

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 955**

51 Int. Cl.:

C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/14 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
C12N 9/90 (2006.01)
C08L 33/04 (2006.01)
C12N 9/98 (2006.01)
C12N 11/16 (2006.01)
C08L 33/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.03.2015** **PCT/EP2015/054361**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.09.2015** **WO15132230**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2015** **E 15707155 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017** **EP 3114218**

54 Título: **Granulado que contiene una enzima y un polímero de (met)acrilato de alquilo**

30 Prioridad:

05.03.2014 DE 102014203964

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.10.2017

73 Titular/es:

EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)
Rellinghauser Strasse 1-11
45128 Essen, DE

72 Inventor/es:

HELLMERS, FRANK;
HÜLLER, THOMAS;
DASSINGER, THOMAS y
THUM, OLIVER

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 636 955 T3

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

DESCRIPCIÓN

Granulado que contiene una enzima y un polímero de (met)acrilato de alquilo

Campo de la invención

Objeto de la invención es un granulado que contiene

- 5 A) al menos una enzima elegida de al menos uno de los grupos elegidos de transferasas de EC 2, hidrolasas de EC 3, liasas de EC 4 e isomerazas de EC 5,
 B) al menos un polímero elegido de polímero de acrilato de alquilo C₁-C₁₀, polímero de metacrilato de alquilo C₁-C₁₀ y copolímero de acrilato de alquilo C₁-C₁₀-metacrilato de alquilo C₁-C₁₀, preferiblemente copolímero de acrilato alquilo C₁-C₁₀-metacrilato de alquilo C₁-C₁₀ y
 10 C) al menos un material de soporte inorgánico.

Estado de la técnica

- 15 La isomerización de sacarosa con ayuda de células enteras inmovilizadas, extractos celulares o enzimas purificadas se describe repetidas veces en la bibliografía (Südzucker AG, documento DE3038219C2; Mitsui Sugar Co., documento US4386158). En lo que sigue se considera a modo de ejemplo la reacción enzimática para dar isomaltulosa, así como los productos secundarios trehalulosa, glucosa, fructosa y pequeñas proporciones de oligosacáridos. El uso de células libres activas conduce a costos incrementados de purificación del producto y a bajos rendimientos (Landbauforschung Völknerode (2002) SH 241:75-80). Por este motivo, habitualmente tiene lugar una inmovilización del material biocatalíticamente activo.

- 20 Casi todos los procedimientos de inmovilización conocidos se han descrito para la isomerización biocatalítica de sacarosa tal como, por ejemplo, la unión por adsorción de material biocatalíticamente activo a intercambiadores de calor (Danisco AS, documento EP0915986B1), la inclusión en diferentes polímeros sintéticos (Bayer AG, documento DE3416140A1) o polímeros naturales (Südzucker AG, documento DE3038219C2; Mitsui Sugar Co., documento US4386158). Una perspectiva de procedimientos de inmovilización habituales se recoge en la bibliografía (Topics in Current Chemistry, Vol. 200:95-126).

- 25 Para el proceso indicado se ha establecido, en particular, la inclusión de células intactas o bien de caldos de fermentación no purificados en polímeros de alginato (Südzucker AG, documento DE3038219C2; Mitsui Sugar Co., documento US4386158). Los productos inmovilizados se preparan mediante el goteo de una suspensión a base de material celular o enzimas purificadas, así como una disolución de alginato en una disolución que contiene iones cloruro de calcio (Bioresource Technology (2009), Vol. 100:4252-4256). En este caso, se muestra desventajoso que
 30 los productos inmovilizados producidos de esta manera se compongan en una gran parte de agua. Un almacenamiento o bien una provisión puede tener lugar sólo en condiciones húmedas por este motivo, dado que un secado conduce a daños irreversibles en la estructura del producto inmovilizado. Una provisión húmeda fomenta una carga con gérmenes extraños que no puede rebasar los límites establecidos según la disposición (EG) No. 178 / 2002 sobre contenidos máximos para determinadas contaminaciones en alimentos. Con contaminaciones extrañas se ha de contar en el caso de una actividad del agua incrementada (valor $a_w > 0,65$) (véase Schimmelpilze: Vorkommen, Gesundheitsgefahren, Schutzmassnahmen. Wolfgang Mücke, Chirsta Lemmen. 2004. Ecomed Medizin, Verlagsgruppe Hüthig Jehle Rehm GmbH). Los productos inmovilizados de alginato se manifiestan, además como inestables, en particular bajo la influencia de concentraciones de cationes ya bajas tal como se presentan, p. ej., en disoluciones tamponadas (Focus on Biotechnology, Vol. 8B:375-405). Por este motivo, habitualmente se
 40 alcanza una estabilización mediante reticulación adicional utilizando glutaraldehído y polietilenimina (Mitsui Sugar Co., documento US4386158; Bioresource Technology (2009), Vol. 100:4252-4256). En este caso, es desventajosa, en particular, una reducción de la actividad enzimática mediante el empleo de glutaraldehído (Process Biochemistry (2006) Vol. 41:2035-2040). Asimismo desventajosas son aplicaciones incrementadas de desecho (residuos peligrosos según la Disposición de la Lista de Residuos (AVV) (situación 10.12.2001)) mediante el empleo de los reticulantes.

- 45 La preparación de granulados estables frente al secado y biocatalíticamente activos se describe repetidas veces en la bibliografía. En Lipid Sci. Technol. -2003.- tomo 105.- págs. 318-321 se muestra un proceso para la inmovilización de la lipasa B de *Candida antarctica* para la producción de ésteres, el cual no obstante, en virtud de la elección del aglutinante (maltodextrina) no es estable en procesos acuosos. En Novo Nordisk AS, documento WO9522606 se describe el uso del aglutinante polivinilpirrolidona (Kollidon K25, BASF) para la granulación enzimática. No obstante, esta combinación en disoluciones acuosas no es estable. Glatt Ingenieurtechnik GmbH, documento EP1595942A1, describe una preparación con contenido en microorganismos que es provista subsiguientemente de un revestimiento protector mediante recubrimiento, por ejemplo mediante goma laca, para la estabilización. El sentido de este proceso de recubrimiento es proteger a los preparados frente a medios tales como, p. ej., agua u oxígeno del aire.

Por lo tanto, este tipo de preparados no son adecuados per se para uso en biotransformaciones en donde se debe alcanzar una intensa transferencia de sustancias entre el medio y el biocatalizador.

- 5 Por lo tanto, es misión de la invención, la provisión de nuevos preparados enzimáticos y procedimientos para la preparación de los mismos que superen al menos uno de los inconvenientes antes mencionados del estado de la técnica. En particular, la misión es la preparación de preparados enzimáticos estables al almacenamiento e insensibles a la humedad con una elevada actividad enzimática aparente y una estabilidad mecánica mejorada.

Descripción de la invención

- 10 Sorprendentemente, se encontró que mediante el uso de una mezcla a base de un material de soporte inorgánico con una superficie preferiblemente hidrofílica tal como, p. ej., ácidos silícicos precipitados, un (co)polímero de (met)acrilato de alquilo C₁-C₁₀, así como enzimas y utilizando procesos de granulación conocidos tales como extrusión, se pueden preparar preparados con una elevada actividad biocatalítica.

Por consiguiente, objeto de la invención es un granulado que contiene

- 15 A) al menos una enzima elegida de al menos uno de los grupos elegidos de transferasas de EC 2, hidrolasas de EC 3, liasas de EC 4 e isomerasas de EC 5,
B) al menos un polímero elegido de polímero de acrilato de alquilo C₁-C₁₀, polímero de metacrilato de alquilo C₁-C₁₀ y copolímero de acrilato de alquilo C₁-C₁₀-metacrilato de alquilo C₁-C₁₀, preferiblemente copolímero de acrilato alquilo C₁-C₁₀-metacrilato de alquilo C₁-C₁₀ y
C) al menos un material de soporte inorgánico.

- 20 Otro objeto de la presente invención es un procedimiento para la preparación de los granulados de acuerdo con la invención.

Una ventaja de la presente invención es que los granulados son estables al secado. Otra ventaja de la presente invención es que los granulados son estables al almacenamiento. Todavía otra ventaja de la presente invención es que los granulados pueden ser provistos con poca contaminación.

Otra ventaja de la presente invención es que los granulados son mecánicamente estables.

- 25 Todavía una ventaja de la presente invención es que los granulados no requieren sustancias peligrosas para la reticulación adicional tales como glutaraldehído o polietilenimina. Otra ventaja de la presente invención es que los granulados presentan una elevada estabilidad, también en medios acuosos.

- 30 La presente invención se describe en lo que sigue a modo de ejemplo, sin que la invención deba ser limitada a estas formas de realización a modo de ejemplo. Los números de acceso indicados en relación con la presente invención corresponden a las solicitudes del banco de datos ProteinBank de NCBI con fecha de 01.10.2013; por norma general, en la presente memoria el número de versión de la inscripción se caracteriza por "cifras" tal como, por ejemplo, "1".

Si en el marco de la presente descripción se citan documentos, entonces su contenido debe pertenecer por completo al contenido de divulgación de la presente invención.

- 35 Todos los porcentajes (%) indicados, si no se indica de otro modo, son porcentajes en masa.

El granulado de acuerdo con la invención es preferiblemente uno sólido.

Presenta ventajosamente un tamaño medio de partículas d₅₀ [μm] en el intervalo de 100 a 2000 μm, en particular en el intervalo de 200 a 1500 μm y especialmente en el intervalo de 700 a 1300 μm. El valor de d₅₀ [μm] marca conforme a la definición el punto en el que la mitad de la cantidad de partículas investigada es mayor o bien menor.

- 40 Además, el valor d₅₀ y el valor d₁₀ indican el intervalo en el que 10% o bien 90% es menor o igual a este tamaño de partículas. El tamaño de partículas de valor medio d₅₀ [μm], así como el valor de d₁₀ [μm] y el valor de d₉₀ [μm] del colectivo de partículas se determinan en este caso con ayuda de un aparato Camsizers® de la razón social Retsch (Haan, Alemania) a través del procedimiento del análisis dinámico de imágenes bajo la elección de ajustes estándares (norma ISO 13322-2:2006). El proceso de medición aplicado proporciona un análisis detallado del tamaño de partículas de todo el colectivo de partículas que se representa como función de densidad de distribución. En la función de densidad de distribución, el valor d₅₀ se puede deducir como valor de abscisas del máximo mayor. Preferiblemente, se han de elegir colectivos de partículas de una distribución estrecha del tamaño de partículas. Éstos se caracterizan porque el valor d₁₀ [μm] del colectivo de partículas no es menor que 50%, y el d₉₀ [μm] no es mayor que 150% el tamaño medio de partículas d₅₀ [μm].

- 50 El granulado de acuerdo con la invención contiene de manera muy particularmente preferida al menos una enzima elegida de al menos uno de los grupos elegidos de glicosiltransferasas de EC 2.4, fructan-β-fructosidasas de EC 3.2.1.80, β-galactosidasa de EC 3.2.1.23, invertasas de EC 3.2.1.26, aspartato-β-descarboxilasa de EC 4.1.1.11,

fumarato-hidratasa de EC 4.2.1.2., nitril-hidratasa de EC 4.2.1.84, aspartasa de EC 4.3.1.1, xilosa-isomerasa de EC 5.3.1.5 e isomaltulosa sintasa de EC 5.4.99.11.

El granulado conforme a la invención contiene de manera muy particularmente preferida al menos una isomaltulosa sintasa de EC 5.4.99.11.

- 5 Granulados preferidos conforme a la invención se caracterizan porque la isomaltulosa sintasa se elige del grupo de las proteínas YP_002235756.1, WP_006325065.1, WP_012540141.1, WP_004157672.1, CCO82510.1, CCO82509.1, CCO78715.1, EKF64560.1, AAP57084.1, AAP57083.1, AC112079.1 y ACF42098.1, así como proteínas con una secuencia de polipéptidos en la que hasta el 60%, preferiblemente hasta el 25%, de manera particularmente preferida hasta el 15%, en particular hasta el 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1% de los restos aminoácido
- 10 están modificados frente a las secuencias de referencia antes mencionadas mediante delección, inserción, sustitución o una combinación de las mismas y los cuales poseen todavía al menos el 50%, preferiblemente el 65%, de manera particularmente preferida el 80%, en particular más del 90% de la actividad de la proteína con la secuencia de referencia correspondiente antes mencionada, entendiéndose por el 100% de actividad de la proteína de referencia la cantidad de sustancia de sacarosa que ha reaccionado por unidad de tiempo, referida a la cantidad
- 15 de enzima de referencia empleada para formar la correspondiente isomaltulosa. La actividad puede determinarse tal como se describe en el Ejemplo 1.

La isomaltulosa sintasa de EC 5.4.99.11 puede estar contenida, conforme a la invención, en cualquier forma imaginable en los granulados de acuerdo con la invención, así como, por ejemplo, en forma de células enteras, células disgregadas, extractos celulares, o purificada. Conforme a la invención se prefiere que la isomaltulosa sintasa esté contenida en forma de catalizadores de células enteras.

20 Conforme a la invención se prefiere alternativamente que la isomaltulosa sintasa esté contenida en forma de células disgregadas.

Catalizadores de células enteras adecuados se describen, por ejemplo, en el documento EP 0625578 como *Protaminobacter rubrum* (en particular CBS 574.77), *Serratia plymuthica* (en particular ATCC 15928), *Serratia marescens* (en particular NCIB 8285), *Leuconostoc mesenteroides* (en particular NRRL-B 512 F, en particular ATCC 1083 a) y *Erwinia rhapontici* (en particular NCPPB 1578), en el documento EP 0392556 y el documento EP 1257638 como *Klebsiella terrigena* JCM 1687, *Klebsiella sp.* No. 88 (FERM BP-2838) y *Klebsiella singaporiensis* LX3 y LX21 en el documento EP1328647 como *Pantoea dispersa* UQ68J.

El granulado conforme a la invención contiene al menos un polímero elegido de polímero de acrilato de alquilo C₁-C₁₀, polímero de metacrilato de alquilo C₁-C₁₀ y copolímero de acrilato de alquilo C₁-C₁₀-metacrilato de alquilo C₁-C₁₀, pudiendo quedar abarcados los mencionados grupos de sustancias por la nomenclatura “(co-)polímero de (met)acrilato de alquilo C₁-C₁₀”. El polímero contenido ejerce en el granulado de acuerdo con la invención preferiblemente una función como aglutinante.

Granulados preferidos conforme a la invención se caracterizan porque el polímero presenta un peso molecular medio ponderal de aproximadamente 100000 a 1500000 g/mol, preferiblemente 500000 a 1000000 g/mol.

El peso molecular medio ponderal se determina mediante cromatografía de permeación en gel (GPC). La caracterización de las muestras tuvo lugar en tetrahidrofurano como eluyente y frente a poliestireno como patrón según la norma DIN 55672-1.

En polímeros y copolímeros de (met)acrilato de alquilo preferiblemente contenidos, el grupo alquilo presenta 1 a 4 átomos de carbono.

Preferiblemente, el granulado conforme a la invención contiene como polímero al menos un copolímero de acrilato de alquilo C₁-C₁₀-metacrilato de alquilo C₁-C₁₀.

Granulados particularmente preferidos conforme a la invención se caracterizan porque el polímero es un copolímero de acrilato de etilo/metacrilato de metilo o copolímero de metacrilato de alquilo/acrilato de etilo, siendo particularmente preferido un copolímero de acrilato de etilo/metacrilato de metilo, en particular poli(acrilatos de etilo-co-metacrilatos de metilo) 2:1.

Copolímeros de acrilato de etilo/metacrilato de metilo se comercializan, por ejemplo, bajo los nombres comerciales Kollicoat EMM 30D por BASF AG o bajo el nombre comercial Eudragit NE o Eudragit NM de Evonik Industries.

El granulado conforme a la invención contiene al menos un material de soporte inorgánico. Como materiales de soporte adecuados entran en consideración todos los materiales de soporte inorgánicos conocidos por el experto en la materia y adecuados para la preparación de granulados. Preferiblemente, éstos tienen una superficie hidrofílica. Representantes a modo de ejemplo de materiales de soporte de este tipo se describen en Linqiu Cao 2006, Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design, Capítulo 1, Introducción: Immobilized Enzymes: Past, Present and Prospects; Wiley.

55 Granulados preferidos conforme a la invención se caracterizan porque el material de soporte inorgánico se elige de ácidos silícicos, en particular ácidos silícicos precipitados, y silicatos de aluminio, en particular zeolitas, siendo particularmente preferidos ácidos silícicos precipitados.

Como zeolitas pueden emplearse, por ejemplo, zeolita A, zeolita P, zeolita X o mezclas de las mismas. Zeolitas adecuadas abarcan, por ejemplo, productos comerciales tales como Wessalith® (Evonik Industries), Zeolith MAP® (ex Crosfield) o VEGOBON AX® (ex SASOL).

5 Ácidos silícicos adecuados son comercializados, por ejemplo, por Evonik Industries como Aerosil® o Sipernat®, por ejemplo Sipernat 320.

Ácidos silícicos que se adecuan como cargas se pueden adquirir en el comercio bajo el nombre Aerosil® o Sipernat® (Evonik Industries).

10 Granulados preferidos conforme a la invención se caracterizan porque B) referido al granulado total, están contenidos en una cantidad de 0,1% en peso a 80% en peso, preferiblemente de 1% en peso a 50% en peso, de manera particularmente preferida de 5% en peso a 35% en peso, y C) en una cantidad de 99,5% en peso a 20% en peso, preferiblemente de 99% en peso a 30% en peso, de manera particularmente preferida de 90% en peso a 40% en peso.

15 Granulados preferidos de acuerdo con la invención se caracterizan porque éstos presentan una actividad específica de 1 a 1000 U/g, preferiblemente de 5 a 100 U/g, de manera particularmente preferida de 10 a 40 U/g. La actividad específica (U/g) define en este caso la actividad de la sacarosa isomerasa, referido al producto principal (isomaltulosa en µmol) que es formada por minuto bajo condiciones definidas (40% de sacarosa (educto), TA, pH 6, 100 RPM), por parte de 1 g de granulado.

20 Un procedimiento adecuado para la medición de la actividad se describe en el Ejemplo 2. La actividad específica de los granulados puede controlarse, por ejemplo, mediante el aumento o la reducción del contenido en isomaltulosa sintasa en el granulado.

Otro objeto de la presente invención es un procedimiento para la preparación de un granulado, que comprende las etapas de procedimiento

25 1) provisión de al menos una isomaltulosa sintasa de EC 5.4.99.11, al menos de un polímero elegido de polímero de acrilato de alquilo C₁-C₁₀, polímero de metacrilato de alquilo C₁-C₁₀ y copolímero de acrilato de alquilo C₁-C₁₀-metacrilato de alquilo C₁-C₁₀, preferiblemente copolímero de acrilato de alquilo C₁-C₁₀-metacrilato de alquilo C₁-C₁₀, y al menos un material de soporte inorgánico,
2) preparación de una pasta que contiene los componentes de la etapa 1) del procedimiento y
3) granulación de la pasta.

30 En la etapa 1) del procedimiento de acuerdo con la invención se emplean preferiblemente las isomaltulosas sintasas, polímeros y materiales de soporte que están preferiblemente contenidos en granulados conforme a la invención preferidos.

En la etapa 2) del procedimiento de acuerdo con la invención se homogeneizan los componentes.

35 Preferiblemente, la pasta en la etapa 2) del procedimiento contiene, referido a la pasta total B) en una cantidad de 0,1% en peso a 80% en peso, preferiblemente de 1% en peso a 50% en peso, de manera particularmente preferida de 5% en peso a 35% en peso y C) en una cantidad de 99,5% en peso a 20% en peso, preferiblemente de 99% en peso a 30% en peso, de manera particularmente preferida de 90% en peso a 40% en peso. Junto a los componentes antes mencionados, la pasta puede contener agua en una cantidad que garantice una homogeneización suficiente de los componentes que forman la pasta.

40 En la etapa 3) del procedimiento, la granulación puede tener lugar básicamente de manera arbitraria. Por ejemplo, la pasta y eventualmente otros componentes tales como agua, tampón, sales de metales estabilizadoras, se elaboran de manera en sí conocida para formar un granulado mediante extrusión, granulación con mezcladora, granulación en lecho fluido, aglomeración en disco, aglomeración por pulverización, granulación por pulverización o compactación. En una forma de realización preferida, la granulación comprende, en una primera etapa, la extrusión de la pasta con contenido en agua que comprende los componentes A), B) y C) y, eventualmente, otros
45 componentes tales como tampón, sales de metales estabilizadoras. En este caso, el agua está contenida en una cantidad que garantice una consistencia suficiente (plastificación) de la pasta para la extrusión.

La cantidad de agua requerida para ello puede determinarse de manera en sí conocida por un experto en la materia en el sector de la formulación de enzimas. La proporción de agua en la pasta se encuentra, al comienzo de la granulación, típicamente en el intervalo de 10% en peso a 80% en peso, en particular en el intervalo de 15% en peso
50 a 70% en peso y especialmente en el intervalo de 20% en peso a 60% en peso, referido al peso total de la pasta.

La preparación de la pasta en esta forma de realización preferida tiene lugar en la etapa 2) del procedimiento, de manera en sí conocida, mediante mezcladura de los componentes que forman la pasta en un dispositivo mezclador adecuado, por ejemplo en una mezcladora o amasadora habitual. Para ello, el o bien los sólidos, p. ej., el material de

soporte, se mezclan intensamente con una fase líquida, por ejemplo agua, una disolución acuosa de aglutinante o un concentrado acuoso enzimático. Por norma general, el soporte se incorpora en forma de un sólido en el mezclador y se mezclará con un concentrado enzimático acuoso, así como con el polímero, preferiblemente en forma de una disolución acuosa separada, o disuelto en el concentrado enzimático acuoso, así como eventualmente,

con sal estabilizadora, preferiblemente en forma de una disolución o suspensión acuosa separada, en particular disuelto o suspendido en el concentrado enzimático acuoso. Eventualmente, se añadirá agua adicional para ajustar la consistencia deseada de la pasta.

Preferiblemente, durante la mezclado a fondo no se rebasará una temperatura de 60°C, en particular de 40°C. De manera particularmente preferida, la temperatura de la pasta durante la mezclado asciende a 10 a 30°C

Eventualmente, por lo tanto, el dispositivo mezclador se enfriará durante la preparación de la pasta.

La pasta obtenida de esta manera, en esta forma de realización preferida en la etapa 3) del procedimiento, se someterá a continuación a una extrusión, preferiblemente a una extrusión a baja presión. La extrusión, en particular la extrusión a baja presión, tiene lugar por norma general en un aparato en el que la masa (pasta) a extrudir es comprimida a través de una matriz. El diámetro de los agujeros de la matriz determina el diámetro de las partículas y, por norma general, se encuentra en el intervalo de 0,3 a 2 mm y, en particular, en el intervalo de 0,4 a 1,0 mm.

Extrusoras adecuadas son, p. ej., extrusoras de cúpula o extrusoras de cesta que son comercializadas, entre otros, por razones sociales tales como Caleva, Fitzpatrick o Bepex. En el caso de una consistencia correcta de la masa a granular, resulta en este caso sólo un ligero aumento de la temperatura al paso por la matriz (hasta aprox. 20°C). Preferiblemente, la extrusión tiene lugar bajo el control de la temperatura, es decir, la temperatura de la pasta no debería rebasar durante la extrusión una temperatura de 70°C, en particular 60°C. En particular, la temperatura de la pasta durante la extrusión se encuentra en el intervalo de 10 a 40°C.

Los cordones de pasta extrudidos que abandonan la extrusora se rompen en cortas partículas a modo de granulado o pueden romperse eventualmente con ayuda de dispositivos de corte adecuados. Las partículas de granulado, obtenidas de esta manera, presentan típicamente un tamaño de grano homogéneo, es decir, una estrecha granulometría. Además, se ha manifestado ventajoso redondear el granulado todavía húmedo antes de llevar a cabo el secado, es decir, de esferonizarle. En este caso, se reduce, en particular, la formación de porciones de polvo indeseadas en el producto final.

Dispositivos adecuados para el redondeamiento de los granulados húmedos son los denominados esferonizadores que presentan esencialmente un disco rotatorio horizontal sobre el que se comprimen a la pared los pequeños cordones a través de la fuerza centrífuga. Los pequeños cordones se rompen en las micromuecas previamente establecidas por el proceso de extrusión, de modo que forman partículas cilíndricas con una relación de diámetro a longitud de aproximadamente 1:1,3 a 1:3. Mediante la sollicitación mecánica en el esferonizador, las partículas cilíndricas se redondean en principio algo.

De este modo se obtiene un granulado con un contenido en agua relativamente elevado que, por norma general, no es mayor que 15% en peso, por ejemplo está en el intervalo de 15 a 50% en peso, en particular en el intervalo de 20 a 45% en peso, referido al peso total del granulado húmedo. Conforme a la invención, se procederá, por lo tanto, preferiblemente a un secado de manera que su contenido en agua no ascienda a más de 30% en peso y preferiblemente se encuentre en el intervalo de 1 a 12% en peso, en particular en el intervalo de 3 a 10% en peso y especialmente en el intervalo de 5 a 9% en peso.

La confección comprende de manera correspondiente, por norma general, una etapa de secado.

Ésta tiene lugar preferiblemente en un secador de lecho fluido. En este caso, un gas preferiblemente calentado, por norma general aire o una corriente de gas nitrogenado, es conducido desde abajo a través de la capa de producto. La cantidad de gas se ajusta habitualmente de manera que las partículas sean fluidizadas y se arremolinen.

Mediante la transferencia de calor gas/partícula se evapora el agua. Dado que los granulados con contenido en enzimas son por norma general estables a la temperatura, se tendrá que tener cuidado de que la temperatura del granulado no ascienda demasiado, es decir, por norma general, a no más de 80°C y preferiblemente a no más de 70°C. En particular, la temperatura del granulado se encuentra durante el secado en el intervalo de 10 a 40°C. La temperatura de secado puede controlarse de manera sencilla a través de la temperatura de la corriente gaseosa. La temperatura de la corriente gaseosa se encuentra típicamente en el intervalo de 140 a 40°C y, en particular, en el intervalo de 120 a 60°C. El secado puede tener lugar de manera continua o discontinua.

Después del secado, el granulado puede fraccionarse todavía mediante un tamiz. Material tosco y fino puede molerse y devolverse a la mezcladora para el amasado de la masa de granulación.

En los ejemplos que se recogen en lo que sigue se describe a modo de ejemplo la presente invención, sin que ésta, cuya gama de aplicación resulta de toda la descripción y de las reivindicaciones, deba limitarse a las formas de realización mencionadas en los ejemplos.

Las siguientes figuras son componente de los Ejemplos:

Figura 1: actividad específica (U/g) referida al producto principal (isomaltulosa en μmol) que se forma por minuto, bajo condiciones definidas (40% de sacarosa (educto), TA, pH 6, 100 RPM) mediante 1 g de granulado o mediante un caldo de fermentación con contenido en *P. rubrum*, con una biomasa equivalente al granulado.

Figura 2: representación de la distribución del tamaño de partículas del preparado conforme a la invención (no tratado o bien después de incubación en un agitador a 400 RPM) como función de la densidad de distribución.

Figura 3: representación de la distribución del tamaño de partículas del preparado no de acuerdo con la invención (no tratado o bien después de incubación en un agitador a 400 RPM) como función de la densidad de distribución.

5 Figura 4: representación de la conversión de sacarosa en fructosa y glucosa.

Ejemplos:

Ejemplo 1: Preparación de un preparado conforme a la invención.

10 100 ml de una dispersión al 30% en peso de un copolímero de acrilato de etilo/metacrilato de metilo (Eudragit NM, Evonik Industries AG) se homogeneizan en una amasadora con 130 ml de un caldo de fermentación de *P. rubrum* al 6% en peso de masa seca y 62 g de material de soporte consistente en Sipernat 320 (Evonik Industries AG). La mezcla homogénea se extrude a continuación con una extrusora (Extruder 20, Caleva) y se granula con un esferonizador (Spheronizer 250, Caleva).

El granulado obtenido se seca a temperatura ambiente durante la noche y se ajusta una humedad residual de 30% (p/p), determinada mediante balanza para medición de la humedad.

15 Referido al peso en seco total, las partículas contienen 30% en peso de copolímero de acrilato de etilo/metacrilato de metilo, 8% en peso de masa seca de fermentación y 62% en peso de Sipernat.

Ejemplo 2: Actividad aparente

Determinación de la actividad aparente del preparado conforme al Ejemplo 1.

20 La determinación de la actividad tiene lugar en tres tandas separadas. En este caso, se añaden a un tubito de reacción de 15 ml en cada caso 1 g de los granulados secados y se cargan con 10 ml de una disolución de sacarosa al 40% (p/p). La incubación tiene lugar en un agitador con 100 RPM a TA y un valor del pH de 6. La actividad específica U/g se determinó después de un tiempo de incubación de 120 min mediante la determinación de la concentración del producto. Ésta se determinó con ello en cada caso con ayuda de analítica de HPLC. La actividad específica del caldo de fermentación contenido en *P. rubrum* se determinó análogamente, con una biomasa equivalente contenida en los granulados. Los resultados se representan en la Figura 1.

Ejemplo 3: Estabilidad mecánica

30 La evaluación de la estabilidad mecánica del preparado conforme al Ejemplo 1 tiene lugar mediante la determinación del valor d10 [μm], d50 [μm] así como del valor d90 [μm] de la distribución del tamaño de partículas a partir de la función de densidad de distribución. Ésta se determinó ópticamente bajo condiciones estándares con ayuda de un aparato Camsizers de Retsch. La determinación de la distribución del tamaño de partículas tiene lugar de manera no tratada, así como después de 30 o bien 60 minutos de incubación en un recipiente de reacción de 50 ml, en cada caso con 25 g de granulado y 25 g de medio en un agitador (400 rpm) en medio y subsiguiente secado. En particular, mediante el valor d10 [μm] casi no modificado, el cual se puede deducir de la función de densidad de distribución, resulta claro que el preparado es estable y no se forman fragmentos de partículas. Según ello, el 10% de las partículas del colectivo de partículas antes de la incubación tiene un diámetro menor que 881 μm y después de 60 minutos de incubación, un diámetro menor que 866 μm .

Distribución del tamaño de partículas – preparado conforme a la invención

Preparado conforme a la invención		d10 [μm]	d50 [μm]	d90 [μm]
Muestra 1	en medio – 0 min	881	1017	1267
Muestra 2	en medio – 30 min agitador, 400 RPM	818	980	1160
Muestra 3	en medio – 60 min agitador, 400 RPM	866	983	1183

40 *Ejemplo 4: Preparación de un preparado conforme a la invención que contiene Saccharomyces cerevisiae con la enzima invertasa (EC 3.2.1.26)*

La preparación del preparado tiene lugar conforme al Ejemplo 1, utilizándose en su lugar como componente biocatalítico activo 130 ml de una suspensión al 6% en peso de masa seca de *Saccharomyces cerevisiae* usual en el comercio. Las células enteras de *Saccharomyces cerevisiae* contienen, entre otros, la enzima invertasa (EC 3.2.1.26) del grupo de las hidrolasas de EC 3, que disocia hidrolíticamente sacarosa en fructosa y glucosa. Para investigar la actividad aparente, el preparado se añadió a un reactor de lecho fijo que dispone de tabiques laterales para la toma de muestras. Como educto se utilizó una disolución de sacarosa al 40% (p/p), que se ajustó a un valor

5 del pH de 6. La alimentación del educto tuvo lugar con una LHSV [h⁻¹] de 0,2, la cual se forma por el cociente a base del caudal [m³/h] y el volumen de catalizador [m³] utilizado. Con el fin de alcanzar el estado estacionario en el reactor de lecho fijo, la toma de muestras tuvo lugar tras una fase de alimentación de 72 h. Dado que la toma de muestras tuvo lugar a lo largo de la longitud del reactor, la conversión del educto se puede vigilar a través de la longitud adimensional del reactor x/X [-]. La composición de la muestra se determinó en cada caso con ayuda de analítica de HPLC. Los resultados están representados en la Figura 4.

Ejemplo Comparativo 1 (no de acuerdo con la invención): Preparación de un preparado no de acuerdo con la invención.

10 Preparación de un preparado conforme al documento WO95/22606 (Novo Nordisk A/S): *Method for production of an immobilized enzyme preparation and use of the immobilized enzyme preparation.*

65 g de Celkate T-21 se añadieron en forma de polvo a una mezcladora de alta velocidad. Para ello, se aportaron al polvo de forma continua y con el propulsor en funcionamiento 25 g de caldo de fermentación líquido que contenía sacarosa isomerasa. A continuación, se añaden otros 50 g de caldo de fermentación líquido que contenía sacarosa isomerasa mezclado con polivinilpirrolidona Kollidon K25 al 3% (p/p) (BASF). El granulado resultante se secó durante la noche a temperatura ambiente y se tamizó. El contenido en humedad residual se ajusta a 10%.

Ejemplo Comparativo 2 (no de acuerdo con la invención): Estabilidad mecánica

20 Determinación de la estabilidad mecánica del preparado conforme al Ejemplo Comparativo 1. La medición tuvo lugar análogamente al Ejemplo 1. Los resultados están representados en la Figura 3. El claro desplazamiento del valor d_{10} [μm] demuestra que antes de la incubación el 10% del colectivo de partículas es menor que 784 μm y después de la incubación es menor que 389 μm. Esto explica el que el preparado no de acuerdo con la invención se descomponga en pequeños fragmentos de partículas mediante la sollicitación mecánica en el agitador.

Preparado no conforme a la invención		d_{10} [μm]	d_{50} [μm]	d_{90} [μm]
Muestra 1	en medio – 0 min	784	1024	1355
Muestra 2	en medio – 30 min agitador, 400 RPM	695	1004	1290
Muestra 3	en medio – 60 min agitador, 400 RPM	389	874	1092

REIVINDICACIONES

1. Granulado que contiene
 - A) al menos una enzima elegida de al menos uno de los grupos elegidos de transferasas de EC 2, hidrolasas de EC 3, liasas de EC 4 e isomerasas de EC 5,
 - 5 B) al menos un polímero elegido de polímero de acrilato de alquilo C₁-C₁₀, polímero de metacrilato de alquilo C₁-C₁₀ y copolímero de acrilato de alquilo C₁-C₁₀-metacrilato de alquilo C₁-C₁₀, preferiblemente copolímero de acrilato alquilo C₁-C₁₀-metacrilato de alquilo C₁-C₁₀ y
 - C) al menos un material de soporte inorgánico.
- 10 2. Granulado según la reivindicación 1, caracterizado por que al menos una enzima se elige de al menos uno de los grupos elegidos de glicosiltransferasas de EC 2.4, fructan-β-fructosidasas de EC 3.2.1.80, β-galactosidasa de EC 3.2.1.23, invertasas de EC 3.2.1.26, aspartato-β-descarboxilasa de EC 4.1.1.11, fumarato-hidratasa de EC 4.2.1.2., nitril-hidratasa de EC 4.2.1.84, aspartasas de EC 4.3.1.1, xilosa-isomerasas de EC 5.3.1.5 e isomaltulosa sintasas de EC 5.4.99.11.
- 15 3. Granulado según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la isomaltulosa sintasa se elige del grupo YP_002235756.1, WP_006325065.1, WP_012540141.1, WP_004157672.1, CCO82510.1, CCO82509.1, CCO78715.1, EKF64560.1, AAP57084.1, AAP57083.1, ACI12079.1 y ACF42098.1, así como proteínas con una secuencia de polipéptidos en la que hasta el 60% de los restos aminoácido están modificados frentes a las secuencias de referencia antes mencionadas mediante delección, inserción, sustitución o una combinación de las mismas.
- 20 4. Granulado según al menos una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la isomaltulosa sintasa está contenida en forma de catalizadores de células enteras o en forma de células disgregadas.
5. Granulado según al menos una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el polímero presenta un peso molecular medio ponderal de aproximadamente 100000 a 1500000 g/mol, preferiblemente 500000 a 1000000 g/mol.
- 25 6. Granulado según al menos una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el polímero es un copolímero de acrilato de etilo/metacrilato de metilo, preferiblemente poli(acrilatos de etilo-co-metacrilatos de metilo) 2:1.
- 30 7. Granulado según al menos una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que el material de soporte inorgánico se elige de ácidos silícicos, en particular ácidos silícicos precipitados, y silicatos de aluminio, en particular zeolitas, siendo particularmente preferidos ácidos silícicos precipitados.
8. Granulado según al menos una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que referido al granulado total B) está contenido en una cantidad de 0,1% en peso a 80% en peso, y C) en una cantidad de 20% en peso a 95% en peso.
- 35 9. Granulado según al menos una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que presenta una actividad específica de 1 a 1000 U, referido al peso del granulado total.
10. Procedimiento para la preparación de un granulado, que comprende las etapas de procedimiento
 - 1) provisión de al menos una isomaltulosa sintasa de EC 5.4.99.11, al menos un polímero elegido de polímero de acrilato de alquilo C₁-C₁₀, polímero de metacrilato de alquilo C₁-C₁₀ y copolímero de acrilato de alquilo C₁-C₁₀-metacrilato de alquilo C₁-C₁₀, preferiblemente copolímero de acrilato de alquilo C₁-C₁₀-metacrilato de alquilo C₁-C₁₀, y al menos un material de soporte inorgánico,
 - 40 2) preparación de una pasta que contiene los componentes de la etapa 1) del procedimiento y
 - 3) granulación de la pasta.
11. Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado por que en la etapa 3) del procedimiento, la granulación tiene lugar mediante extrusión, granulación con mezcladora, granulación en lecho fluido, aglomeración en disco, aglomeración por pulverización, granulación por pulverización o compactación.
- 45

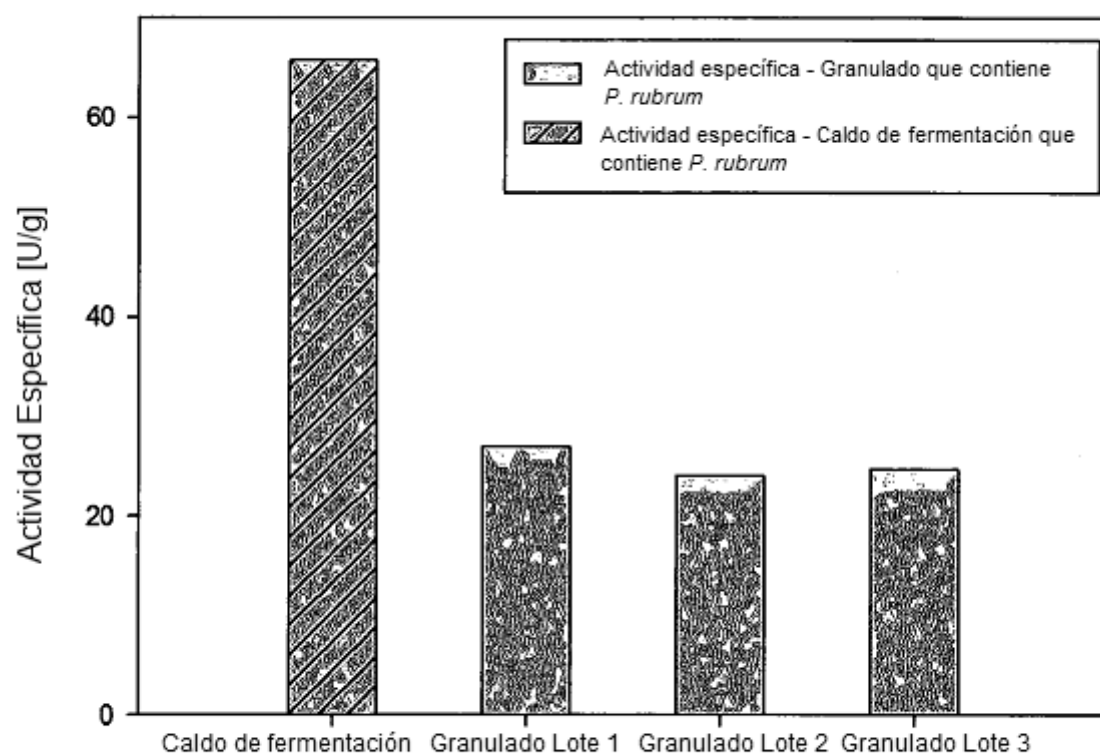


Figura 1

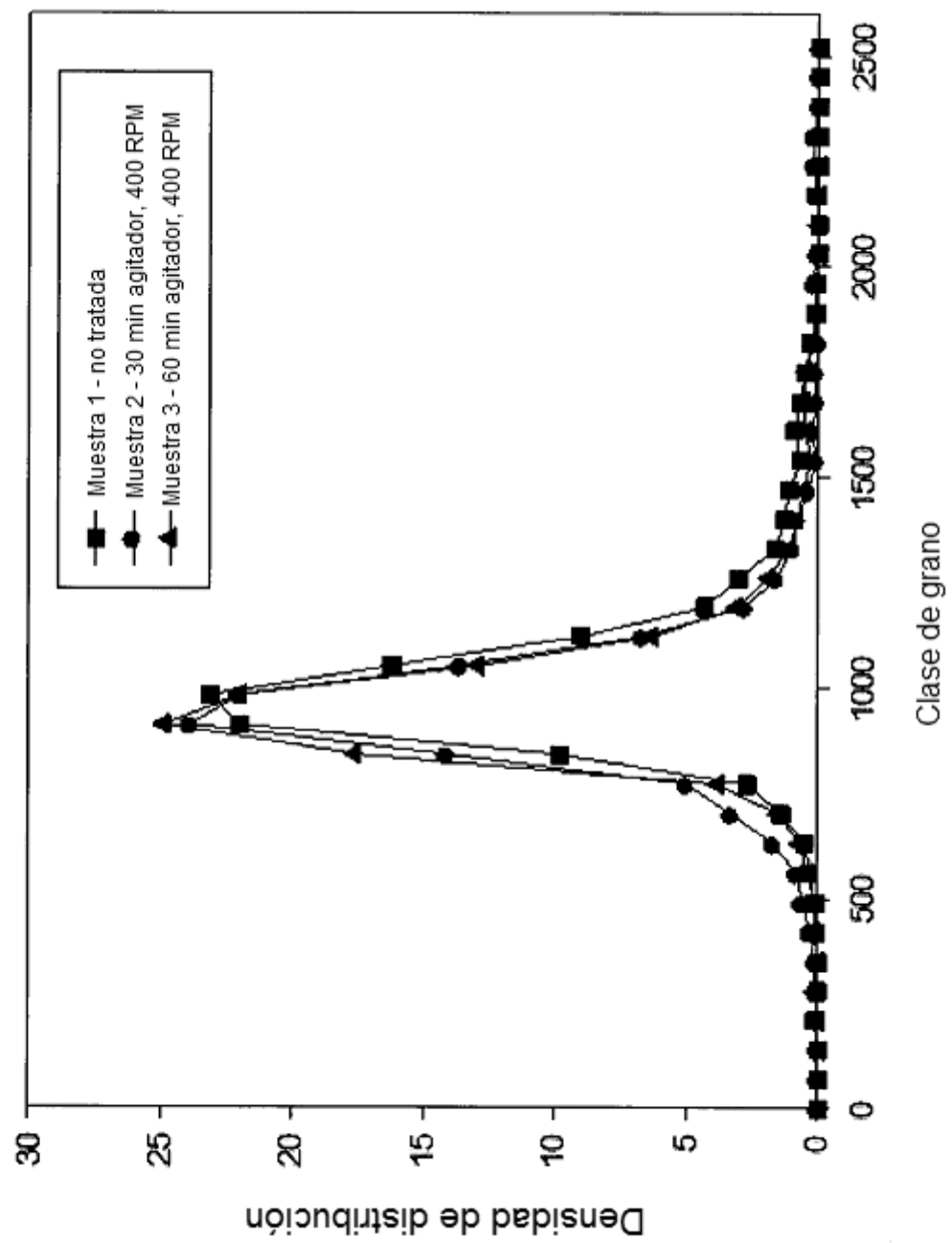


Figura 2

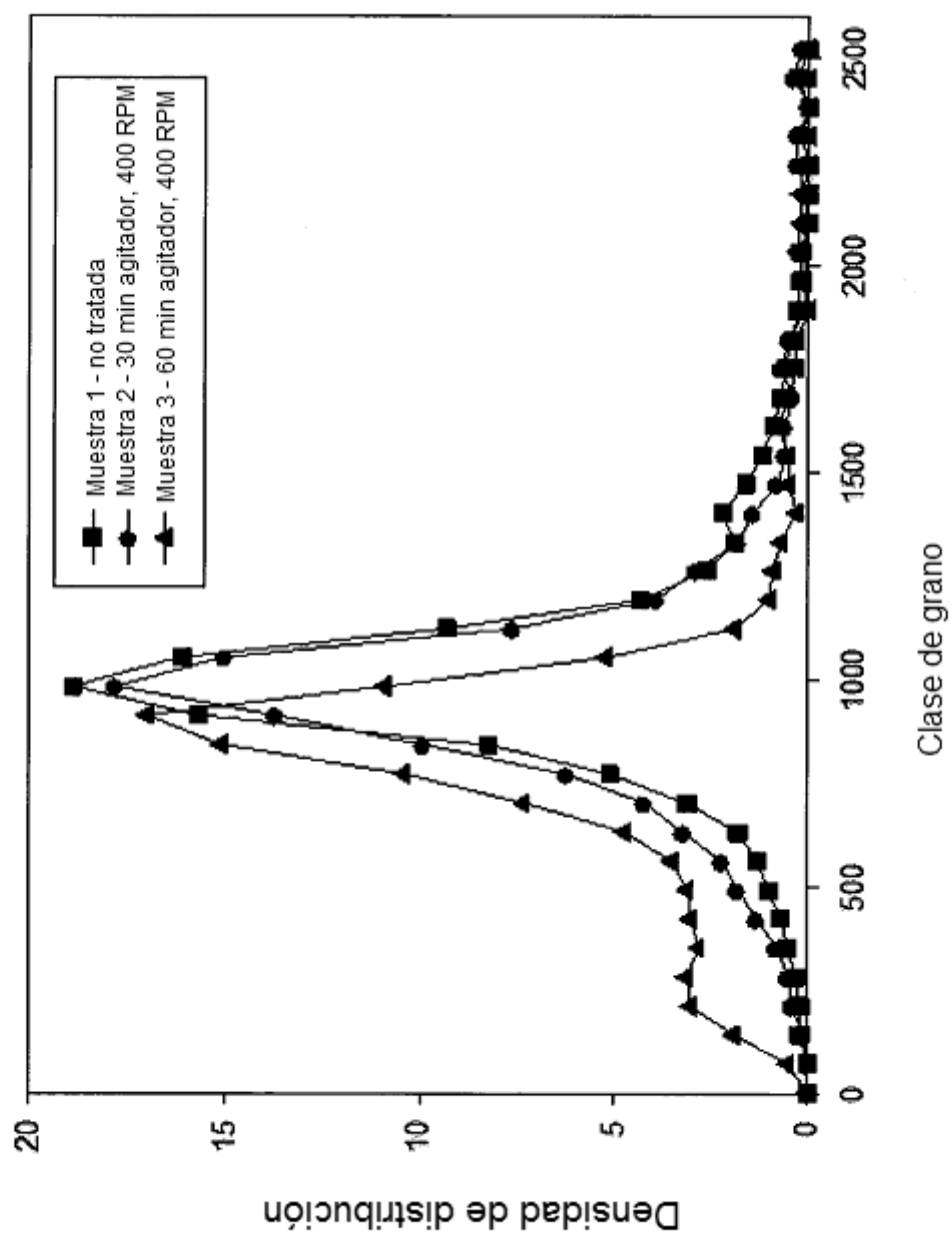


Figura 3

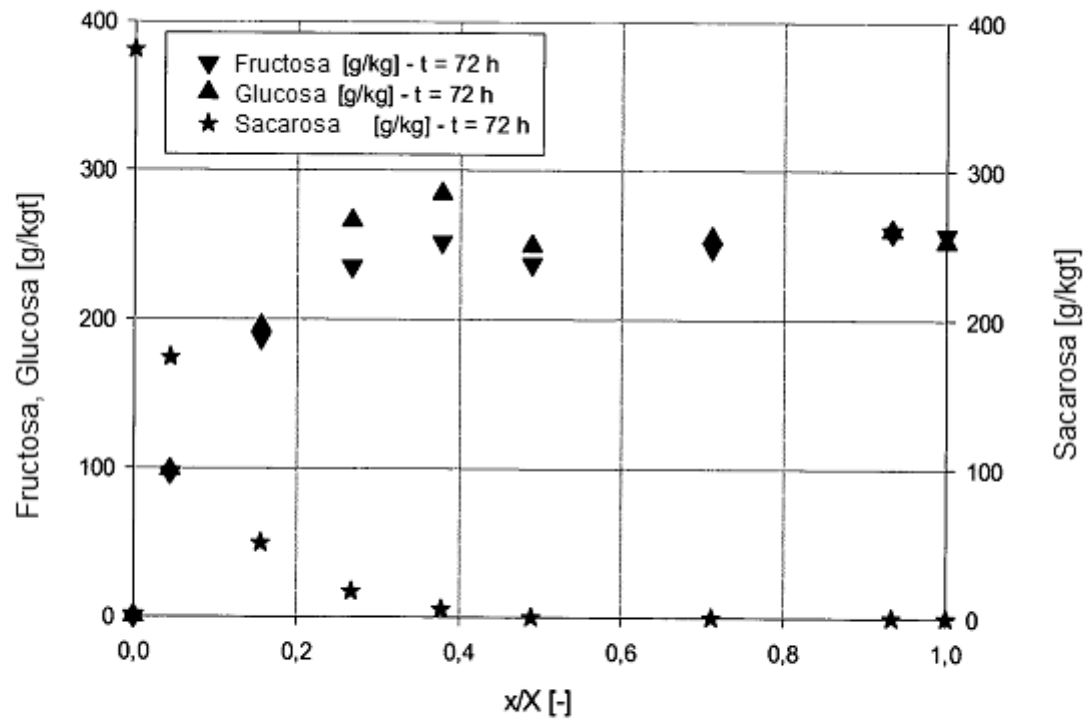


Figura 4