las condiciones de preparación del MOF, y por lo tanto, puede cubrir la totalidad de los tamaños requeridos para albergar cualquier tipo de enzima en su interior.

Por “biocatalizador” se entiende el sólido que se sintetiza en la etapa a) y que se aísla en la etapa b) del procedimiento de obtención de la invención, y que es un material compuesto que comprende, un soporte MOF y al menos una enzima, que se inmoviliza en la mesoporosidad intercrystalina del MOF durante la síntesis total o parcial del mismo.

Por “MOF o material metalo-orgánico” se entiende un material híbrido orgánico-inorgánico en el que átomos metálicos o metaloides o clústeres de esos átomos se enlazan entre sí a

través de ligandos orgánicos, al menos bidentados, para dar lugar a redes cristalinas tridimensionales porosas. El método es aplicable a cualquier MOF preparado con ligandos orgánicos que contienen preferentemente grupos carboxílicos a través de los que se coordina a los metales. Preferentemente, los materiales MOF usados son el MIL-53(Al), su
 5 homólogo estructural NH₂-MIL-53(Al) y el Mg-MOF-74, todos ellos de pequeño tamaño de partícula. En los dos primeros casos, los átomos metálicos que forman en MOF son Al (como Al³⁺) y los ligandos orgánicos son tereftalato o 2-amino-tereftalato, respectivamente. En el caso del Mg-MOF-74, el metal es Mg (con carga formal 2+) y el ligando es 2,5-dihidroxitereftalato.

10

Por “inmovilización” se entiende, en este documento, la sujeción de al menos una enzima, y preferentemente más de una, preferentemente en la mesoporosidad intercristalina del material MOF, y que se favorece frente a otras como el embebimiento. Por “embebimiento” se entiende la inmovilización de la enzima al ser atrapada por cristales de MOF en el
 15 proceso de crecimiento cristalino, de forma que en el biocatalizador final queda accesible únicamente a través de los (micro)poros intrínsecos del MOF.

20

Preferentemente, la síntesis del MOF de la etapa a) del procedimiento de obtención de la invención comprende la mezcla, en presencia de al menos una enzima, de dos disoluciones, una primera disolución o disolución de una fuente metálica, que preferentemente tiene un pH ácido, y otra segunda disolución o disolución del ligando orgánico.

25

En el ámbito de la invención por “primera disolución o disolución de fuente metálica” se entiende una disolución de una sal metálica, preferentemente en un disolvente polar como el
 agua. Ejemplos de disolución de fuente metálica que se incluyen en el ámbito de la invención son una disolución acuosa de una sal de aluminio, o una disolución de una sal de magnesio en N,N-dimetilformamida, y preferentemente disoluciones de nitrato de aluminio nonahidratado o de acetato de Mg tetrahidratado.

30

Por “segunda disolución o disolución de ligando orgánico” se entiende una disolución de la fuente de ligando orgánico, ya sea una sal o el ácido, en un disolvente preferentemente en un disolvente polar como el agua. Si se usa el ácido como fuente orgánica en agua se necesita un agente desprotonante. Ejemplos de disolución de ligando orgánico que se incluyen en el ámbito de la invención son disolución acuosa de ligandos orgánicos que

contienen al menos dos grupos de ácidos carboxílicos por molécula y preferentemente ácido 2-aminotereftálico o ácido 2,5-dihidroxitereftálico.

5 El procedimiento de obtención de la invención se puede lleva a cabo utilizando disoluciones acuosas, disoluciones orgánicas o disoluciones que son mezcla acuosas-orgánicas.

Preferentemente, la segunda disolución se selecciona entre una disolución acuosa de una sal de ligando orgánico o un ligando orgánico protonado en presencia de un agente desprotonante, con un pH (preferentemente neutro o básico) que al menos garantice la
10 desprotonación o activación de dos grupos funcionales que se han de coordinar posteriormente a metales para formar los materiales MOF.

Por su parte, el agente desprotonante se selecciona, preferentemente, de entre una base fuerte, una base media o una base débil. Ejemplos de base fuerte que se incluyen en el
15 ámbito de la invención son los hidróxidos alcalino y preferentemente el hidróxido de sodio. Ejemplos de base media que se incluyen en el ámbito de la invención son las aminas, preferentemente la trietilamina. Ejemplo de base débil que se incluyen en el ámbito de la invención es el hidróxido de amonio o amoniaco.

20 Por “enzima” se entiende cualquier molécula de naturaleza proteica que cataliza reacciones químicas. Puede ser inmovilizada, y el biocatalizador puede ser utilizado en el ámbito de la industria (química, farmacéutica o alimentaria, entre otras), preferentemente respecto a la enzima soluble. Ejemplos de enzimas que pueden utilizarse en la invención son cualquiera de las enzimas existentes en la naturaleza, con muy diversas actividades catalíticas.
25 Preferentemente, la enzima es β -glucosidasa.

El procedimiento de la invención prefiere temperatura entre 4 y 70 °C, y preferentemente entre 20 y 30 °C, es decir aquellas demandadas por las enzimas para conservar su estructura y, por ende, su actividad catalítica.
30

La enzima se añade en el transcurso de la síntesis del MOF según la etapa a) del procedimiento de obtención de la invención, una vez que las dos disoluciones se han mezclado, para evitar las condiciones que le puedan ser adversas. Sin embargo, también es posible añadir la enzima sobre cualquiera de las dos disoluciones atendiendo a que la

viabilidad de la enzima (especialmente actividad catalítica) se resienta lo menos posible, es decir, preferentemente, la enzima se añade sobre la disolución cuyo pH esté más próximo a la estabilidad enzimática, que vaya a sufrir menos cambios (abruptos) de pH o que no contengan especies químicas que puedan favorecer la desnaturalización de la enzima o la inactivación de sus centros activos. La enzima se añade en cualquiera de los formatos conocidos en el estado de la técnica, y preferentemente como una disolución acuosa procedente de un extracto, que puede comprender otras sustancias químicas. Esas sustancias químicas o la propia enzima pueden afectar diferentes aspectos de la síntesis del MOF, tales como el tamaño de partícula (y, por tanto, de los poros intercrystalinos), la cinética del proceso o la presencia o abundancia de impurezas formadas, o la actividad catalítica de la enzima inmovilizada.

Preferentemente, una de las disoluciones que se utilizan para la síntesis del MOF según la etapa a) del procedimiento de obtención de la invención se añade gota a gota sobre la otra, manteniendo el sistema bajo agitación. Esta adición conlleva la formación de un sólido bien sea durante el transcurso de la adición o tras un tiempo que puede llegar a alcanzar desde 1 segundo hasta las 350 h. El sólido formado es el biocatalizador, que comprende parte o la totalidad de la enzima, y se separa de la mezcla de reacción en la etapa b) del procedimiento de obtención de la invención preferentemente por centrifugación o por filtración tras un tiempo, comprendido entre 1 segundo y 200 horas después de terminar la adición de una disolución sobre la otra.

El procedimiento de obtención de la invención incluye la posibilidad de utilización simultánea de distintas enzimas. Así por ejemplo, es factible emplear más de una clase distinta de enzima de las que se citan en este documento.

Alternativamente, el procedimiento de obtención de la invención comprende una etapa adicional o etapa c) que comprende el secado del sólido aislado según la etapa b) bajo condiciones compatibles con la conservación de la estructura y propiedades de la enzima incluyendo la actividad catalítica.

En una realización particular del procedimiento de obtención de la invención, la disolución de la fuente metálica es una disolución acuosa de nitrato de aluminio noahidratado, la disolución del ligando orgánico es una disolución acuosa de ácido 2-aminotereftálico, el agente desprotonante se selecciona entre trietilamina, hidróxido sódico y amoníaco, la

enzima es β -glucosidasa de *Aspergillus niger* que se añade sobre la disolución del ligando orgánico y la temperatura de reacción es 25 °C.

5 En otra realización particular del procedimiento de obtención de la invención, la disolución de la fuente metálica es una disolución de acetato de Mg tetrahidratado sobre N,N-dimetilformamida, la disolución del ligando orgánico es una disolución ácido 2,5-dihidroxitereftálico sobre N,N-dimetilformamida, la enzima es β -glucosidasa de *Aspergillus niger* que se añade sobre la disolución de la fuente metálica y la temperatura de reacción es 25 °C. En esta realización, se consigue la estabilización de la estructura de la enzima y el
10 mantenimiento de su actividad catalítica durante 48 horas, mientras que la misma enzima en estado libre en el mismo reactivo es completamente inactiva tras pocos minutos.

Adicionalmente, el procedimiento de obtención de la invención puede comprender otra etapa en la que el sólido aislado según la etapa b) o secado según la etapa c) se expone
15 nuevamente a al menos una enzima, para incrementar la carga enzimática del mismo utilizando un procedimiento de inmovilización post-síntesis, ya que en el procedimiento de inmovilización in-situ las enzimas podrían hacer de agente mesoporógeno, creando mesoporos de mayor tamaño.

20 El efecto técnico conseguido en los biocatalizadores obtenidos por el procedimiento de obtención de la invención queda de manifiesto a través de las técnicas de caracterización físico-química y bioquímica que se recogen en los Ejemplos 1 a 6, singularmente en lo referente a la alta cantidad de enzima inmovilizada, a la alta capacidad de retención de la enzima y la reducción de la merma de la eficiencia catalítica con respecto a la de la
25 biomolécula sin inmovilizar. La alta eficiencia de inmovilización enzimática se basa en el hecho de que la formación del material MOF se da preferentemente por la formación instantánea de una disolución coloidal al mezclarse la disolución metálica y la disolución de ligando orgánico, como consecuencia del gran número de núcleos de MOFs que precipitan o cristalizan al encontrarse el catión metálico y el anión orgánico. Precisamente por estar tan
30 favorecida la nucleación, los núcleos son abundantes y apenas crecen porque el metal y el ligando orgánico se agotan en la formación del resto de núcleos, formándose así nanopartículas en suspensión con aspecto de coloide. El posterior aislamiento del sólido de la disolución preferentemente por centrifugación, hace que la enzima también se recupere en el sólido, lo que unido a la afinidad entre la biomolécula y el material MOF puede dar

altas cargas de biomoléculas inmovilizadas, de hasta el 100 % de la enzima presente en el medio.

En un segundo y último aspecto, la invención se refiere al biocatalizador directamente obtenido por el procedimiento de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL CONTENIDO DE LAS FIGURAS

Figura 1. Difractogramas de rayos X de polvo normalizados de la muestra de $\text{NH}_2\text{-MIL-53(Al)}$ (gris) y del biocatalizador $\beta\text{-Glu@NH}_2\text{-MIL-53(Al)-NaOH-24h}$ (negro).

Figura 2. Termogramas (líneas sólidas) y sus derivadas (líneas discontinuas) del extracto de enzima soluble de $\beta\text{-Glu}$ (gris claro), del material MOF $\text{NH}_2\text{-MIL-53(Al)}$ preparado en ausencia de enzima (gris), y del biocatalizador $\beta\text{-Glu@NH}_2\text{-MIL-53(Al)-NaOH-24h}$ (negro).

Figura 3. Difractogramas de rayos X de polvo normalizados de la muestra de $\text{NH}_2\text{-MIL-53(Al)}$ (gris) y del biocatalizador $\beta\text{-Glu@NH}_2\text{-MIL-53(Al)-TEA-48h}$ (negro).

Figura 4. Termogramas (líneas sólidas) y sus derivadas (líneas discontinuas) del extracto de enzima soluble de $\beta\text{-Glu}$ (gris) y del biocatalizador $\beta\text{-Glu@NH}_2\text{-MIL-53(Al)-TEA-48h}$ (negro).

Figura 5. Difractogramas de rayos X de polvo normalizados de los biocatalizadores $\beta\text{-Glu@NH}_2\text{-MIL-53(Al)-NH}_3\text{-1h}$ (gris) y -24h (negro).

Figura 6. Termogramas (líneas sólidas) y sus derivadas (líneas discontinuas) del extracto de enzima soluble de $\beta\text{-Glu}$ (gris) y del biocatalizador $\beta\text{-Glu@NH}_2\text{-MIL-53(Al)-NH}_3\text{-24h}$ (negro).

Figura 7. Difractogramas de rayos X de polvo normalizados del material Mg-MOF-74 (gris) y del biocatalizador $\beta\text{-Glu@Mg-MOF-74-24h}$ (negro).

Figura 8. Gel de electroforesis de: 1) referencia de alto peso molecular; 2) extracto soluble de la enzima $\beta\text{-Glu}$; 3) biocatalizadores $\beta\text{-Glu@NH}_2\text{-MIL-53(Al)-NaOH-1h}$; 4) $\beta\text{-Glu@NH}_2\text{-MIL-53(Al)-NaOH-24h}$; 5) $\beta\text{-Glu@NH}_2\text{-MIL-53(Al)-TEA-2h}$; 6) $\beta\text{-Glu@NH}_2\text{-MIL-53(Al)-TEA-24h}$.

48h; 7) β -Glu@Mg-MOF-74-2h; 8) β -Glu@Mg-MOF-74-24h; 9) β -Glu@NH₂-MIL-53(Al)-NH₃-1h; y 10) β -Glu@NH₂-MIL-53(Al)-NH₃-24h.

Figura 9. Gel de electroforesis de: 1) referencia de alto peso molecular; 2) extracto soluble de la enzima β -Glu; 3) biocatalizador β -Glu@Mg-MOF-74-5min; 4) β -Glu@Mg-MOF-74-20h.

Figura 10. Esquema de la reacción test catalítica de hidrólisis de pNPG en presencia de la enzima β -glucosidasa.

10 MODOS DE REALIZACION DE LA INVENCION

Ejemplo 1. Procedimiento de obtención de un biocatalizador β -Glu@NH₂-MIL-53(Al)-NaOH-24h, que comprende la síntesis del sistema NH₂-MIL-53(Al) utilizando NaOH como agente desprotonante y en presencia de la enzima β -Glucosidasa

En este ejemplo se muestra como obtener un biocatalizador inmovilizando la enzima β -glucosidasa de *Aspergillus niger* (β -glu) durante la formación del sistema MOF NH₂-MIL-53(Al) en el que se utilizó como base hidróxido sódico (NaOH). La enzima β -Glucosidasa de *Aspergillus niger* presenta unas dimensiones aproximadas de ~12,3 nm x ~10.7 nm x ~8,1 nm, un peso molecular ~240 KDa, y un punto isoeléctrico 4,2.

La primera disolución se preparó con 2,005 g de nitrato de aluminio noahidratado (Al(NO₃)₃·9H₂O) (fuente metálica) y 6,012 g de agua desionizada, dando un pH de 2,0. Por otro lado, la segunda disolución se preparó con 0,483 g del ligando orgánico ácido 2-aminotereftálico NH₂-H₂BDC, 5,206 g de disolución 1 M de NaOH y 10,462 g de agua desionizada, dando una disolución clara en pocos minutos con un pH de 6,1. A continuación, sobre la segunda disolución se añadieron 2,75 ml de extracto enzimático de β -Glucosidasa (EC 3.2.1.21) de Novozymes, suministrada como preparación enzimática líquida (Novozym 188), con una concentración del extracto de β -Glucosidasa medida mediante análisis Bradford de 14,54 mg/ml, lo que modificó el pH hasta 5,6. Seguidamente, la primera disolución se añadió sobre la segunda disolución, bajo agitación, lo que provocó la formación de un sólido amarillento en suspensión prácticamente de inmediato y a temperatura ambiente (25 °C), dando un pH de 3,1. Al cabo de un tiempo que osciló entre 1 y 24 horas, se tomaron diferentes alícuotas (suspensión), de las que se separó el

biocatalizador denominado β -Glu@NH₂-MIL-53(Al)-NaOH-*nh*, del sobrenadante (disolución) por centrifugación (13.400 rpm durante 90 segundos).

Se midió la actividad catalítica tanto de la suspensión como del sobrenadante en la hidrólisis de para-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido (pNPG) 10 mM disuelto en tampón ácido fosfórico / citrato trisódico 0,1 M pH 5,0, para dar p-nitrofenol y beta-D-glucosa. La actividad catalítica se midió por espectrofotometría a 405 nm, con un espectrofotómetro diodo array (Agilent 8453 UV-Vis) provisto de termostatación y de un dispositivo de agitación magnética para mantener las muestras en suspensión homogénea durante los ensayos. La actividad enzimática se midió en todo caso por el aumento de absorbancia por minuto a 405 nm producido por la liberación de p-nitrofenol debida a la acción de la enzima β -glucosidasa (Figura 10) a 35 °C y a un pH de 5,0. Para ello, sobre las cubetas de ensayo conteniendo 1,5 ml de tampón a pH 5,0 y 0,5 ml de pNPG 10 mM, se añadieron 100 μ l de enzima soluble o 100 μ l de la suspensión, o 100 μ l del sobrenadante o 100 μ l de una resuspensión de β -glucosidasa inmovilizada. El coeficiente de extinción molar del p-nitrofenol medido en estas condiciones fue de 240 M⁻¹·cm⁻¹.

Cuando la actividad catalítica de los sobrenadantes obtenidos a partir de alícuotas tomadas a diferentes tiempos se mantuvo constante o nula, se dio por finalizado el proceso de inmovilización de la enzima. La concentración de enzima no inmovilizada presente en el sobrenadante así como en la disolución enzimática inicial se determinaron mediante análisis Bradford.

Una vez finalizado el seguimiento de la inmovilización (tras 24 horas), el sólido restante se filtró a vacío utilizando una placa Vidra FOC (666/1) de tamaño de poro 4 y papel de filtro Millipore 0,45 μ m HV. El biocatalizador obtenido una vez seco, pesado y molido, se resuspendió (10 mg en 5 mL de buffer) y se ensayó su actividad catalítica en la misma reacción anteriormente indicada.

En la Tabla 1 se muestra el porcentaje de enzima β -Glu inmovilizada, determinada mediante análisis de Bradford midiendo la concentración de proteína inicial en la disolución enzimática y de proteína en el sobrenadante al cabo de 1 y 24 horas. Al cabo de 1 h, se inmovilizó el 33 % de la enzima presente en el medio, mientras que al cabo de 24 h se inmovilizó el 96 % de la enzima. Estos porcentajes de inmovilización enzimática evolucionaron en paralelo con la

presencia de la fase NH₂-MIL-53(Al) en el sólido recuperado, que con el tiempo fue creciendo progresivamente en detrimento de la fase correspondiente al ligando orgánico protonado (Sánchez-Sánchez *et al.*, Green Chem. 2015, 17, 1500), lo que evidenció que es la fase MOF y no la fase puramente orgánica la que contribuye a la inmovilización de la enzima.

Tabla 1. Porcentajes de inmovilización (por análisis Bradford); carga enzimática, actividad catalítica y eficiencia catalítica (por espectrofotometría); y contenido de azufre (por análisis químico elemental CHNS) de los biocatalizadores β-Glu@NH₂-MIL-53(Al)-NaOH-1h y -24h.

Muestra ^a	Enzima inmovilizada (%) ^b / S ^d (%)	Carga enzimática (mg/g) ^c	Actividad catalítica ^e	Eficiencia catalítica ^f
1 h	33 / 28	— ^g	6	0,21
24 h	96 / 79	0,14	31	0,39

^a La muestra se designa como *nh* (número de horas de síntesis) del biocatalizador β-Glu@NH₂-MIL-53(Al) -NaOH-*nh*.

^b Porcentaje de enzima inmovilizada en el sólido frente al total de enzima añadido.

^c mg de enzima por g de biocatalizador.

^d Porcentaje de S en la muestra según análisis elemental CHNS.

^e Actividad catalítica (expresada en unidades de actividad U por g de biocatalizador y calculada según la ecuación 2), en la hidrólisis de para-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido liberando paranitrofenol.

^f Eficiencia catalítica (expresada en unidades de actividad U por mg de enzima y calculada según la ecuación 3) en la hidrólisis de para-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido liberando paranitrofenol.

^g No medido.

La carga enzimática (Tabla 1) se determinó a partir de los miligramos de proteína en el medio de síntesis (calculada a partir de análisis Bradford) y de los gramos de biocatalizador obtenido después de filtrar la disolución final de síntesis. Se expresa como mg de proteína/g de biocatalizador recuperado. La presencia de enzima en el biocatalizador también se detectó cualitativamente mediante análisis químico elemental CHNS (Tabla 1), que da los contenidos de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre. Estos análisis se llevaron a cabo en

un equipo Analizador Elemental LECO CHNS-932. La presencia/ausencia de azufre en el biocatalizador es particularmente informativa por formar parte de la enzima y no del material MOF estudiado. En buen acuerdo con lo estimado a partir del método Bradford, en el biocatalizador β -Glu@NH₂-MIL-53(Al)-NaOH-24h el contenido de azufre fue 0,14%.

5

Adicionalmente, la Tabla 1 también muestra la actividad catalítica (expresada en U/g biocatalizador) y la eficiencia catalítica (en U/mg de proteína) del biocatalizador obtenido tras ser resuspendido y calculadas a partir de las ecuaciones 2 y 3 siguientes, respectivamente.

$$A \text{ (U/mL)} = \frac{\text{pte } (\Delta\text{Abs/min}) * V_{\text{cubeta}} \text{ (mL)} * 1000}{\epsilon \text{ (M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) * V_{\text{aliquota enzima}} \text{ (mL)}} \quad (\text{Ec. 1})$$

10

$$A \text{ (U/g biocat)} = \frac{A \text{ (U/mL)}}{g \text{ biocat/mL}} \quad (\text{Ec. 2})$$

15

$$A \text{ (U/mg prot)} = \frac{A \text{ (U/g biocat)}}{\text{Carga enzimática (mg prot/g soportes)}} \quad (\text{Ec. 3})$$

donde U son las unidades de actividad catalítica de la enzima definidas como transformación de 1 μ mol de sustrato por minuto.

20 Por otra parte, el biocatalizador β -Glu@NH₂-MIL-53(Al)-NaOH-24h obtenido, una vez seco, se caracterizó con diversas técnicas físico-químicas, tales como la difracción de rayos X de polvo usando un difractómetro de rayos X Policristal X'Pert Pro PANalytical, para su identificación estructural. La Figura 1 compara los difractogramas de rayos X de polvo del biocatalizador β -Glu@NH₂-MIL-53(Al)-NaOH-24h y del MOF homólogo en ausencia de
25 enzima. El difractograma del material que no contuvo enzima es el típico de un NH₂-MIL-53(Al) nanocristalino preparado a temperatura ambiente (Sánchez-Sánchez *et al.*, Green Chem. 2015, 17, 1500). La adición del extracto enzimático hizo que aparecieran algunos picos estrechos e intensos, que se han atribuido al ligando protonado NH₂-H₂BDC, en consonancia con la bajada del pH que provoca esa adición en la mezcla global. La
30 nanocristalinidad es condición indispensable para que las partículas formadas por su agregación contengan porosidad intercrystalina en el rango de los mesoporos.

Finalmente, también se registró el termograma (TGA) y se calculó su derivada (DTG) del MOF NH₂-MIL-53(Al) sin enzima, del biocatalizador β -Glu@NH₂-MIL-53(Al)-NaOH-24h y del extracto de la enzima β -Glu, en un equipo Perkin-Elmer TGA7 con un barrido de temperaturas de 20-900 °C a una velocidad de calentamiento de 20 °C/min bajo corriente de aire seco, y su derivada (DTG) se presenta en la Figura 2.

Hubo un 2,9 % de pérdida de peso (190-271 °C) en el extracto enzimático asignado a la enzima. En el biocatalizador β -Glu@NH₂-MIL-53(Al)-NaOH-24h, se detectó una pérdida global de peso de un 88 %; en el intervalo de temperaturas entre 152-246 °C la pérdida de peso fue del 9,5 %, mientras que en el MOF sin enzima no se produjo una pérdida de peso apreciable en ese intervalo, lo que sugiere la presencia de enzima en el biocatalizador.

Ejemplo 2. Procedimiento de obtención del biocatalizador β -Glu@NH₂-MIL-53(Al)-TEA-48h, que comprende la síntesis del sistema NH₂-MIL-53(Al) utilizando TEA como agente desprotonante y en presencia de la enzima β -Glucosidasa

En este experimento se muestra como obtener un biocatalizador inmovilizando la misma enzima β -Glucosidasa de *Aspergillus niger* utilizada en el Ejemplo 1, durante la formación de un sistema MOF NH₂-MIL-53(Al) en el que se utiliza como base trietilamina (TEA).

La primera disolución se preparó con 2,000 g de nitrato de aluminio noahidratado (Al(NO₃)₃·9H₂O) (fuente metálica) y 6,030 g de agua desionizada, dando un pH de 2,0. Por otro lado, la segunda disolución se preparó con 0,483 g del ligando orgánico ácido 2-aminotereftálico NH₂-H₂BDC, 0,538 g de TEA y 13,246 g de agua desionizada, dando una disolución clara en pocos minutos con un pH de 6,1. A continuación, sobre la segunda disolución se añadieron 2,75 mL de extracto enzimático de β -Glucosidasa (EC 3.2.1.21) de Novozymes, suministrada como preparación enzimática líquida (Novozym 188), con una concentración del extracto de β -Glucosidasa medida mediante análisis Bradford de 14,54 mg/ml, lo que modificó el pH de la mezcla hasta 5,5. Seguidamente, la primera disolución se añadió gota a gota sobre la segunda disolución, bajo agitación, lo que provocó la formación de un sólido amarillento en suspensión prácticamente de inmediato y a temperatura ambiente (25 °C), dando un pH de 3,1. Al cabo de un tiempo que osciló entre 5 minutos y 48 horas, se tomaron diferentes alícuotas (suspensión), de las que se separó el biocatalizador

denominado β -Glu@NH₂-MIL-53(Al)-TEA-*nh*, del sobrenadante (disolución) por centrifugación(13.400 rpm durante 90 segundos).

Se midió la actividad catalítica, siguiendo los mismos pasos experimentales descritos en el ejemplo 1 anterior, excepto que los tiempos de toma de muestra fueron 2 y 48 horas, respectivamente, para los biocatalizadores β -Glu@NH₂-MIL-53(Al)-TEA-2h y -48h.

El uso de TEA como agente desprotonador del ligando orgánico del MOF también resultó en una inmovilización eficiente de la enzima β -Glu (el 99 % de la enzima expuesta al cabo de 48 horas se ha encapsulado). La eficiencia catalítica del biocatalizador resultante (0,87 U/mg de enzima) (Tabla 2), fue significativamente superior a la obtenida en el biocatalizador β -Glu@NH₂-MIL-53(Al)-NaOH-24h (0,39 U/mg de enzima, Tabla 1), lo que sugiere que bases más débiles se prefieren a bases fuertes en la desprotonación del ligando orgánico del MOF cuando se procede a la inmovilización in-situ de la enzima, presumiblemente por la repercusión negativa que estas bases puedan tener en la actividad intrínseca de la enzima.

En buen acuerdo con lo estimado a partir del método Bradford, el contenido de azufre en el biocatalizador β -Glu@NH₂-MIL-53(Al)-TEA-48h fue casi cinco veces superior al de su homólogo β -Glu@NH₂-MIL-53(Al)-TEA-2h (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentajes de inmovilización (por análisis Bradford); carga enzimática, actividad catalítica y eficiencia catalítica (por espectrofotometría); y contenido de azufre (por análisis químico elemental CHNS) de los biocatalizadores β -Glu@NH₂-MIL-53(Al)-TEA-2h y β -Glu@NH₂-MIL-53(Al)-TEA-48h.

Muestra ^a	Enzima inmovilizada (%) ^b / Carga enzimática (mg/g) ^c	S ^d (%)	Actividad catalítica ^e	Eficiencia catalítica ^f
2h	17 / 18	0,04	40	2,22
48h	99 / 108	0,16	94	0,87

^a La muestra se designa como *nh* (número de horas de síntesis) del biocatalizador β -Glu@NH₂-MIL-53(Al)-TEA-*nh*.

^b Porcentaje de enzima inmovilizada en el sólido frente al total de enzima añadido.

^c mg de enzima por g de biocatalizador.

^d Porcentaje de S en la muestra según análisis elemental CHNS.

^e Actividad catalítica (expresada en unidades de actividad U por g de biocatalizador y calculada según la ecuación 2 del Ejemplo 1), en la hidrólisis de para-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido liberando paranitrofenol

5 ^f Eficiencia catalítica (expresada en unidades de actividad U por mg de enzima y calculada según la ecuación 3 del Ejemplo 1) en la hidrólisis de para-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido liberando paranitrofenol

La Figura 3 compara los difractogramas de rayos X de polvo del biocatalizador β -Glu@NH₂-MIL-53(Al)-TEA-48h y del MOF homólogo obtenido en ausencia de enzima en el medio de síntesis, NH₂-MIL-53(Al). Se puede apreciar que la presencia de la enzima β -Glu introdujo cambios en la naturaleza cristalina de la fase MOF formada, de manera que el difractograma obtenido es el típico de un NH₂-MIL-53(Al) nanocristalino (Sánchez-Sánchez *et al.*, Green Chem. 2015, 17, 1500), con alguna impureza de ligando orgánico protonado. Puesto que el difractograma del biocatalizador es muy similar al del material MOF sin enzima, particularmente en términos de anchura de las bandas, su tamaño de cristal debe ser también muy similar y, por tanto, su mesoporosidad intercristalina.

Finalmente, también se determinó el termograma (TGA) y su derivada (DTG) del biocatalizador β -Glu@NH₂-MIL-53(Al)-TEA-48h y del extracto de la β -Glu, que se presenta en la Figura 4. En la curva TGA del extracto enzimático, se pueden diferenciar dos pérdidas de peso globales: la primera entre 30 y 190 °C (87,1 %), que se atribuye al agua, y la segunda entre 190 y 271 °C (2,9 %), que se atribuye a la enzima. En el termograma del biocatalizador β -Glu@NH₂-MIL-53(Al)-TEA-48h, se detecta la pérdida de peso que se produjo entre 166 y 242 °C (7 %), que por analogía con el del extracto enzimático, se asigna a la pérdida de la enzima.

Ejemplo 3. Procedimiento de obtención del biocatalizador β -Glu@NH₂-MIL-53(Al)-NH₃-24h, que comprende la síntesis del sistema NH₂-MIL-53(Al) utilizando NH₃ como agente desprotonante y en presencia de la enzima β -Glucosidasa

En este experimento se muestra como obtener un biocatalizador inmovilizando la misma enzima β -Glucosidasa de *Aspergillus niger* de los ejemplos anteriores, durante la formación de un sistema MOF NH₂-MIL-53(Al) en el que se utiliza como base NH₃.

La primera disolución se preparó con 2,041 g de nitrato de aluminio nonahidratado ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) (fuente metálica) y 6,023 g de agua desionizada. Por otro lado, la segunda disolución se preparó con 0,482 g del ligando orgánico ácido 2-aminotereftálico $\text{NH}_2\text{-H}_2\text{BDC}$, 0,362 g de disolución acuosa de NH_3 al 25 % y 10,008 g de agua desionizada. La mezcla a temperatura ambiente (25 °C) tardó varias horas en alcanzar la disolución, que finalmente fue anaranjada. A continuación se añadieron 2,75 ml de extracto enzimático (concentración = 14,54 mg enz/ml) sobre la segunda disolución y después se añadió la primera disolución sobre la mezcla de la segunda disolución y la enzima.

Al cabo de una hora, se tomó una muestra, que se centrifugó a 13400 rpm durante 90 segundos. Se separó el sobrenadante para medir su actividad enzimática y la concentración de proteínas mediante análisis Bradford de igual forma que en los ejemplos anteriores. El sólido restante se filtró a vacío, obteniendo el sólido seco que se etiquetó como $\beta\text{-Glu@NH}_2\text{-MIL-53(Al)-NH}_3\text{-1h}$, se pesó, se molió y se resuspendió para medir su actividad enzimática. Al cabo de 24 h se centrifugó el resto de la muestra y se filtró a vacío. Se separó el sobrenadante, y el sólido seco se etiquetó como $\beta\text{-Glu@NH}_2\text{-MIL-53(Al)-NH}_3\text{-24h}$.

En este caso la eficiencia catalítica de los biocatalizadores $\beta\text{-Glu@NH}_2\text{-MIL-53(Al)-NH}_3\text{-nh}$ superó la de cualquier otro biocatalizador descrito en los ejemplos anteriores, lo que de nuevo sugiere que bases menos fuertes (el amoníaco es menos fuerte que la amina TEA) afecta menos a la actividad intrínseca de la enzima.

Tabla 3. Porcentajes de inmovilización (por análisis Bradford); carga enzimática, actividad catalítica y eficiencia catalítica (por espectrofotometría); y contenido de azufre (por análisis químico elemental CHNS) de los biocatalizadores $\beta\text{-Glu@NH}_2\text{-MIL-53(Al)-NH}_3\text{-1h}$ y -24h .

Muestra ^a	Enzima inmovilizada (%) ^b / S ^d (%)	Carga enzimática (mg/g) ^c	Actividad catalítica ^e	Eficiencia catalítica ^f
1h	- / - ^g	- ^g	18	0,03
24h	98 / 56	0,13	51	0,91

^a La muestra se designa como *nh* (número de horas de síntesis) del biocatalizador $\beta\text{-Glu@NH}_2\text{-MIL-53(Al)-NH}_3\text{-nh}$.

^b Porcentaje de enzima inmovilizada en el sólido frente al total de enzima añadido.

^c mg de enzima por g de biocatalizador.

^d Porcentaje de S en la muestra según análisis elemental CHNS.

^e Actividad catalítica (expresada en unidades de actividad U por g de biocatalizador y calculada según la ecuación 2 del Ejemplo 1), en la hidrólisis de para-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido liberando paranitrofenol.

^f Eficiencia catalítica (expresada en unidades de actividad U por mg de enzima y calculada según la ecuación 3 del Ejemplo 1) en la hidrólisis de para-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido liberando paranitrofenol.

^g No medido.

La Figura 5 muestra los difractogramas de rayos X de los biocatalizadores β -Glu@NH₂-MIL-53(Al)-NH₃-1h y -24h. En los dos difractogramas se identifican dos fases: la correspondiente a un NH₂-MIL-53(Al) nanocristalino con mesoporosidad intercristalina y la del ligando orgánico NH₂-H₂BDC. Como ocurre en los ejemplos anteriores, la fase NH₂-MIL-53(Al) fue aumentando en detrimento de la NH₂-MIL-53(Al) con el tiempo de síntesis.

Por su parte, la Figura 6 muestra los perfiles termogravimétricos (TG) del biocatalizador β -Glu@NH₂-MIL-53(Al)-NH₃-24h y el extracto enzimático de β -glucosidasa. En el biocatalizador, hay una pérdida global de peso de un 88 %; en el intervalo de temperaturas entre 187-278 °C la pérdida de peso es del 18,2 %.

La secuencia de los ejemplos experimentales 1, 2 y 3 pone de manifiesto cómo el cambio de la naturaleza de la base usada para desprotonar el ligando orgánico ácido 2-amino-terftálico (NH₂-H₂BDC), que forma el MOF NH₂-MOF-53(Al) nanocristalino a temperatura ambiente y en agua por simple contacto con una disolución acuosa de Al, afecta a la eficiencia de inmovilización de la enzima β -Glucosidasa de *Aspergillus niger*. No menos importante, también afecta a la actividad catalítica por unidad enzimática inmovilizada, presumiblemente como consecuencia de la influencia de estos parámetros en las propiedades físico-químicas del soporte MOF tales como superficie específica, tamaño y distribución de los poros intercristalinos, o tamaño de los aglomerados o agregados de los nanocristales.

Ejemplo 4. Procedimiento de obtención del biocatalizador β -Glu@Mg-MOF-74-24h, que comprende la síntesis del sistema Mg-MOF-74 utilizando N,N-dimetilformamida como disolvente y en presencia de la enzima β -Glucosidasa.

5 En el presente experimento se muestra como obtener un biocatalizador inmovilizando la enzima β -Glu durante la formación del sistema MOF-74 nanocristalino preparado con Mg a temperatura ambiente (25 °C) en N,N-dimetilformamida (DMF) como disolvente, y que en ausencia de enzima contiene una aceptable mesoporosidad ordenada (Díaz-García *et al.*, Cryst. Growth Des., 2014, 14, 2479).

10 Para obtener la primera disolución se añadieron 0,561 g de acetato de Mg tetrahidratado sobre 10,013 g de DMF, que se disolvieron en pocos minutos. Por otro lado, para obtener la segunda disolución se disolvieron 0,202 g de ácido 2,5-dihidroxitereftálico (dhtp) en 10,021 g de DMF. Sobre la primera disolución se añadió 0,5 ml del mismo extracto enzimático
15 conteniendo β -Glu en una concentración de 14,54 mg enzima/ml de los ejemplos anteriores, e inmediatamente la segunda disolución gota a gota. Se tomó una muestra a las 2 horas y se centrifugó durante 15 segundos a 12.500 rpm obteniendo así el sobrenadante. El sólido se filtró a vacío y se etiquetó como β -Glu@Mg-MOF-74-2h. La reacción se prolongó durante 24 horas, tras la que se recuperó según el mismo procedimiento el biocatalizador sólido β -
20 Glu@Mg-MOF-74-24h.

En este caso no se añadió ninguna base porque no se necesitó la previa desprotonación del ligando orgánico para la formación del MOF-74 a temperatura ambiente (Díaz-García *et al.*, Cryst. Growth Des., 2014, 14, 2479).

25 La Tabla 4, además de ratificar la presencia de la enzima β -Glu en los biocatalizadores β -Glu@Mg-MOF-74, indica que esa enzima conservó cierta actividad catalítica a pesar de haber estado en DMF, medio que le es muy adverso, tal como se pone de manifiesto en la pérdida total de la actividad del extracto enzimático en DMF durante 10 minutos. Esto
30 sugiere que el material Mg-MOF-74, en este caso, no fue un simple anfitrión de la enzima β -Glu que inmoviliza, sino que además de alguna forma le ayudó a conservar su actividad enzimática frente al disolvente inhibidor de esa actividad, DMF. Por otra parte, la eficiencia de inmovilización enzimática fue altísima desde los primeros minutos, probablemente como consecuencia de que la mezcla de disoluciones de metal y ligando orgánico provocó la

formación de una suspensión prácticamente coloidal, que dejó pocas posibilidades a la enzima para no formar parte del sólido, una vez recuperado el material MOF.

Tabla 4. Porcentajes de inmovilización (por análisis Bradford); carga enzimática, actividad catalítica y eficiencia catalítica (por espectrofotometría); y contenido de azufre (por análisis químico elemental CHNS) del extracto enzimático tras someterse en una disolución de DMF durante 10 minutos, y de los biocatalizadores β -Glu@Mg-MOF-74-2h y -24h.

Muestra ^a	Enzima inmovilizada (%) ^b / Carga enzimática (mg/g) ^c	S ^d (%)	Actividad catalítica ^e	Eficiencia catalítica ^f
2h	86 / 112	– ^g	18	0,16
24h	86 / 113	0,10	7	0,06
β -Glu ^h			0	0,00

^a La muestra se designa como *nh* (número de horas de síntesis) del biocatalizador β -Glu@Mg-MOF-74-*nh*

^b Porcentaje de enzima inmovilizada en el sólido frente al total de enzima añadido.

^c mg de enzima por g de biocatalizador.

^d Porcentaje de S en la muestra según análisis elemental CHNS.

^e Actividad catalítica (expresada en unidades de actividad U por g de biocatalizador y calculada según la ecuación 2 del Ejemplo 1), en la hidrólisis de para-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido liberando paranitrofenol.

^f Eficiencia catalítica (expresada en unidades de actividad U por mg de enzima y calculada según la ecuación 3 del Ejemplo 1) en la hidrólisis de para-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido liberando paranitrofenol.

^g No medido.

^h Extracto de la enzima β -Glu tras 10 minutos en DMF.

En la Figura 7 se comparan los difractogramas de un Mg-MOF-74 preparado a temperatura ambiente según se ha publicado (Díaz-García *et al.*, Cryst. Growth Des., 2014, 14, 2479), pero conteniendo 0,5 ml de agua para igualar la añadida con el extracto enzimático, y del biocatalizador β -Glu@Mg-MOF-74-2h. Los dos difractogramas son típicos de una estructura MOF-74 de muy pequeño tamaño de cristal, y que contiene una mesoporosidad intercristalina.

Ejemplo 5. Procedimiento de obtención del biocatalizador β -Glu@Mg-MOF-74-20h, que comprende la síntesis del sistema Mg-MOF-74 utilizando N,N-dimetilformamida y en presencia de una mayor cantidad de enzima que el Ejemplo 4.

5

En este experimento se repiten las mismas condiciones que en el Ejemplo 4, con la diferencia de que se utiliza una mayor cantidad de la enzima β -Glu. Para la primera disolución se añadieron 0,566 g de acetato de Mg tetrahidratado sobre 10,015 g de DMF, que se disolvieron en pocos minutos. Por otro lado, se disolvieron 0,211 g de ácido 2,5-

10 dihidroxitereftálico (dhtp) en 10,013 g de DMF para formar la segunda disolución. Sobre la primera disolución, se añadieron 0,5 ml de extracto enzimático, conteniendo β -Glu en una concentración de 24,76 mg enzima/ml, e inmediatamente la segunda disolución gota a gota.

Se tomó una muestra a los 5 minutos y se centrifugó durante 15 segundos a 12500 rpm

15 obteniendo así el sobrenadante. El sólido se filtró a vacío y se etiquetó como β -Glu@Mg-MOF-74 -5min. La reacción se prolongó durante 20 horas, tras la que se recuperó según el mismo procedimiento el biocatalizador sólido β -Glu@Mg-MOF-74-20h.

La Tabla 5 indica que cuando se tuvieron en el medio de reacción más cantidad de enzima

20 (12,8 mg de enzima frente a 7,27 mg en el Ejemplo 4) se alcanzaron porcentajes de inmovilización enzimática superiores (93 % en el ejemplo 5 frente al 86 % en el Ejemplo 4), lo que indica que no se ha alcanzado la saturación del sistema, es decir, potencialmente se podría seguir incrementando la cantidad de enzima ofrecida en el medio.

25 **Tabla 5.** Porcentajes de inmovilización (por análisis Bradford); carga enzimática, actividad catalítica y eficiencia catalítica (por espectrofotometría); y contenido de azufre (por análisis químico elemental CHNS) de los biocatalizadores β -Glu@Mg-MOF-74 -5min y -20h.

Muestra ^a	Enzima inmovilizada (%) ^b / Carga enzimática (mg/g) ^c	S ^d (%)	Actividad catalítica ^e	Eficiencia catalítica ^f
5min	93 / 79	- ^g	2	0,02
20h	92 / 276	0,33	4	0,01

^a La muestra se designa como *nmin* ó *nh* (número de minutos/horas de síntesis) del biocatalizador β -Glu@Mg-MOF-74-*nmin* –*nh*.

^b Porcentaje de enzima inmovilizada en el sólido frente al total de enzima añadido.

^c mg de enzima por g de biocatalizador.

5 ^d Porcentaje de S en la muestra según análisis elemental CHNS.

^e Actividad catalítica (expresada en unidades de actividad U por g de biocatalizador y calculada según la ecuación 2 del Ejemplo 1), en la hidrólisis de para-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido liberando paranitrofenol.

10 ^f Eficiencia catalítica (expresada en unidades de actividad U por mg de enzima y calculada según la ecuación 3 del Ejemplo 1) en la hidrólisis de para-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido liberando paranitrofenol.

^g No medido.

15 La Tabla 5, además de ratificar la presencia de la enzima β -Glu en los biocatalizadores β -Glu@Mg-MOF-74, indica que esa enzima conservó cierta actividad catalítica a pesar de haber estado en DMF igual que se había observado en el Ejemplo 4. Nuevamente el material Mg-MOF-74 no fue un simple anfitrión de la enzima β -Glu que inmoviliza, sino que además de alguna forma le ayudó a conservar su actividad enzimática frente al disolvente inhibidor de esa actividad, DMF.

20

Ejemplo 6. Electroforesis en geles de poliacrilamida de los biocatalizadores obtenidos en los Ejemplos 1 a 5.

25 Con todos los biocatalizadores obtenidos en los Ejemplos 1 a 5, se llevó a cabo la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) con SDS (dodecilsulfato sulfato sódico). Los biocatalizadores se someten a las condiciones desnaturalizantes de la técnica (SDS, mercaptoetanol, 100 °C, 5 min) que inducen la pérdida completa de la estructura tridimensional de la proteína, que queda reducida a la cadena lineal de aminoácidos y en esta forma debería poder ser liberada fácilmente del entramado del MOF. Los

30 sobrenadantes se someten a electroforesis para investigar la presencia de bandas de proteína en el gel. Las Figuras 8 y 9 recogen la electroforesis correspondiente a los biocatalizadores de los ejemplos 1 a 5, todos ellos preparados con Beta-glu. Se observó la banda correspondiente a la enzima en el biocatalizador con el material Mg-MOF-74, lo que certifica su presencia. Sin embargo, no se apreció banda proteica en los biocatalizadores

NH₂-MIL-53(Al), lo que no puede significar ausencia de proteína, ya que esta ha sido detectada por el resto de las técnicas empleadas (determinación de la actividad enzimática del biocatalizador, análisis Bradford, análisis químico elemental CHNS, como se indican en las Tablas 1 a 3, y mediante termogravimetría (mostradas en las Figuras 2, 4 y 6)). Lo que puede indicar es que la cadena proteica está más fuertemente retenida químicamente por interacción con el material, y más protegida frente al lixiviado.

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento de obtención de un biocatalizador, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

5

a) sintetizar parcial o totalmente un material metalo-orgánico (MOF) en presencia de al menos una enzima hasta obtener un sólido y,

b) aislar el sólido sintetizado según la etapa a),

10

y donde se inmoviliza in-situ a la enzima durante la síntesis del MOF en al menos uno de los volúmenes huecos de diámetro entre 2 y 50 nm de la mesoporosidad intercrystalina formados entre cristales o entre dominios aglomerados o agregados de partículas nanocrystalinas de tamaño homogéneo

15

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que en la etapa (a), la síntesis del MOF comprende poner en contacto una primera disolución de una fuente metálica y otra segunda disolución de ligando orgánico, en presencia de al menos una enzima.

20

3.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por que en la etapa (a) las disoluciones son acuosas.

4.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por que en la etapa (a) las disoluciones son orgánicas o una mezcla acuosa-orgánica.

25

5.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que en la etapa (a) la segunda disolución de ligando orgánico se elige entre una disolución acuosa de una sal de ligando orgánico o una disolución acuosa de ligando orgánico protonado en presencia de un agente desprotonante.

30

6.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que el agente desprotonante se selecciona de entre una base fuerte, una base media o una base débil.

7.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que la etapa (a) se lleva a cabo a una temperatura entre 4 y 70 °C y preferentemente entre 20 y 30 °C.

5 8.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que en la etapa (a) la enzima se añade sobre cualquiera de las dos disoluciones, antes de la síntesis del MOF.

10 9.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que en la etapa (a) la enzima se añade sobre la mezcla de las dos disoluciones, antes de la síntesis del MOF.

10.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado por que la enzima es β -glucosidasa.

15 11.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque el aislamiento del sólido de la etapa (b) se lleva a cabo por centrifugación o filtración.

20 12.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado por que adicionalmente comprende una etapa (c) de secado del sólido aislado en la etapa (b).

25 13.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado por que la primera disolución de la fuente metálica es una disolución acuosa de nitrato de aluminio nonahidratado, la segunda disolución del ligando orgánico es una disolución acuosa de ácido 2-aminotereftálico y un agente desprotonante, la temperatura de reacción 25 °C y la enzima es β -glucosidasa de *Aspergillus niger* que se añade sobre la disolución del ligando orgánico.

30 14.- Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizada por que el agente desprotonante se selecciona entre trietilamina, hidróxido sódico y amoníaco.

15.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado por que la primera disolución de la fuente metálica es una disolución de acetato de Mg tetrahidratado sobre N,N-dimetilformamida, la segunda disolución del ligando orgánico es una disolución

ácido 2,5-dihidroxitereftálico sobre N,N-dimetilformamida, la temperatura de reacción 25 °C y la enzima es β -glucosidasa de *Aspergillus niger* que se añade sobre la disolución de la fuente metálica.

- 5 16.- Biocatalizador obtenido por el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

FIG. 1

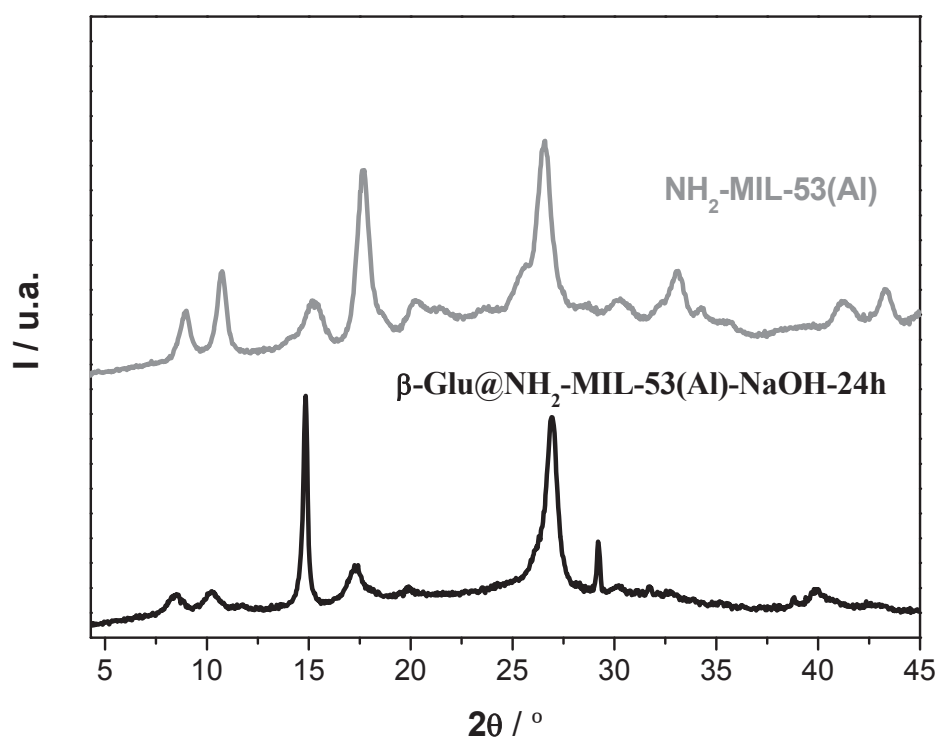


FIG. 2

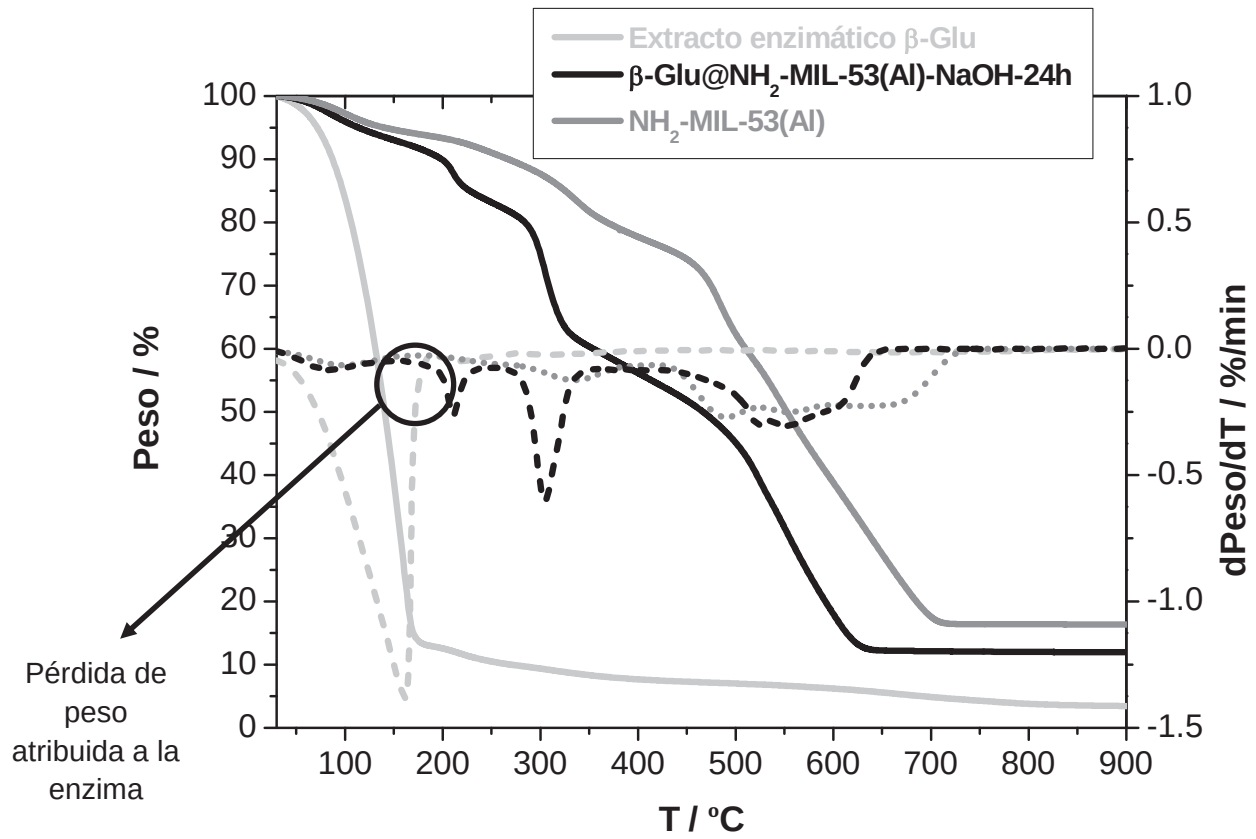


FIG. 3

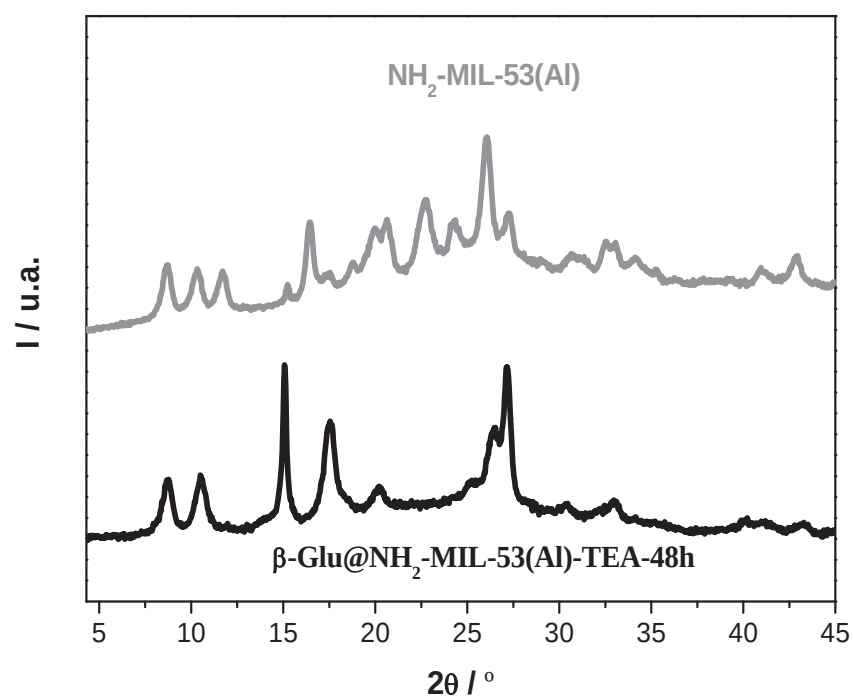


FIG. 4

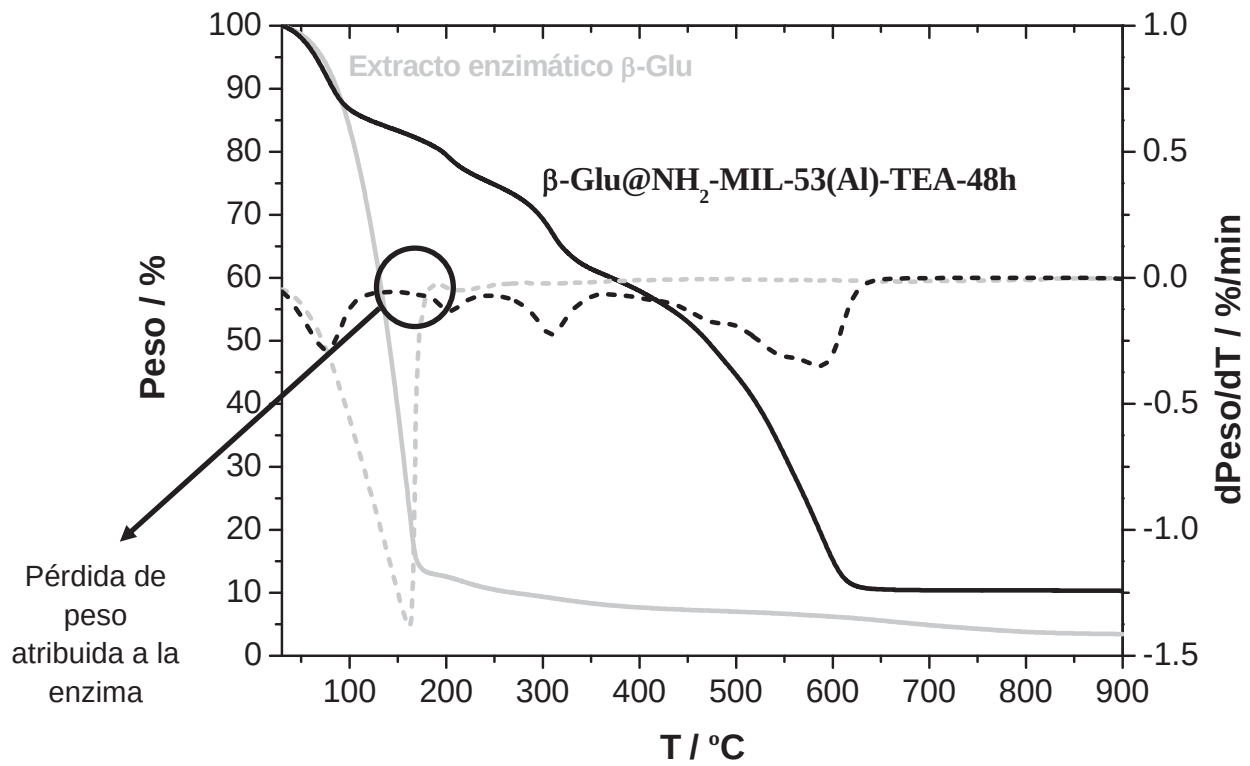


FIG. 5

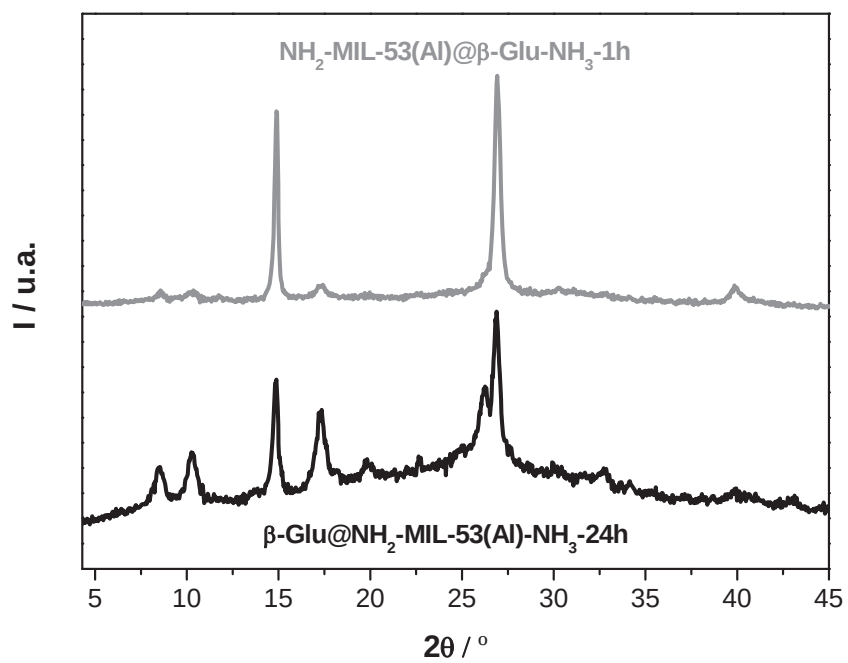


FIG. 6

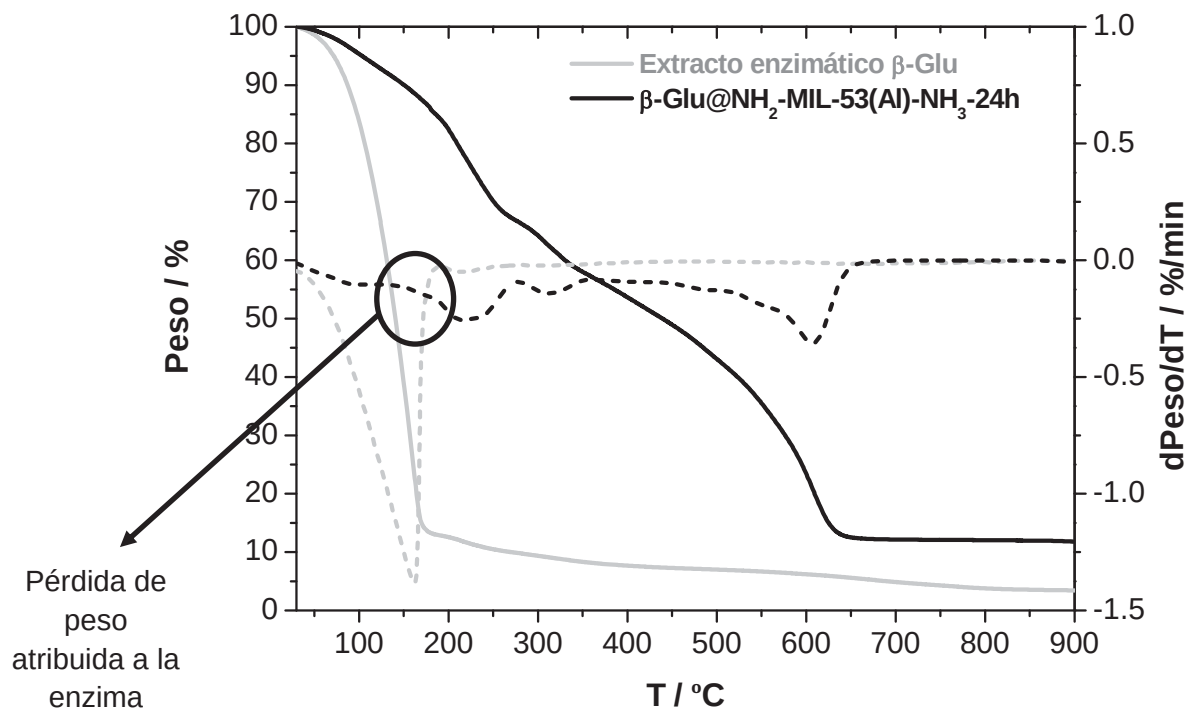


FIG. 7

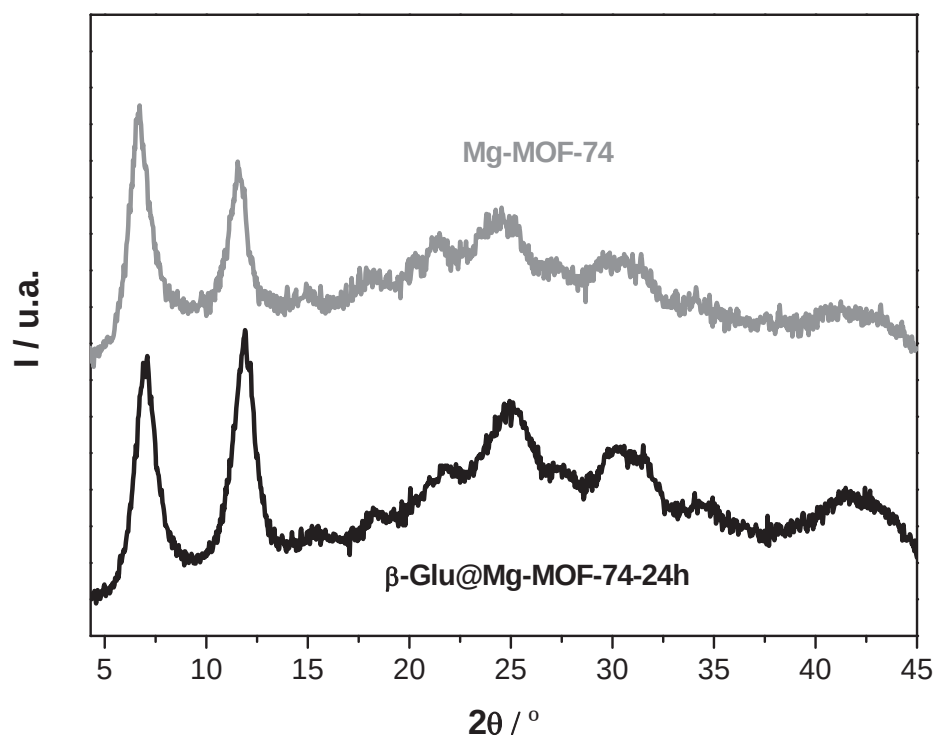


FIG. 8

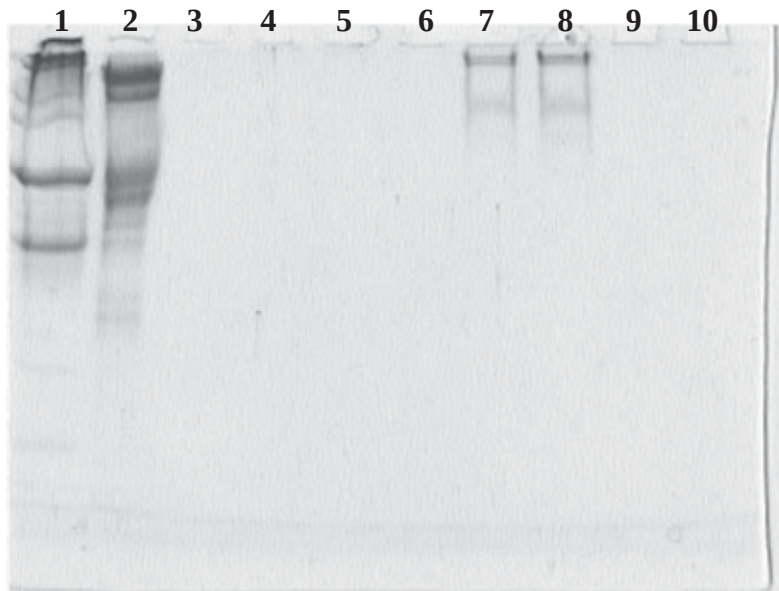


FIG. 9

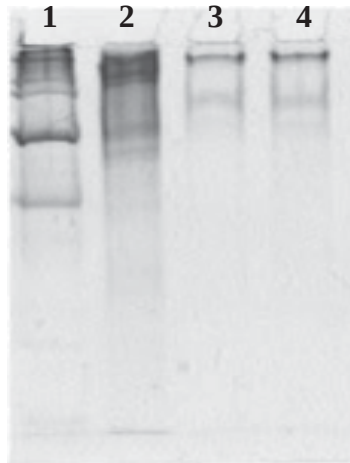


FIG. 10

