(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 711 819**

(21) Número de solicitud: 201731285

(51) Int. CI.:

C12N 11/14 (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

03.11.2017

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

07.05.2019

(71) Solicitantes:

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO" (UNESP) (50.0%)
Agência UNESP de Inovação - R. Dr. Bento Teobaldo Ferraz, 271 - Bloco II
CEP01140-070 Barra Funda - Sao Paulo BR;
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA (25.0%) y
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) (25.0%)

(72) Inventor/es:

CORMA CANÓS, Avelino;
IBORRA CHORNET, Sara;
CARCELLER CARCELLER, José Miguel;
FILICE, Marco;
BASSAN, Juliana Cristina;
MARTÍNEZ GALÁN, Julián Paul y
MONTI, Rubens

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

(54) Título: **DERIVADO ENZIMÁTICO BASADO EN ENZIMA INMOVILIZADA SOBRE ZEOLITAS LAMINARES**

ES 2 711 819 A1

(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 711 819**

(21) Número de solicitud: 201731285

(57) Resumen:

Derivado enzimático basado en enzima inmovilizada sobre zeolitas laminares.

La presente invención se refiere a un derivado enzimático que comprende una enzima hidrolítica, preferentemente la naringinasa, inmovilizada a través de enlaces covalentes sobre zeolitas laminares, así como a su procedimiento de obtención y sus usos, preferentemente como biocatalizador. La inmovilización de la naringinasa mediante el procedimiento descrito es capaz de incrementar su estabilidad térmica, su estabilidad a diferentes pHs, su actividad catalítica y su afinidad por el sustrato, respecto de la enzima libre sin inmovilizar. Además, el derivado enzimático de la invención es capaz de reutilizarse en más de 20 ciclos consecutivos sin disminuir su actividad catalítica, mostrando una estabilidad catalítica superior a la observada al utilizar otros soportes diferentes.

ES 2 711 819 A1

DESCRIPCION

Derivado enzimático basado en enzima inmovilizada sobre zeolitas laminares

La presente invención, se refiere a una enzima hidrolítica, la naringinasa, tanto la forma comercial como la purificada, inmovilizadas a través de enlaces covalentes sobre zeolitas laminares y su caracterización como biocatalizador. La naringinasa se distingue por ser un complejo con dos actividades una α-ramnosidasa y otra β-glucosidasa capaces de liberar ramnosa y glucosa respectivamente del sustrato. La presente invención otorga al enzima mayor estabilidad térmica, mayor estabilidad frente pH, mayor afinidad por el substrato y aumenta la actividad catalítica.

ANTECEDENTES

En la bibliografía se encuentran ejemplos de naringinasa inmovilizada sobre silicatos mesoporososos como MCM-41 donde la enzima se inmoviliza covalentemente mediante entrecruzamiento con glutaraldehido (Applied Surface Science, (2011), 257: 4096–4099). Una enzima similar llamada β-glucosidasa fue inmovilizada mediante enlaces electrostáticos sobre SBA-15 (J. Porous Mater, (2010), 17:657–662). También se han descrito la utilización de distintos soportes orgánicos como: los films de triacetato de celulosa (Journal of Food Science, (1998), 63: 61–65), soportes de tanin-aminohexilcelulosa (Agric. Biol. Chem., (1978), 42(10): 1847-1853) y virutas de madera (J. Chem. Tech. Biotech., (2005), 80: 1160–1165). Otras estrategias utilizadas en la inmovilización de la naringinasa, han sido la obtención de un sol-gel formado mediante alcohol polivinílico (PVA) (Appl. Biochem. Biotechnol., (2010), 160: 2129–2147; Food Chemistry, (2007), 104: 1177–1182), así como la inmovilización enzimática conocida como atrapamiento del enzima, en bolas de alginato de sodio o calcio (World Journal of Microbiology & Biotechnology, (1999), 15: 501-502; Indian Journal of Chemical Technology, (2003), 10: 701-704; Enzyme Microb. Technol., (1996), 18: 281-285).

Dos aspectos importantes que deben poseer las enzimas soportadas para su uso industrial en aplicaciones biotecnológicas son: que la enzima inmovilizada debe poseer una alta afinidad por el substrato y que además el derivado enzimático debe ser altamente estable, manteniendo su actividad catalítica durante varios ciclos de reacción. A pesar de los múltiples trabajos referentes a inmovilización de naringinasa

sobre diferentes soportes la utilización de estos materiales laminares para inmovilizar covalentemente esta enzima no había sido hasta el momento descrita y probada como biocatalizador.

La inmovilización de la naringinasa sobre materiales silicatados como la MCM-41 se ha llevado a cabo satisfactoriamente, (Applied Surface Science, (2011), 257: 4096–4099) sin embargo en este trabajo se pierde el 65% de la actividad inicial del biocatalizador después de 6 reusos. Otro material utilizado para la inmovilización de una glucosidasa, (J. Porous Mater, (2010), 17:657–662) fue el SBA-15 y en este trabajo se muestra que la enzima pierde afinidad por el substrato (Glc-pNP).

Con respecto a la estabilidad catalítica de los derivados enzimáticos basados en naringinasa inmovilizada sobre diferentes soportes, se ha observado, dependiendo del soporte, una pérdida de actividad tras reúsos consecutivos sobre soportes como: esferas de alginato-PVA (Appl. Biochem. Biotechnol., (2010), 160:2129–2147; PVA-Cryogel (Food Chemistry, (2007),104, 1177–1182), y con otros soportes como adsorción o adsorción/cross-linking con glutaraldehido, (European Food Research and Technology,(2006), 224, 55 –60); (Enzyme and Microbial Technology, (2007), 40, 442–446).

En vista de lo expuesto en los párrafos anteriores, existe en el estado de la técnica la necesidad de proporcionar derivados enzimáticos alternativos capaces de incrementar el rendimiento de los procesos, presentar un incremento en su estabilidad respecto a diferentes temperaturas y pHs, así como de permitir una recuperación sencilla y eficiente de la enzima para futuras reacciones, sin que la actividad y velocidad de la misma se vea disminuida a lo largo de los ciclos de reacción consecutivos a los que se puede someter a dicha enzima.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un derivado enzimático que puede comprender, al menos, una enzima hidrolítica, preferentemente una naringinasa (EC 3.2.1.40) inmovilizada covalentemente sobre zeolitas laminares, preferentemente donde la zeolita se selecciona de entre ITQ2 o ITQ6, más preferentemente la zeolita está funcionalizada con grupos aldehído, dando lugar a GITQ2 o GITQ6. La enzima hidrolítica se selecciona preferentemente de entre cualquiera de la siguiente lista

naringinasa comercial, naringinasa purificada, procedentes del hongo *Penicilliun decumbens*, y combinaciones de las mismas, así como su procedimiento de obtención y uso.

Según la aplicación preferente, se han preparado dos derivados enzimáticos consistentes en la enzima naringinasa comercial (Cruda) o purificada (Pura), inmovilizadas covalentemente sobre zeolitas de estructura laminar (ZD), preferentemente ITQ2, y más preferentemente donde dicha zeolita está funcionalizada, más preferentemente con grupos aldehído, GITQ2. En la presente invención se demuestra que, la enzima naringinasa soportada sobre zeolitas laminares, preferentemente zeolitas laminares funcionalizadas con grupos aldehído, más preferentemente la zeolita es GITQ2, muestra ventajas con respecto a la enzima libre en cuanto a su estabilidad, actividad catalítica y su afinidad por el substrato.

En la presente invención se propone el empleo de zeolitas con elevada superficie externa, como por ejemplo zeolitas laminares como soporte para la inmovilización covalente de la naringinasa, tanto de la enzima comercial como de la enzima purificada. Las zeolitas laminares son materiales cristalinos con un área superficial externa mayor o igual de 350 m^2g^{-1}. Las zeolitas laminares que se utilizan en la presente invención están formadas preferentemente por monoláminas, de 2.5 nm de espesor y biláminas, que presentan una alta superficie externa y accesible (≥ 600 m^2g^{-1}). Las nanocapas están estructuradas por una distribución hexagonal de "copas" presente en ambos lados de las hojas zeolíticas. Estos cálices están delimitados por anillos de 12 miembros, que muestran una abertura externa de, aproximadamente, (0.7 x 0.7) nm estando conectados con las tazas del lado opuesto, en la misma lamina de la zeolita, a través de un prisma hexagonal doble con anillos de 6 miembros. Adicionalmente, canales sinusoidales delimitados por anillos de 10 miembros están presentes alrededor de los cálices, a lo largo de la parte interna de cada capa individual. Para inmovilizar la enzima, estos soportes han sido modificados mediante el anclaje de grupos aldehído, con los que las enzimas pueden reaccionar dando lugar a enlaces covalentes, formando así una capa de enzima estable limitando además la lixiviación de la enzima en el medio de reacción.

Según la presente invención, la purificación del enzima naringinasa consta de un sólo paso de purificación utilizando cromatografía de intercambio iónico por la técnica de

"batch". Estas condiciones permiten la completa separación y purificación de la naringinasa presente en el extracto comercial de partida.

La funcionalización de la zeolita laminar con grupos aldehído se realiza mediante el tratamiento del material, previamente activado a vacío a 200°C durante 2h, con 3-aminopropiltrietoxisilano en una proporción en peso zeolita/3-aminopropiltrietoxisilano de entre 0.1–15 a reflujo de tolueno anhidro durante 1 a 72 h a 50-200°C. Posteriormente, el sólido se filtra y se lava con tolueno y hexano, y tras su secado a 25^{o}C se obtiene el material funcionalizado con grupos amino (material N-ZD). La funcionalización con grupos aldehído se realiza por tratamiento bajo agitación magnética del material N-ZD con un tampón NaH_2P0_4 a pH=7-10 de concentración 25-200mM que contiene glutaraldehido en un porcentaje entre 1-95% a temperatura ambiente durante un periodo comprendido entre 5-48 h. Transcurrido este tiempo, el material se filtra y se lava con una disolución tampón NaH_2PO_4 de concentración 25-500mM a pH=7-10. El material se seca posteriormente a la temperatura de 25°C obteniéndose así la zeolita laminar funcionalizada con grupos aldehído (G-ZD). En una realización preferida, la zeolita laminar funcionalizada con grupos aldehído es la GITQ2.

Para esta invención se observó que al soportar la enzima naringinasa sobre la zeolita laminar ITQ2 (GITQ2), la enzima no solo mantiene su actividad sino que también presenta características catalíticas mejores con respecto a las reportadas para otros soportes. Estas mejoras son: una afinidad por el sustrato superior al enzima libre y superior a otros derivados enzimáticos previamente descritos en bibliografía (ver Tabla 1) y además presenta una estabilidad catalítica superior a la observada con otros derivados enzimáticos basados en la naringinasa inmovilizada sobre otros soportes.

Tal y como se ha comentado anteriormente, el derivado enzimático ha demostrado tener una actividad relativa superior al de la enzima libre. Por ejemplo, a pH entre 4 y 6, la actividad relativa es 5-17% superior a la de la enzima libre. La actividad relativa máxima de la enzima según la presente invención corresponde a un pH de incubación entre 4 y 5. Además, la temperatura también puede afectar a la actividad relativa. Según una realización preferente, el derivado enzimático tiene una actividad relativa superior al 30-70% a 50°C y superior al 70-80% a 90°C siendo su actividad relativa máxima en un rango de temperaturas preferentemente entre 50°C y 80°C.

Además, según lo descrito en la presente invención, el derivado enzimático también ha demostrado tener una mayor estabilidad catalítica que la enzima libre. Así, el derivado enzimático posee una estabilidad catalítica entre 80°C y 100°C superior al enzima libre cruda y pura. Concretamente, puede tener una estabilidad catalítica a 80°C entre un 7 y un 9% superior a la enzima libre pura y cruda respectivamente y 100% superior a la enzima libre cruda y pura a una temperatura de 100°C. Según la presente invención, el derivado enzimático puede tener una constante de Michaelis-Menten (Km) entre 0.1 y 1mM. Además, el derivado enzimático puede presentar alta afinidad por el substrato específico, con una K_M inferior para la enzima libre (cruda y pura).

Es importante resaltar que el derivado enzimático, según la presente invención, se puede reutilizar. Concretamente, se puede emplear en más de 20 ciclos sin disminuir su actividad catalítica. Después de cada ciclo de reacción, el derivado enzimático es lavado con la disolución tampón y reutilizado en una nueva reacción.

Así, un primer aspecto de la invención se refiere a un derivado enzimático caracterizado por que comprende al menos una enzima naringinasa (EC 3.2.1.40) inmovilizada covalentemente sobre un soporte de zeolitas de estructura laminar.

En una realización preferida el derivado enzimático se caracteriza por que la naringinasa procede del hongo *Penicilium decumbens*.

En otra realización preferida, la naringinasa se selecciona de la lista que consiste en naringinasa comercial, naringinasa purificada o combinaciones de las mismas.

En otra realización preferida, el derivado enzimático de la invención se caracteriza por que la zeolita de estructura laminar se selecciona entre ITQ2 o ITQ6.

En otra realización preferida, el derivado enzimático de la invención se caracteriza por que la naringinasa está en una relación en peso enzima:soporte de entre 0.2 a 300 mg de enzima por gramo de soporte, más preferentemente de entre 0.2 a 70 mg de enzima por gramo de soporte.

En otra realización preferida, el derivado enzimático de la invención se caracteriza por que tiene una K_M entre 0.1 y 1mM.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al procedimiento de obtención del derivado enzimático descrito anteriormente y que puede comprender, al menos, las siguientes etapas:

a) Contactar el soporte de zeolita laminar con un compuesto derivado de un aminoalquiltrietoxisilano,
b) Filtrar, lavar y secar el soporte obtenido en la etapa a),
c) Funcionalizar el soporte de la etapa b) con grupos aldehído,
d) Filtrar, lavar y secar el soporte funcionalizado obtenido en la etapa c),
e) Disolver la enzima naringinasa (EC 3.2.1.40) en una solución tampón,
f) Contactar el soporte de la etapa d) con la enzima de la etapa e),
g) Filtrar, lavar y secar el derivado enzimático obtenido en la etapa f).

En una realización preferida, el procedimiento de obtención del derivado de la invención se caracteriza por que la relación en peso de la zeolita laminar: 3-aminopropiltrietoxisilano de la etapa a) varía entre 0.1 a 15

En otra realización preferida, el procedimiento de obtención del derivado de la invención se caracteriza por que el derivado de aminoalquiltrietoxisilano de la etapa a) es preferentemente 3-aminopropiltrietoxisilano.

En otra realización preferida, el procedimiento de obtención del derivado de la invención se caracteriza por que la etapa a) se lleva a cabo durante un tiempo de entre 1 a 72 h, preferentemente 24h y a una temperatura de entre 50ºC a 200ºC, preferentemente 120ºC.

En otra realización preferida, el procedimiento de obtención del derivado de la invención se caracteriza por que se lleva a cabo en presencia de tolueno y hexano. En otra realización preferida, el secado de la etapa b) se lleva a cabo a una temperatura de 25ºC.

En otra realización preferida, el procedimiento de obtención del derivado de la invención se caracteriza por que la funcionalización de la etapa c) se realiza mediante el tratamiento del soporte con glutaraldehido en un porcentaje preferido de entre 1-95%, en presencia de una solución tampón, preferentemente NaH_2P0_4, a una concentración preferentemente de entre 25 a 200 mM y un pH preferido de entre 3 a 11, más preferentemente de entre 7 a 10, a temperatura ambiente, mediante agitación magnética y durante un tiempo preferido de entre 5-48h.

En otra realización preferida, el procedimiento de obtención del derivado de la invención se caracteriza por que el lavado de la etapa d) se lleva a cabo en una disolución tampón preferentemente de NaH_2PO_4, a una concentración preferentemente de entre 25 a 500 mM y a un pH preferido de entre 7 a 10.

En otra realización preferida, el procedimiento de obtención del derivado de la invención se caracteriza por que la enzima naringinasa de la etapa e) se disuelve en una solución tampón a una concentración de entre 1 a 200 mM y a un pH de entre 3 a 11.

En otra realización preferida, el procedimiento de obtención del derivado de la invención se caracteriza por que la etapa f) se lleva a cabo en agitación durante un tiempo de entre 0.1 a 24 horas y a una temperatura de entre 4ºC a 80ºC, preferentemente entre 25ºC a 50ºC.

En otra realización preferida, el procedimiento de obtención del derivado de la invención se caracteriza por que la relación enzima:soporte está entre 0.2 y 300 mg de enzima por gramo de soporte, preferentemente está entre 0.2 a 70 mg de enzima por gramo de soporte.

Los derivados enzimáticos de naringinasa (cruda y purificada) inmovilizados sobre G-ZD, preferentemente sobre ITQ2 (GITQ2), se obtuvieron al poner en contacto la enzima correspondiente con el soporte en una relación enzima/soporte entre 0.2 y 300 mg de enzima por gramo de soporte, en una disolución tampón con una concentración entre 1 y 200 mM. La mezcla se sometió a una agitación suave a un pH entre 3 y 11, preferentemente entre 7 y 10. La incubación de la enzima con el soporte se realiza por un tiempo entre 0.1 y 24 h a una temperatura entre 4 y 80 ^oC, preferentemente entre 25-50^oC. Los materiales obtenidos se caracterizaron y se evaluaron las condiciones óptimas de reacción, pH, Tª y estabilidad térmica. También se estudiaron parámetros cinéticos para determinar la afinidad de los derivados enzimáticos por el sustrato.

Por “sustrato" se entiende cualquier sustancia que contenga un precursor de naturaleza glicosídica de un componente de azúcar como ramnosa y glucosa.

De los valores de K_M obtenidos, se dedujo que la afinidad por el sustrato de los materiales sintetizados, es mayor que el de los enzimas (cruda y pura) en forma libre.

La K_M aparente de la naringinasa libre e inmovilizada sobre diferentes soportes o materiales ha sido calculada por varios autores con el fin de valorar la afinidad por el sustrato. Para poder comparar el incremento de la afinidad de la naringinasa (cruda y pura) inmovilizada sobre G-ZD, donde la ZD es preferentemente ITQ2 (GITQ2), con otros soportes, se ha calculado el cociente entre la K_M de la enzima libre y la K_M del enzima inmovilizada (CK_M). El valor de este cociente muestra que la afinidad por el substrato es mayor para los derivados enzimáticos de la presente invención, que la afinidad descrita en el caso de la inmovilización de naringinasa sobre otros materiales (ver Tabla 1).

Tabla 1. Cocientes de la K_M

Referencia	**K. (mM)**		**CK_M**	**Soporte Utilizado**
	Libre	**Inmovilizada**		
J. Food Sci., (1998), 63: 61–65	3.60	2.10	1.71	Films de Celulosa(CTA)
Appl. Biochem. Biotechnol., (2010), 160:2129-2147	0.23	0.35	0.65	Alcohol polivinílico (PVA)
Enzyme Microb. Technol., (1996), 18: 281-285	8.40	10.00	0.84	Bolas de Alginato de Calcio
J. Chem. Tech. Biotech., (2005), 80: 1160–1165	5.00	2.00	2.50	Virutas de Madera
Agric. Biol. Chem., (1978), 42(10): 1847-1853	0.64	0.53	1.21	Tanino-Celulosa
Derivado enzimático de la presente invención	**1.87**	**0.32**	**5.84**	**GITQ2-Enzima cruda**
Derivado enzimático de la presente invención	**1.80**	**0.16**	**11.25**	**GITQ2-Enzima pura**

CK_M = Cociente entre la K_M de la enzima libre y la K_M de la enzima inmovilizada

Otro aspecto de la invención se refiere al procedimiento de hidrólisis de glicósidos en presencia del derivado enzimático de la invención, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

a) Disolver al menos un glicósido en una disolución tampón a pH de entre 4 a 7 y a una temperatura de entre 50 a 70ºC durante al menos 10 minutos, preferentemente bajo agitación.
b) Enfriar la disolución de la etapa a),
c) Contactar el derivado enzimático de la invención con la disolución de la etapa b),
d) Calentar la mezcla del apartado c) a una temperatura comprendida de entre 50 a 100ºC, durante un tiempo comprendido entre 5 a 60 minutos,
e) Separar mediante centrifugación el sólido de la etapa d) y lavarlo en una solución tampón,
f) Recuperar el sobrenadante de la etapa d) y analizar su composición.

En una realización preferida del procedimiento de hidrólisis, éste se caracteriza por que glicósidos se seleccionan de la lista que comprende flavonoides, ramnolípidos y glicopéptidos. En otra realización más preferida, los flavonoides se seleccionan de la lista que comprende naringina, hesperidina y/o combinaciones de los mismos. En otra realización más preferida aún, el flavonoide es naringina.

En otra realización preferida del procedimiento de hidrólisis, éste se caracteriza por que la relación en peso glicósido:enzima, considerando la cantidad de enzima sobre el soporte, varía de 2 a 10, preferentemente de 2 a 5.

En otra realización preferida del procedimiento de hidrólisis, éste se caracteriza por que la temperatura de la etapa d) varía de entre 50 a 80ºC.

En otra realización preferida del procedimiento de hidrólisis, éste se caracteriza por que el tiempo de la etapa d) varía de entre 5 a 30 minutos.

En otra realización preferida del procedimiento de hidrólisis, éste se caracteriza por que el sólido obtenido en la etapa e) comprende el derivado enzimático de la invención, el cual puede volver a reutilizarse.

En otra realización preferida del procedimiento de hidrólisis, éste se caracteriza por que el sobrenadante de la invención comprende los compuestos hidrolizados, preferentemente flavonoides, azúcares libres y glicósidos intermedios.

En otra realización preferida del procedimiento de hidrólisis de glicósidos, este se caracteriza por que cuando se utiliza el derivado de la invención que comprende la naringinasa cruda, la composición molar de flavonoides, azucares libres y glicósidos intermedios, está comprendida entre un 10 y 25 % molar de flavonoides, un 25-60% de azúcares libres y un 10-25% de glicósidos intermedios.

En otra realización preferida del procedimiento de hidrólisis de glicósidos, este se caracteriza por que cuando se utiliza el derivado de la invención que comprende la naringinasa pura, la composición molar de flavonoides, azucares libres y glicósidos intermedios está comprendida entre un 3 y 10% molar de flavonoides, un 30-60% de azúcares libres y un 25-40% de glicósidos intermedios.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del derivado enzimático descrito aquí como biocatalizador.

El término “biocatalizador”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier entidad biológica, preferentemente una enzima, capaz de catalizar la conversión de un sustrato en un producto, en este caso la biotransformación de glicósidos en azúcares.

El término "biocatalizador inmovilizado" hace referencia a enzimas, que se encuentran en un estado tal que permiten su reutilización. Se relaciona con el confinamiento físico de un enzima de modo que su actividad catalítica se retiene y puede ser reutilizado. En una realización preferida de la presente invención, el biocatalizador inmovilizado es un enzima.

La presente invención también se refiere al uso del derivado enzimático descrito en la presente invención para la hidrólisis selectiva de sustratos, preferentemente glicósidos, más preferentemente glicósidos que se seleccionan de la lista que consiste en glicósidos flavonoides, glicósidos rammnolípidos y glicopéptidos, más preferentemente glícósidos flavonoides.

Según una realización preferente, el sustrato puede ser un glicósido flavonoide seleccionado preferentemente entre naringina, hesperidina, rutina y combinaciones de los mismos, y más preferentemente es naringina.

En otra realización preferida, el uso del derivado de la invención para la hidrólisis de glicósidos, se lleva a cabo a cabo a un pH de entre 4 a 7, preferentemente entre 4 a 5. En otra realización preferida, la hidrólisis se lleva a cabo a una temperatura de entre 50ºC a 100 ºC, preferentemente de entre 50ºC a 80ºC.

Según una realización particular, cuando el derivado enzimático proviene de la naringinasa purificada, aumenta la actividad α-ramnosidasa obteniéndose preferentemente ramnosa y prunina en la hidrólisis de naringina.

Según otra realización particular, cuando el derivado enzimático proviene de la naringinasa del hongo *Penicilliun decumbens* comercial (sin purificar), la actividad β-glucosidasa y α-ramnosidasa son similares (50/50) obteniéndose tras la hidrólisis de la naringinasa, preferentemente ramnosa, glucosa y naringenina.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Molécula p-Nitrofenil-alpha-L-Ramnopiranósido (Rha-pNP).

Figura 2. Molécula p-Nitrofenil-β-D-glucósido (Glc-pNP).

Figura 3. SDS-PAGE. 1-Patron de masa molecular; 2-Naringinasa Comercial; 3-Naringinasa Pura.

Figura 4. Proceso de inmovilización de la enzima comercial sobre el soporte GITQ2.

Figura 5. Gráfica de la inmovilización de la enzima pura sobre el soporte GITQ2.

Figura 6. Reacción de hidrólisis del p-Nitrofenil-β-D-glucósido (Glc-pNP).

Figura 7. Reacción de hidrólisis del p-Nitrofenil-alpha-L-Ramnopiranósido (Rha-pNP).

Figura 8. Gráfica de Lineweaver-Burk para determinar la K_M de la naringinasa cruda en forma libre e inmovilizada.

Figura 9. Gráfica de Lineweaver-Burk para determinar la K_M de la naringinasa pura en forma libre e inmovilizada.

Figura 10. Estabilidad catalítica del derivado enzimático comercial en la hidrólisis de la naringina.

Figura 11. Estabilidad catalítica del derivado enzimático purificado en la hidrólisis de la naringina.

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos que no pretenden ser limitantes:

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Síntesis de la zeolita laminar ITQ2

Síntesis de la zeolita MWW (MCM-22) pura sílice.

Se mezclan 113.34 g de una disolución acuosa de hidróxido de N,N,N-trimetil-1-adamantamonio (7.5% peso) con 26.9 g de agua y 5.12 g de hexametilenimina (Sigma- Aldrich). Posteriormente, se añaden 0.97 g de cloruro sódico y 10 g de sílice (Aerosil 200, Degussa) a la mezcla, manteniendo el gel resultante en agitación durante 30 minutos. Finalmente, el gel se transfiere a un autoclave con funda de Teflón, y se calienta a una temperatura de 150°C durante 9 días en dinámico (60 rpm). El sólido obtenido tras la cristalización hidrotermal es filtrado y lavado con abundante agua, y finalmente secado a 100°C.

Preparación de la zeolita ITQ2 pura sílice

La síntesis del material ITQ2 se llevó a cabo de la siguiente manera: se dispersaron 5 g de la zeolita pura sílice MWW sintetizada anteriormente en 20 g de agua. Entonces, se añaden 100 g de una disolución acuosa de hidróxido de hexadeciltrimetilamonio (25% en peso, 50% de intercambio Br/OH), y 30 g de otra disolución acuosa de tetrapropilamonio (40% en peso, 30% de intercambio Br/OH). La mezcla resultante (pH 12.5) se calienta a 55°C y se agita vigorosamente durante 16 h para facilitar el hinchamiento entre láminas zeolíticas. En este punto, la suspensión se trata en un baño de ultrasonidos (50 W, 50 Hz) durante 1 h para dispersar las láminas zeolíticas. Mediante la adición de HCl (6M), se disminuye el pH hasta aproximadamente 3, para facilitar la floculación del sólido deslaminado, el cual es recuperado por centrifugación. Una vez lavado con agua destilada y, posteriormente, secado a 60 °C durante 12 h, el

sólido se trata a 540°C, primero durante 3 h en atmósfera de N_2, y después durante 6 h en aire.

Preparación de la zeolita ITQ6 pura sílice

La síntesis del material ITQ6 se llevó a cabo de la siguiente manera: 10 g de sílice (Aerosil 200, Degussa), 2.3 g de alúmina (boehmita, Catapal B), 9.2 g de NH_4F (Aldrich, 98% de pureza), 3.1 g de HF , 49,8% de concentración), 26 g de 4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (Fluka, 98% de pureza) y 27.9 g de agua desionizada MiliQ en un autoclave a 175ºC durante 5 días. El producto resultante, después de ser filtrado, lavado 3 veces con agua y secado a 60ºC, se suspendió en una solución acuosa de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTA + Br-) e hidróxido de tetrapropilamonio (TPA + OH-) y se sometió a reflujo durante 16 h a 95ºC. La deslaminación se realizó colocando la suspensión en un baño de ultrasonidos (50 W, 40 kHz) durante 1 h, manteniendo un pH de 12.5 y 50ºC. Finalmente, la fase sólida se lavó minuciosamente con agua, se secó a 100ºC y se calcinó a 580ºCdurante 7 h produciendo ITQ6.

Ejemplo 2. Funcionalización de las zeolitas ITQ2 o ITQ6 con grupos aldehído.

En primer lugar se activa la zeolita (500mg), bien ITQ2 o ITQ6, a 200°C en vacío durante 2h. A temperatura ambiente se le añade al sólido 50mL de tolueno anhidro y 240µL de (3-aminopropil)trietoxisilano y la mezcla se mantiene a reflujo durante 24 h a 120°C. Transcurrido este tiempo, el sólido se filtra en vacío y se lava con tolueno y n-hexano, obteniéndose el material funcionalizado con grupos amino (N-ITQ). Para la funcionalización con grupos aldehído, la zeolita N-ITQ (0.5 g) se coloca en contacto con 20mL de una disolución de tampón NaH_2P0_4 a pH=7 200mM, con un 10% de glutaraldehido y se mantiene bajo agitación magnética durante 24 h. Transcurrido este tiempo el sólido se filtra y se lava con una disolución buffer de NaH_2PO_4 (25mM) a pH=7. Posteriormente el material se seca a la temperatura de 25°C, obteniéndose el material GITQ, preferentemente GITQ2 o GITQ6, funcionalizado con grupos aldehído.

Ejemplo 3. Purificación de la naringinasa y electroforesis de la enzima comercial y de la fracción purificada.

La naringinasa comercial (Cruda) fue purificada obteniéndose la fracción naringinasa (Pura). La naringinasa comercial (Cruda) presenta actividad α-ramnosidasa y β-

glucosidasa, al purificarla se aumenta la actividad α-ramnosidasa y la actividad β-glucosidasa se disminuye considerablemente, aumentando de esta forma la selectividad del biocatalizador.

Método de purificación:

500 mg de naringinasa comercial (Cruda) fueron dializados en 50mL de agua miliQ durante 24h a una temperatura de 5°C. Posteriormente se incorporó a una resina de intercambio iónico (DEAE-Sephacel Pharmacia, Suecia) equilibrada con tampón fosfato (NaH_2PO4/Na_2HPO_4) 5mM, pH 6.8. La mezcla se dejó en agitación con rodillos en un frasco cerrado durante una hora. Las proteínas ligadas a este gel se eluyeron con un gradiente de sal. Una solución (50 mL) de NaCl 0.1 M desorbe selectivamente la proteína (Pura) retenida, obteniéndose la naringinasa pura. Los resultados de la purificación se muestran en la Tabla 2. Esta tabla muestra que al inicio de la purificación la naringinasa contiene las dos actividades (α-ramnosidasa y β-glucosidasa) en un 50/50 aproximadamente y que después de la purificación muestra una caída considerable de la actividad de la β-glucosidasa.

Para medir la actividad enzimática de la naringinasa cruda y pura se utilizaron sustratos sintéticos: p-Nitrofenil-alpha-L-Ramnopiranósido (Rha-pNP) y p-Nitrofenil-β-D-glucopiranosido (Glc-pNP). En la Tabla 2 puede observarse como la actividad ramnosidasa por mg de enzima ha aumentado considerablemente tras la purificación.

Tabla 2. Actividad glucosidasa y ramnosidasa de la naringinasa en función del grado de purificación

Etapas	Proteína (mg/mL)	Actividad Ramnosidasa (mU/mL)	Actividad Glucosidasa (mU/mL)	Actividad Ramnosidasa (mU/mg)	Actividad Glucosidasa (mU/mg)
Naringinasa cruda	0.181	42.92	47.72	237.10	263.63
Naringinasa pura	0.196	43.98	48.06	224.37	245.20
DEAE-Sephacel	**0.098**	**41.39**	**4.66**	**422.32**	**47.53**

Los enzimas puro y crudo fueron sometidos a una técnica de electroforesis sobre gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Como se puede observar en la Figura 3, la disolución de enzima pura con actividad ramnosidasa mostró una sola banda electroforética (SDS-PAGE) con un peso molecular aproximadamente de 66 KD (SDS-PAGE) (Figura 3).

Ejemplo 4. Inmovilización de la naringinasa comercial (Cruda) y de la naringinasa purificada (Pura).

La inmovilización de la enzima naringinasa, tanto la cruda, como la pura, sobre el soporte GITQ2 se realiza poniendo en contacto 100mg de soporte con 3mg de enzima, cruda o pura, en 3mL de tampón fosfato a pH 7, sometidos a agitación suave durante 24h.

Para determinar el grado de inmovilización con el tiempo de contacto, se tomaron diferentes alícuotas del sobrenadante que fueron analizadas según el método Bradford de determinación de proteínas. Para ello a cada alícuota de 0.1mL de muestra se le añade 1mL de disolución Bradford, se agita la muestra y tras 10 min, se determina la densidad óptica mediante espectrofotometría a una λ=595nm. En las Figuras 4 y 5 se muestra la desaparición de la enzima del sobrenadante para la naringinasa cruda y pura respectivamente, mostrando en ambos casos que la inmovilización de la enzima es total tras 24h de tiempo de contacto.

Ejemplo 5. Determinación de las actividades enzimáticas.

(Actividad relativa Unidades/mg Proteína)
1 Unidad enzimática de actividad corresponde a la liberación de 1 µmol de pNP por minuto.

Las actividades de la naringinasa pura y cruda se determinaron incubando la enzima (0.05 mL de solución de enzima libre o derivado enzimático (1mg proteina/mL) con 0.05 mL (5 mM) del sustrato específico Rha-pNP o Glc-pNP según el caso, en 0.7ml de tampón citrato 50 mM (pH 4.5) a 50 °C durante 5 minutos. La liberación de p-nitrofenol se estima añadiendo 0.8 ml de carbonato sódico 1 M sobre la mezcla y posteriormente determinando la densidad óptica a 405 nm.

Ejemplo 6. Determinación de la actividad catalítica en función de la temperatura de incubación.

(Actividad relativa Unidades/mg Proteína)

1 Unidad enzimática de actividad corresponde a la liberación de 1 µmol de pNP por minuto.

La actividad α-ramnosidasa de las enzimas (cruda y pura) en forma libre e inmovilizada se determinó tras la incubación del medio de reacción (Ejemplo 5) a diferentes temperaturas que varían entre 30°C-100°C. Una unidad enzimática de actividad corresponde a la liberación de 1 µmol de pNP por minuto. La actividad relativa en función de la temperatura de incubación se muestra en la Tabla 3. Como se observa, en general las actividades de las enzimas inmovilizadas fueron menos afectadas por las diferentes temperaturas de incubación, lo que demuestra que la inmovilización tiene un importante efecto sobre la estabilización de la estructura tridimensional de la naringinasa.

Tabla 3. Temperatura óptima naringinasa libre (Cruda y Pura) e inmovilizada.

Catalizador	**Actividad Relativa%**	
	30(°C)	**80(°C)**
Libre Cruda	11	53
Libre Pura	13	50
GITQ2-Cruda	55	80
GITQ2-Pura	61	85

Ejemplo 7. Determinación de la actividad catalítica en función del pH de incubación.

Las enzimas (cruda y pura) en forma libre e inmovilizada se incubaron en presencia del substrato Rha-pNP, en un tampón universal (McIlvaine) de un pH variable de 3.0 a 8.0. Una unidad enzimática de actividad corresponde a la liberación de 1 µmol de pNP por minuto. Las medidas de las actividades se realizaron para los distintos valores de

pH de incubación bajo las condiciones descritas al principio de esta sección (Ejemplo 5). La actividad en función del pH se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. pH Óptimo Naringinasa libre e inmovilizada

Catalizador	Actividad Relativa%	
	pH=4	pH=6
Libre Cruda	90	40
Libre Pura	90	47
GITQ2Cruda	95	48
GITQ2-Pura	78	53

Ejemplo 8. Estabilidad de la actividad catalítica en función de la temperatura de incubación.

Las enzimas libres (pura y cruda) e inmovilizadas (pura y cruda) fueron incubadas por separado por un periodo de una hora, en tampón (citrato de sodio 50 mM pH 4.5) a temperaturas entre 30-100°C, posteriormente se añade el sustrato Rha-pNP y se somete a ensayo de actividad en las condiciones del Ejemplo 5. Como se puede observar en la Tabla 5 a mayor temperatura la actividad de las enzimas inmovilizadas sobre GITQ2 es considerablemente mayor que la de las enzimas libres.

Tabla 5. Estabilidad térmica naringinasa libre e inmovilizada.

Catalizador	Actividad Relativa%	
	30°C	80°C
Libre Cruda	100	80
Libre Pura	100	83
GITQ2Cruda	100	88
GITQ2-Pura	100	90

Ejemplo 9: Cálculo de las constantes de Michaelis (K_M)

Las enzimas (cruda y pura) en forma libre e inmovilizada se incubaron con el sustrato específico Rha-pNP, manteniendo constante el tiempo de reacción, y variando las concentraciones de sustrato. Las constantes K_M se determinaron mediante el método de Lineweaver-Burk.

Como se puede observar tanto la naringinasa cruda como pura inmovilizadas sobre GITQ2 poseen valores de K_M inferiores a las correspondientes a la enzima libre, con lo que se muestra el aumento de la afinidad por el sustrato al inmovilizar la enzima.

Ejemplo 10: Estabilidad frente a lixiviado en gradiente de sal.

Con objeto de determinar si la inmovilización de la enzima era a través de enlaces covalentes se sometió al derivado enzimático a un gradiente de sal. Para ello, se realizaron tres inmovilizaciones de la enzima cruda sobre el GITQ2, a tres pH diferentes (4.5, 7 y 10) y tras comprobar que en los casos de pH 7 y 10 la inmovilización de la enzima era del 100-95 %, se realizaron dos gradientes de sal a 0.5M y a 1M. Como se observa en la Tabla 6, al pH de inmovilización de 7 la cantidad de proteína desorbida del material es 0, ello indica que a estos pH el enlace entre la enzima y el soporte es a través de enlaces covalentes.

Tabla 6. Desorción de proteína frente a gradiente de NaCl

GITQ2-Enzima Cruda				
pH inmovilización	**%Proteína inmovilizada**	***Proteína desorbida 0.5 M**	***Proteína desorbida 1 M**	**%Proteína desorbida**
4.5	60	9	6.8	23
7	100	0	0	0
10	95	4.2	0	4

*Expresado en µgEnzima/mL

Ejemplo 11. Hidrólisis de la naringina

La hidrólisis de la naringina se realizó incubando el derivado enzimático con 8.6 mM de naringina en 3 mL de buffer citrato pH=4.5 50 mM a 50°C y 750 revoluciones por minuto durante 30 minutos.

Los azúcares se determinaron por HPLC (Waters 1525 Binary HPLC Pump) utilizando un detector (Índice de refracción waters 2410) con una columna (ICE-COREGEL 87H3), en modo isocrático de agua acidificada H2SO4 (4mM) y un flujo 0.6 ml/min a 75ºC. La muestra del crudo de reacción es diluida con el patrón fructosa (previa calibración) y filtrada con filtros de 0.22 µm Nylon. Los flavonoides naringina, prunina y naringenina, se determinan mediante HPLC. Para ello el crudo de reacción se diluyó en etanol, y se filtró con filtros de 0.22 µm Nylon y se analizó por HPLC (Shimadzu LC-20ADXR Liquid Chromatograph) utilizando un detector Diode Array Detector SPD-M20A (λ=280nm). La columna utilizada fue una Mediterranean SEA 185µm 25 x 0.46 con un flujo de 0.8mL/min. Se utilizó un gradiente de agua/acetonitrilo según Tabla 7. Calibrado previamente utilizando naringina, prunina y naringenina.

Tabla 7. Gradiente del disolvente de HPLC

Tiempo (minutos)	**Gradiente Agua/ Acetonitrilo**
0-8	77/23
8-15	35/65
15-20	30/70
20-21	77/23
21-22	77/23
22-35	77/23

Tabla 8. Resultados de la hidrólisis de la naringina utilizando naringinasa cruda inmovilizada sobre GITQ2

Enzima Cruda-GITQ2	
Compuesto	**(%mmols)**
Naringina	8.63

Enzima Cruda-GITQ2	
Compuesto	**(%mmols)**
Prunina	16.89
Naringenina	19.11
Ramnosa	36.23
Glucosa	19.13

Tabla 9. Resultados de la hidrólisis de la naringina utilizando naringinasa pura inmovilizada sobre GITQ2

Enzima Pura-GITQ2	
Compuesto	**(%mmols)**
Naringina	3.01
Prunina	37.60
Naringenina	7.07
Ramnosa	45.24
Glucosa	7.08

Como se observa en la Tabla 8 tras 30 min de reacción el derivado enzimático de la naringinasa-Cruda da lugar a una conversión prácticamente cuantitativa siendo los principales productos naringina, ramnosa y glucosa. En el caso del derivado enzimático de la Naringinasa-Pura se obtiene también una conversión prácticamente cuantitativa siendo en este caso los productos principales prunina y ramnosa.

Ejemplo 12. Estudio de la reusabilidad del catalizador

Una vez acabado el primer uso, el derivado enzimático es centrifugado a 6000 revoluciones por minuto durante 5 minutos, posteriormente se lava 5 veces con el tampón citrato 50mM pH=4.5 y se realiza el reuso tal como ha sido descrito en el Ejemplo 11. Después de 10 ciclos la capacidad de producción de la GITQ2-Cruda 10.25 mg naringenina/mg Enzima-Cruda. Mientras que después de 10 ciclos la capacidad de producción de la GITQ2-Pura es 28.14 mg prunina/mg Enzima-Pura.

REIVINDICACIONES

1. Derivado enzimático caracterizado por que comprende al menos una enzima naringinasa (EC 3.2.1.40) inmovilizada covalentemente sobre un soporte de zeolitas de estructura laminar.
2. Derivado enzimático según la reivindicación 1 donde la naringinasa procede del hongo *Penicilium decumbens*.
3. Derivado enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 donde la naringinasa se selecciona de la lista que consiste en naringinasa comercial, naringinasa purificada o combinaciones de las mismas.
4. Derivado enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la zeolita de estructura laminar se selecciona entre ITQ2 o ITQ6.
5. Derivado enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde la naringinasa está en una relación en peso enzima:soporte de entre 0.2 a 300 mg de enzima por gramo de soporte.
6. Derivado enzimático según la reivindicación 4 donde la naringinasa está en una relación en peso enzima:soporte de entre 0.2 a 70 mg de enzima por gramo de soporte.
7. Derivado enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 caracterizado por que tiene una K_M entre 0.1 y 1mM.
8. Procedimiento de obtención de un derivado enzimático según las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que comprende, al menos, las siguientes etapas:
    a) Contactar el soporte de zeolita laminar con un compuesto derivado de un aminoalquiltrietoxisilano,
    b) Filtrar, lavar y secar el soporte obtenido en la etapa a),
    c) Funcionalizar el soporte de la etapa b) con grupos aldehído,
    d) Filtrar, lavar y secar el soporte funcionalizado obtenido en la etapa c),
    e) Disolver la enzima naringinasa (EC 3.2.1.40) en una solución tampón,
    f) Contactar el soporte de la etapa d) con la enzima de la etapa e), y
    g) Filtrar, lavar y secar el derivado enzimático obtenido en la etapa f).
9. Procedimiento de obtención según la reivindicación 8 donde la relación en peso de la zeolita laminar:3-aminopropiltrietoxisilano de la etapa a) varía de entre 0.1 a 15.

10. Procedimiento de obtención según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9 donde el derivado de aminoalquiltrietoxisilano de la etapa a) es 3-aminopropiltrietoxisilano.

11. Procedimiento de obtención según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 donde la etapa a) se lleva a cabo durante un tiempo de entre 1 a 72 h y a una temperatura de entre 50ºC a 200 ºC.

12. Procedimiento de obtención según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 donde la etapa a) se lleva a cabo durante un tiempo de 24h y a una temperatura de 120ºC.

13. Procedimiento de obtención según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 donde el lavado de la etapa b) se lleva a cabo en presencia de tolueno y hexano.

14. Procedimiento de obtención según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13 donde el secado de la etapa b) se lleva a cabo a una temperatura de 25ºC.

15. Procedimiento de obtención según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14 donde la funcionalización de la etapa c) se realiza mediante el tratamiento del soporte con glutaraldehído en agitación magnética en presencia de tampón NaH_2P0_4 y a un pH de entre 7 a 10 durante un tiempo de entre 5-48h.

16. Procedimiento de obtención según la reivindicación 15 donde el tampón NaH_2P0_4 está a una concentración de entre 25 a 200 mM y el glutaraldehído en un porcentaje de entre 1 a 95%.

17. Procedimiento de obtención según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16 donde la concentración de glutaraldehído es de un 10%.

18. .Procedimiento de obtención según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 17 donde el lavado de la etapa d) se lleva a cabo en una disolución tampón de NaH_2PO_4 a una concentración de entre 25 a 500 mM y a un pH de entre 7 a 10.

19. Procedimiento de obtención según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 18 donde el secado de la etapa d) se lleva a cabo a una temperatura de 25ºC.

20. Procedimiento de obtención según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 19 donde la enzima naringinasa de la etapa e) se disuelve en una solución tampón a una concentración de entre 1 a 200 mM y a un pH de entre 3 a 11.

21. Procedimiento de obtención según la reivindicación 20 donde el pH es de 7 a 10.

22. Procedimiento de obtención según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 21 donde la etapa f) se lleva a cabo en agitación durante un tiempo de entre 0.1 a 24 horas y a una temperatura de entre 4ºC a 80ºC.

23. Procedimiento de obtención según la reivindicación 22 donde la temperatura varía de entre 25ºC a 30ºC.
24. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 23 donde la relación enzima:soporte está entre 0.2 a 300 mg de enzima por gramo de soporte.
25. Procedimiento según la reivindicación 24 donde la relación enzima:soporte está entre 0.2 a 70 mg de enzima por gramo de soporte.
26. Procedimiento de hidrólisis de glicósidos en presencia del derivado enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende las siguientes etapas:
    a) Disolver al menos un glicósido en una disolución tampón a pH entre 4 y 7 y a una temperatura de entre 50 y 70ºC durante 10 minutos,
    b) Enfriar la disolución de la etapa a)
    c) Contactar el derivado enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 con la disolución de la etapa b),
    d) Calentar la mezcla del apartado c) a una temperatura comprendida de entre 50 a 100ºC, durante un tiempo comprendido entre 5 a 60 minutos,
    e) Separar mediante centrifugación el sólido de la etapa d) y lavarlo en una solución tampón,
    f) Recuperar el sobrenadante de la etapa d) y analizar su composición.
27. Procedimiento de hidrólisis según la reivindicación 26 donde los glicósidos se seleccionan de la lista que comprende flavonoides, ramnolípidos y glicopéptidos.
28. Procedimiento de hidrólisis según la reivindicación 27 donde los flavonoides se seleccionan de la lista que comprende naringina, hesperidina y/o combinaciones de los mismos.
29. Procedimiento de hidrólisis según la reivindicación 28 donde el flavonoide es naringina.
30. Procedimiento de hidrólisis según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 29 donde la relación en peso glicósido:enzima varía de 2 a 10.
31. Procedimiento de hidrólisis según la reivindicación 30 donde la relación en peso glicósido:enzima varía de 2 a 5.
32. Procedimiento de hidrólisis según cualquiera de la reivindicaciones 26 a 31 donde la temperatura de la etapa d) varía de entre 50 a 80ºC.
33. Procedimiento de hidrólisis según cualquiera de la reivindicaciones 26 a 32 donde el tiempo de la etapa d) varía de entre 5 a 30 minutos.

34. Uso del derivado enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la hidrólisis de glicósidos.
35. Uso según la reivindicación 34 donde los glicósidos se seleccionan de la lista que comprende flavonoides, ramnolípidos y glicopéptidos.
36. Uso según la reivindicación 35 donde los flavonoides se seleccionan de la lista que comprende naringina, hesperidina y/o combinaciones de los mismos.
37. Uso según la reivindicación 36 donde el flavonoide es naringina.
38. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 34 a 37 donde la hidrólisis se lleva a cabo a un pH de entre 4 a 6.
39. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 34 a 38 donde la hidrólisis se lleva a cabo a una temperatura de entre 50ºC a 100 ºC.
40. Uso del derivado enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 como biocatalizador.

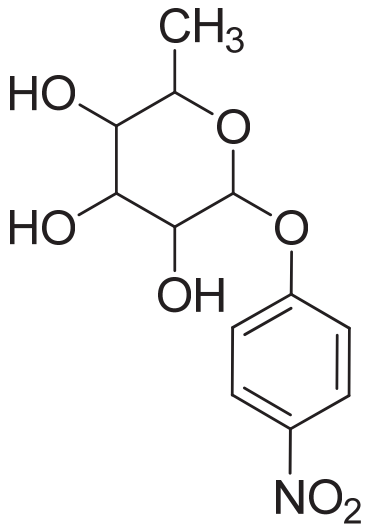

Figura 1

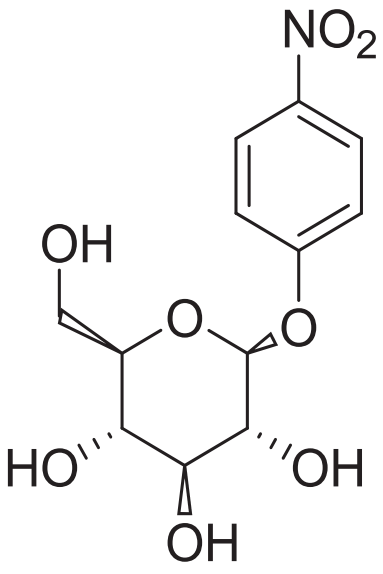

Figura 2

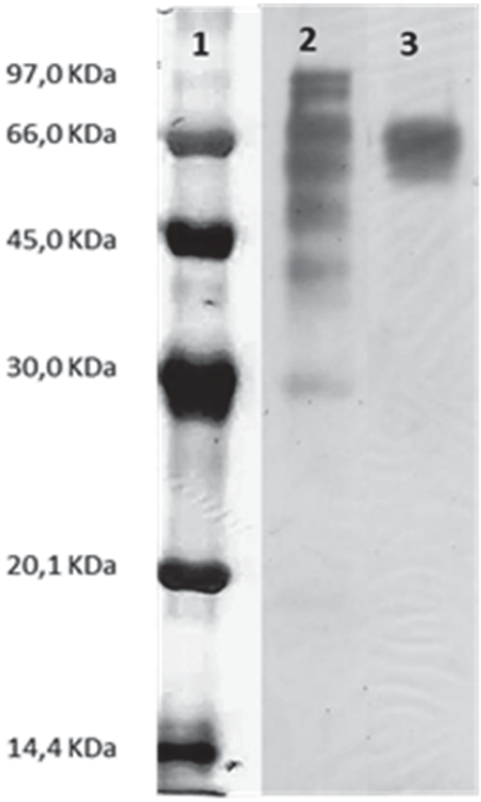

Figura 3

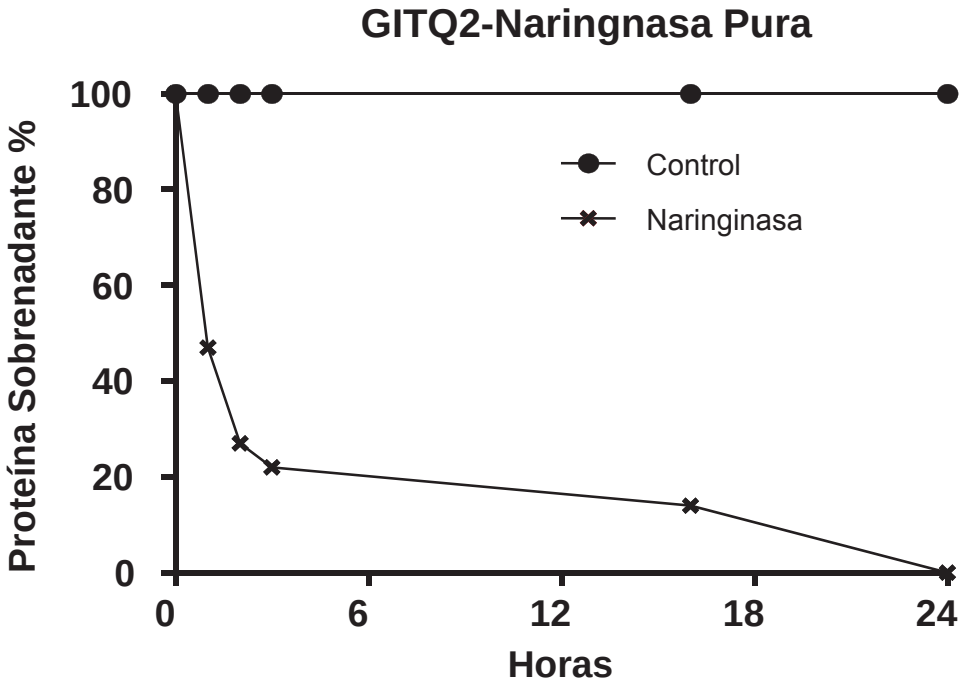

Figura 4

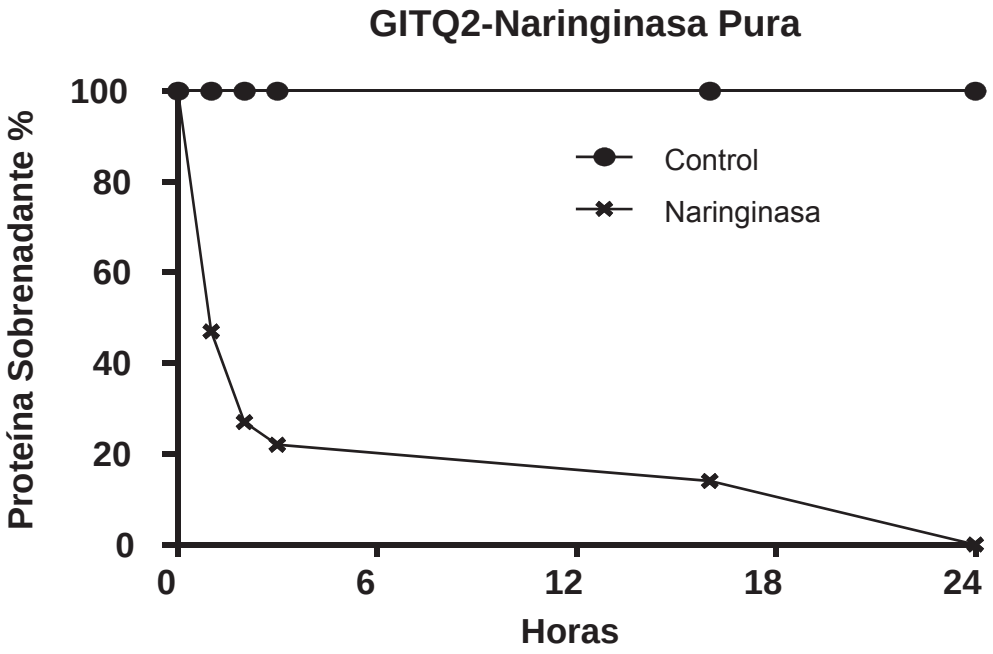

Figura 5

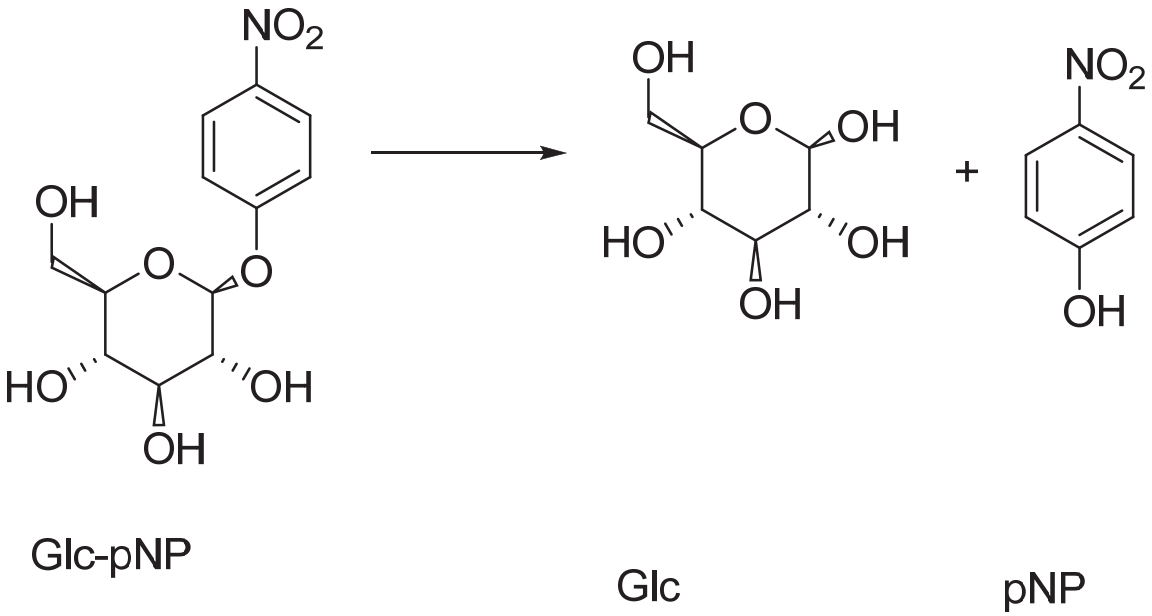

Figura 6

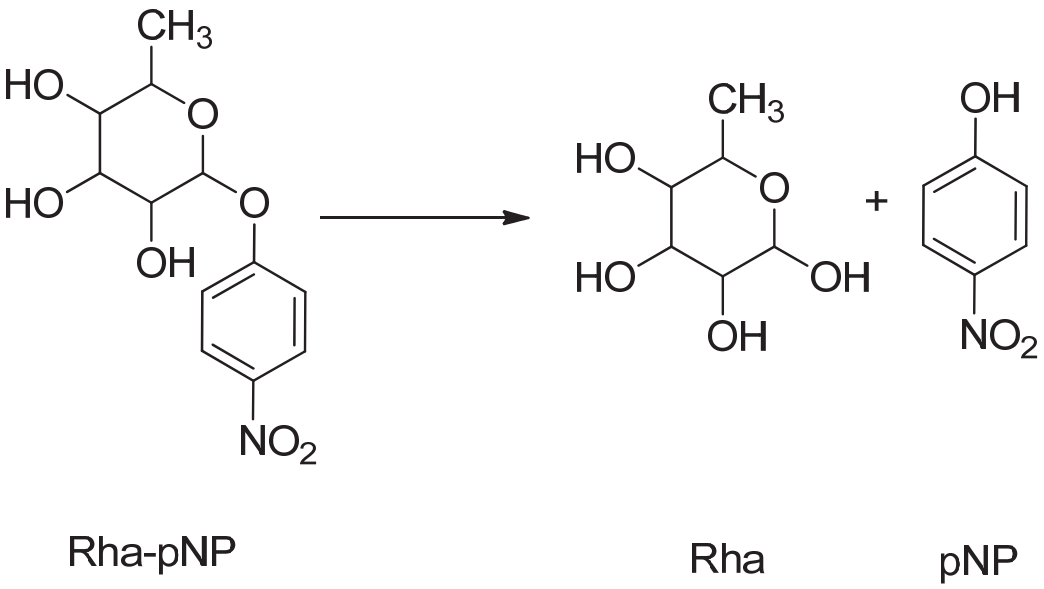

Figura 7

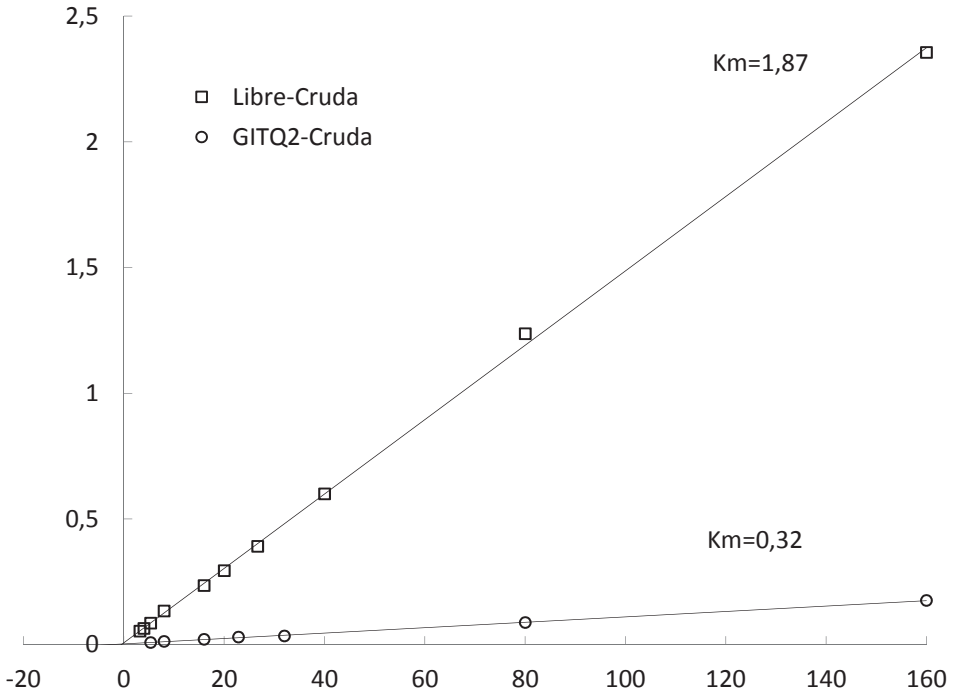

Figura 8

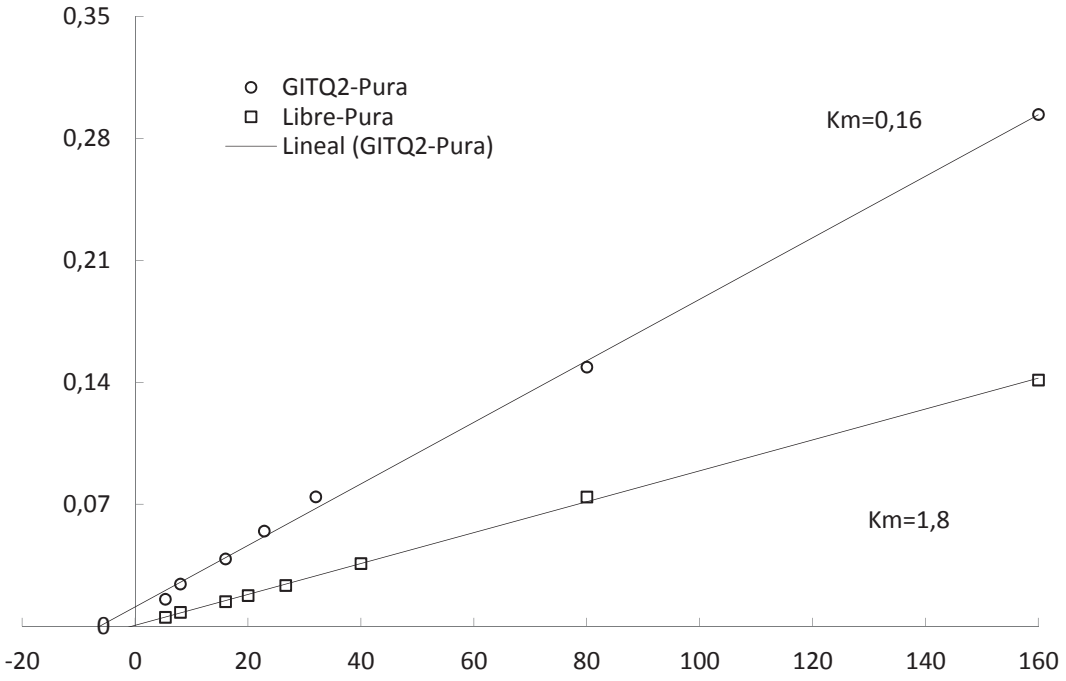

Figura 9

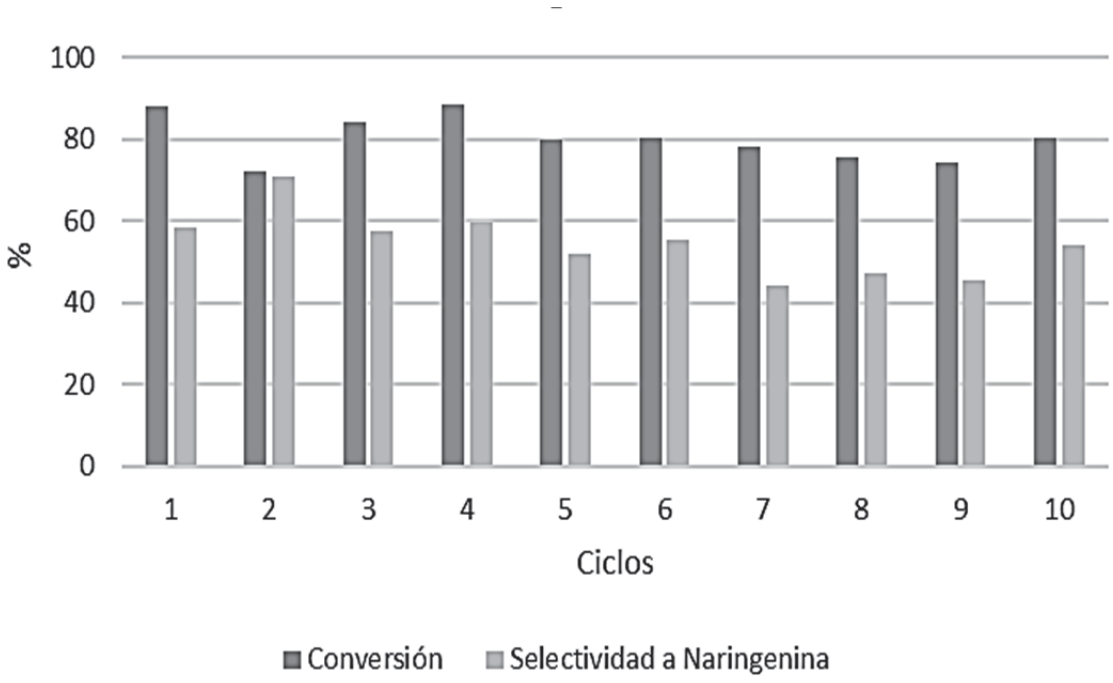

Figura 10

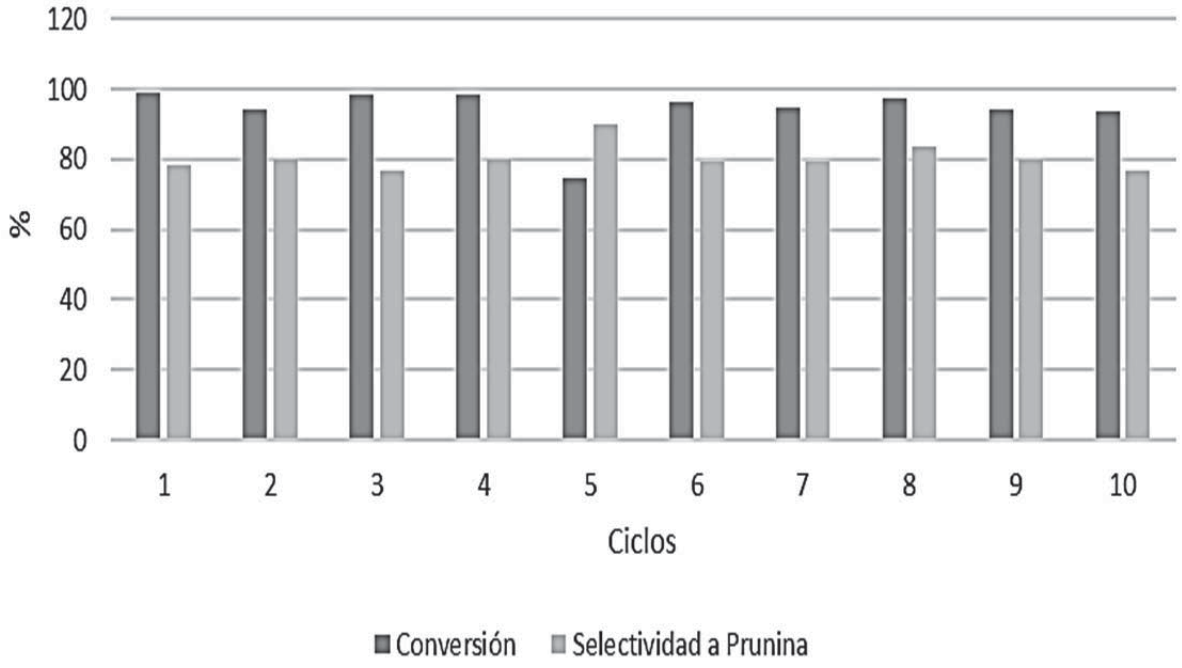
120
100
80
60
40
20
0
%
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Ciclos
Conversión
Selectividad a Prunina

Figura 11

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201731285

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 03.11.2017

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***C12N11/14*** (2006.01)
C12N9/42 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 4971812 A (TSEN HAU-YANG) 20/11/1990, todo el documento; en particular, ejemplos y reivindicaciones.	1-40
A	CN 105707640 A (UNIV CHINA THREE GORGES CTGU) 29/06/2016, (resumen) BASE DE DATOS WPI [en línea], Clarivate Analytics, [recuperado el 22/03/2018]. Recuperado de WPI en EPOQUENET, (EPO), DW 201666, Nº DE ACCESO 2016-44429K.	1-40
A	WEIJUAN H et al.: "Controllable immobilization of naringinase on electrospun celluloseacetate nanofibers and their application to juice debittering", febrero 2017, International Journal of Biological Macromolecules 98 (2017) 630–636, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.02.018, todo el documento; En particular, "resumen", "experimentos" y "conclusiones".	1-40
A	SHENGJIAO L et al.: "Immobilization of naringinase on mesoporous molecular sieve MCM-41 and its application to debittering of white grapefruit" (2011) Applied Surface Science 257, 4096–4099, DOI: 10.1016/j.apsusc.2010.12.003, todo el documento; en particular, "resumen" y "resultados y discusión".	1-40
A	NOROUZIAN D et al.: "Various techniques used to immobilize naringinase produced by *Penicillium decombens* PTCC 5248", 1999, World Journal of Microbiology & Biotechnology 15: 501±502, DOI: 10.1023/A: 1008980018481, todo el documento; en particular, "materiales y métodos" y "resultados y discusión".	1-40
A	PURI M et al.: "Covalent immobilization of naringinase for the transformation of a flavonoid", 2005, Journal of Chemical Technology and Biotechnology 80:1160–1165, DOI: 10.1002/jctb.1303, todo el documento; en particular, "materiales y métodos" y "resultados y discusión".	1-40
A	NOROUZIAN D: "Enzyme immobilization: the state of art in biotechnology", IRANIAN JOURNAL of BIOTECHNOLOGY, 2003, Vol. 1, No. 4, página 203, línea 16 a línea 37 y pág. 204, línea 10 a línea 49.	1-40

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	**Examinador**	**Página**
26.03.2018	A. Maquedano Herrero	1/2

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

C12N

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

INVENES, EPODOC, WPI, CA, INTERNET