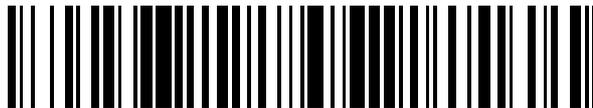


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 838**

21 Número de solicitud: 201731286

51 Int. Cl.:

C12N 11/02 (2006.01)

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 ÓXIDO DE GRAFENO**

57 Resumen:

Derivado enzimático basado en enzima inmovilizada sobre óxido de grafeno.

La presente invención se refiere a un derivado enzimático que comprende una enzima hidrolítica, preferentemente la naringinasa, inmovilizada a través de enlaces covalentes sobre óxido de grafeno, 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 ciclos consecutivos sin disminuir su actividad catalítica, mostrando una estabilidad catalítica superior a la observada al utilizar otros soportes diferentes.

ES 2 711 838 A1

DESCRIPCION

Derivado enzimático basado en enzima inmovilizada sobre óxido de grafeno

5 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 soportes de óxido de grafeno 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
10 presente invención otorga al enzima mayor estabilidad térmica, mayor estabilidad frente pH, mayor afinidad por el sustrato y aumenta la actividad catalítica.

ANTECEDENTES

15 En la bibliografía se encuentran ejemplos de naringinasa inmovilizada sobre silicatos mesoporosos 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
20 se han descrito la utilización de distintos soportes orgánicos como los films de triacetato de celulosa (Journal of Food Science, (1998), 63, 61–65), los 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
25 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-
30 285).

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 sustrato y que además el derivado enzimático debe ser
35 altamente estable, manteniendo su actividad catalítica durante varios ciclos de reacción. A pesar de su gran potencial como soporte para la inmovilización enzimática,

- pocas veces se ha empleado el óxido de grafeno (GO) con este fin. Está descrita por ejemplo la inmovilización de HRP (*Horse Radish peroxidase*), Lisozime, Oxalato oxidasa, Quimiotripsina, albumina, proteasa alcalina, tripsina, Glucosa oxidasa, lipasa y estereasa sobre GO (Nanotechnol. Rev., (2013);2(1):27-45). Sin embargo, cabe
- 5 destacar que en algunos casos tiene lugar la pérdida de actividad e incluso inhibición total de la actividad enzimática al inmovilizar el enzima sobre el GO. (J.A.Chem.Soc., (2011),133,17524-17527; Phys.Chem.Chem. Phys., (2012),14:9076–9085). Con respecto a la estabilidad catalítica de los derivados enzimáticos basados en naringinasa soportada sobre diferentes soportes, también se ha observado,
- 10 dependiendo del soporte, una pérdida de actividad tras reúsos consecutivos (Appl. Biochem. Biotechnol., (2010), 160:2129–2147; Food Chemistry, (2007), 104: 1177–1182; European Food Research and Technology,(2006), 224: 55–60; Enzyme and Microbial Technology, (2007), 40, 442–446).
- 15 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
- 20 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 INVENCION

- 25 La presente invención se refiere a un derivado enzimático que puede comprender, al menos, una enzima hidrolítica inmovilizada covalentemente sobre óxido de grafeno, donde dicha enzima hidrolítica es una enzima naringinasa (EC 3.2.1.40), preferentemente procedente del hongo *Penicillium decumbens*, y más preferentemente se seleccionada entre naringinasa comercial, naringinasa purificada, y combinaciones
- 30 de las mismas, así como su procedimiento de obtención y uso.

- Según una realización preferente, se han preparado dos derivados enzimáticos consistentes en la enzima naringinasa comercial (Cruda) y purificada (Pura) inmovilizadas covalentemente sobre óxido de grafeno, respectivamente. En la
- 35 presente invención se demuestra que, en este caso particular y contrariamente a lo que sucede con otras enzimas soportadas sobre GO, la enzima naringinasa soportada

sobre el GO, muestra ventajas con respecto a la enzima libre en cuanto a su estabilidad, actividad catalítica y su afinidad por el sustrato.

5 El GO es un material cuya estructura, basada en láminas individuales, le confiere capacidades excepcionales para ser empleado como soporte debido a su elevada superficie específica ($2600 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$). Además, al ser un soporte que posee grupos ácidos carboxílicos y epóxidos, los grupos nucleófilos de las enzimas pueden reaccionar directamente con ellos dando lugar a enlaces covalentes, formando así una capa de enzima estable limitando además la lixiviación de la enzima en el medio de
10 reacción. Por otro lado, la dispersión del GO en agua lo hace muy interesante para la inmovilización proteica, ya que las enzimas por lo general suelen operar en medios acuosos.

En la presente invención se presenta un derivado enzimático basado en la enzima
15 naringinasa soportada sobre GO que presenta, sorprendentemente, características mejoradas con respecto a las observadas con otros soportes como 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
20 naringinasa inmovilizada sobre otros soportes.

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
25 naringinasa presente en el extracto comercial de partida.

En el derivado enzimático descrito según la presente invención, la enzima puede estar en una relación en peso enzima:soporte entre 0.2 y 1000 mg de enzima por gramo de soporte, preferentemente entre 0.2-70 mg de enzima por gramo de soporte.
30

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 6-18% superior a la de la enzima libre. La actividad relativa máxima de la enzima según la presente invención corresponde a un pH de incubación
35 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 25-65% a 50°C y superior al 60-70% 90°C siendo su actividad relativa máxima en un rango de temperaturas preferentemente entre 65°C y 80°C.

Además, según lo descrito en la presente invención, el derivado enzimático también ha
5 demostrado tener una mayor estabilidad catalítica que la enzima libre. Así, el derivado enzimático posee una estabilidad catalítica entre 80 y 100°C superior al enzima libre cruda y pura. Concretamente, puede tener una estabilidad catalítica a 80°C entre un 7 y un 14% 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.

10

Según la presente invención, el derivado enzimático puede tener una constante de Michaelis-Menten (K_M) entre 0.1 y 1mM. Además, el derivado enzimático puede presentar alta afinidad por el substrato específico, con una K_M entre 2.3-3 veces superior para la enzima libre (cruda y pura) respecto a la inmovilizada.

15

Es importante resaltar que el derivado enzimático según la presente invención se puede reutilizar. Concretamente, se puede emplear entre 1 a 20 ciclos sin disminuir su actividad catalítica. Después de cada ciclo de reacción, el derivado enzimático es lavado 5 veces con la disolución tampón y posteriormente se reutiliza en una nueva
20 reacción según el Ejemplo 4 u 11.

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

25

a) Dispersar el soporte de óxido de grafeno en una solución tampón que se encuentra a una concentración de entre 1 a 200 mM y a un pH de entre 5 a 10,

b) Someter la dispersión de la etapa a) a un tratamiento con ultrasonidos durante un tiempo de entre 1 a 60 minutos,

30

c) Poner en contacto la dispersión de la etapa b) con la enzima naringinasa (EC 3.2.1.40) en una relación en peso enzima:soporte entre 0.2 y 1000 mg de enzima por gramo de soporte,

d) Centrifugar la dispersión de la etapa c) y recoger el precipitado.

Según el proceso descrito en la presente invención, la relación en peso enzima:soporte puede estar seleccionada entre 0.2 y 1000 mg de enzima por gramo de soporte, preferentemente entre 0.2 y 70 mg de enzima por gramo de soporte.

- 5 En una realización preferida del procedimiento de obtención del derivado enzimático de la invención, éste se caracteriza por que el tampón de la etapa a) se selecciona de entre cualquiera de los siguientes: tampón citrato, tampón fosfato, tampón de acetato de sodio y/o tampón de acetato de potasio.
- 10 En otra realización preferida del procedimiento de obtención del derivado enzimático de la invención, éste se caracteriza por que la solución tampón de la etapa a) se encuentra a una concentración de entre 5 a 100 mM.

En otra realización preferida del procedimiento de obtención del derivado enzimático de la invención, éste se caracteriza por que la solución tampón de la etapa a) se encuentra a un pH de entre 7 a 10.

15

En otra realización preferida del procedimiento de obtención del derivado enzimático de la invención, éste se caracteriza por que la dispersión de la etapa b) se somete a un tratamiento con ultrasonidos durante un tiempo de entre 5 a 30 minutos.

20

En otra realización preferida del procedimiento de obtención del derivado enzimático de la invención, éste se caracteriza por que la etapa c) se lleva a cabo a una temperatura de entre 4°C a 80°C y durante un tiempo de entre 0.1 a 24 h. En otra realización más preferida, la temperatura varía entre 25°C a 30°C y durante un tiempo de entre 15 a 24 h.

25

En otra realización preferida del procedimiento de obtención del derivado enzimático de la invención, éste se caracteriza por que la centrifugación se lleva a cabo durante un tiempo de entre 10 a 15 minutos, preferentemente a 6000rpm. En otra realización preferida, se recupera el sobrenadante centrifugado donde se encuentra el derivado enzimático de la invención que se puede utilizar para los procedimientos de hidrólisis descritos en el presente documento. En otra realización más preferida, el precipitado que contiene el derivado enzimático de la invención se somete a diferentes lavados en soluciones tampón a pH de 7.

30

35

Según una realización particular, el procedimiento para la obtención del derivado enzimático de naringinasa (ya sea cruda, purificada o combinaciones de las mismas) inmovilizado sobre GO se obtuvo al dispersar el GO en una disolución tampón con una concentración preferentemente de entre 1 y 200 mM, y se añadió la enzima correspondiente en una relación enzima soporte entre preferentemente 0.2 y 1000 mg de enzima por gramo de soporte, preferentemente entre 0.2 a 70 mg de enzima por gramo de soporte. La mezcla se agitó a un pH entre 5 y 10, preferentemente entre 7 y 10. La incubación de la enzima con el soporte se lleva a cabo durante un tiempo entre 0.1 y 24 h preferentemente entre 15 y 24 h, a temperatura entre 4 y 80°C, preferentemente entre 25 y 30°C.

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 GO, a tres pH diferentes y los derivados enzimáticos obtenidos se sometieron a dos gradientes de sal a 0.5M y a 1M. Como se observa en la Tabla 6, a los pH de inmovilización de 7 y 10 la cantidad de proteína desorbida del material es 0, ello indica que a estos pHs el enlace entre la enzima y el soporte no es a través de enlaces electrostáticos sino que es a través de enlaces covalentes. Estos se establecerían principalmente entre los grupos amino del enzima con los grupos funcionales oxigenados del soporte (carbonilo, carboxilo y epóxido).

Los materiales obtenidos se caracterizaron y se evaluaron determinando la afinidad de los derivados enzimáticos por el sustrato. De los valores de la 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.

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

30

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 GO con otros soportes se ha calculado el cociente entre la K_M de la enzima libre y la K_M del enzima inmovilizada K_M (CK_M). El valor de este cociente indica que la afinidad por el sustrato es mayor cuanto mayor es el valor de CK_M . Los

35

resultados de la presente invención que se presentan en la Tabla 1, muestran que la CK_M para el caso de GO es mayor que la descrita en el caso de la inmovilización de naringinasa sobre otros materiales (ver Tabla 1).

5

Tabla 1. Cocientes de la K_M

Referencia	K_M (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	0.80	2.33	GO-Enzima cruda
Derivado Enzimático de la presente invención	1.80	0.60	3.00	GO-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 presente invención se refiere al procedimiento de hidrólisis de glicósidos en presencia del derivado enzimático de la invención, que comprende las siguientes etapas:

10

- a) Disolver al menos un glicósido en disolución buffer a pH entre 4 y 7 y mediante calentamiento a una temperatura entre 50 y 70°C durante 10 minutos.
- b) Enfriar la disolución del apartado a),
- c) Contactar el derivado enzimático de la invención con la disolución de la etapa b),
- d) Calentar la mezcla de la etapa c) a una temperatura comprendida entre 50 y 100°C durante un tiempo comprendido entre 5 a 60 minutos,

15

- e) Separar mediante centrifugación el sólido de la etapa d) y lavarlo en una solución tampón, y
- f) Recuperar el sobrenadante de la etapa d) y analizar su composición.

5 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.

10 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.

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

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.

20 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.

25 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.

30 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, azúcares libres y glicósidos intermedios, está comprendida entre un 10 y 25 % molar de flavonoides, un 25-65% de azúcares libres y un 10-25% de glicósidos intermedios.

35 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, azúcares libres y glicósidos intermedios está comprendida entre un 1 y 5% molar de flavonoides, un 30-60% de azúcares libres y un 25-50% de glicósidos intermedios.

- 5 Otro aspecto de la invención se refiere al uso del derivado de la invención 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
10 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
15 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
20 presente invención para la hidrólisis selectiva de glicósidos, preferentemente seleccionados entre flavonoides, ramnolípidos y glicopéptidos.

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

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.
30

Según otra realización particular, cuando el derivado enzimático proviene de la naringinasa del hongo *Penicillium decumbens* comercial (sin purificar), la actividad β -glucosidasa y α -ramnosidasa son similares (50/50) obteniéndose tras la hidrólisis de la naringina preferentemente ramnosa, glucosa y naringenina.
35

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-Ramnopiranosido (Rha-pNP).
- 10 **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 GO.
- Figura 5.** Gráfica de la inmovilización de la enzima pura sobre el soporte GO.
- 15 **Figura 6.** Reacción de hidrólisis del p-Nitrofenil-β-D-glucósido (Glc-pNP).
- Figura 7.** Reacción de hidrólisis del p-Nitrofenil- alpha-L-Ramnopiranosido (Rha-pNP).
- Figura 8.** Gráfica de Lineweaver-Burk para determinar K_M naringinasa cruda en forma libre e inmovilizada.
- Figura 9.** Gráfica de Lineweaver-Burk para determinar K_M naringinasa pura en forma libre e inmovilizada.
- 20 **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.

25

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

EJEMPLOS

30

Ejemplo 1. Síntesis de Óxido de Grafeno

La síntesis del GO se llevó a cabo a partir del método modificado de Hummers (Journal of the American Chemical Society, (1958), 80(6), 1339). Así 360mL de H_2SO_4 concentrado fue añadido a una mezcla de grafito (7.5g) y $NaNO_3$ (7.5 g), y la mezcla se enfrió a 0°C en baño de hielo. Posteriormente se añadió $KMnO_4$ (45 g) lentamente

35

en pequeñas dosis para mantener la temperatura por debajo de 20 °C. Terminada la adición, la solución se calentó a 35°C bajo agitación magnética durante 3h. Posteriormente se añadió H₂O₂ (1.5 L, al 3 %) y la mezcla se agitó durante 30 min. Finalmente el sólido se separó por centrifugación, se lavó con 600 mL de agua y fue
5 centrifugado de nuevo. Este proceso fue repetido hasta que el pH del lavado fue neutro.

Ejemplo 2. Purificación de la naringinasa y electroforesis de la enzima comercial y de la fracción purificada.

10

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
15 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
20 fosfato (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄) 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
25 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-
30 alpha-L-Ramnopiranosido (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.

35

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

5

Los enzimas puro y crudo fueron sometidos a una técnica de electroforesis sobre gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, 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 66KD (SDS-PAGE) (Figura 3).

10

Ejemplo 3. Inmovilización de la naringinasa comercial (Cruda) y de la naringinasa purificada (Pura).

15

La inmovilización de la enzima naringinasa tanto cruda como pura sobre el soporte GO se realiza de la siguiente forma: 50 mg de GO disueltos en 3mL de buffer Fosfato pH=7 (50mM) se llevan durante 5 minutos al ultrasonidos, posteriormente se añaden 3mg de enzima (cruda o pura) (proporción 1mg/ml) y se dejan en frasco cerrado con agitación suave en rodillos durante 24h.

20

25

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 $\lambda=595\text{nm}$. 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 3h de tiempo de contacto (Figura 4 y 5).

Ejemplo 4. Determinación de las actividades enzimáticas.

5

(Actividad relativa Unidades/mg Proteína)

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

10 Las actividades de la naringinasa se determinaron incubando la enzima (0.05 mL de solución de enzima libre o derivado enzimático (1mg proteína/mL) con 0.05 mL (5 mM) del sustrato específico Rha-pNP y Glc-pNP según el caso, en 0.7ml de tampón citrato 50 mM (pH 4.5) a 50 °C durante 5 minutos.

15 La liberación de para-nitrofenol se estima añadiendo 0.8 ml de carbonato sódico 1 M sobre la mezcla y posteriormente determinando la densidad óptica a 405 nm (Figura 6 y 7).

Ejemplo 5. Determinación de la actividad catalítica en función de la temperatura de incubación.

20

(Actividad relativa Unidades/mg Proteína)

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

25

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 4) a diferentes temperaturas que varían entre 30°C y 100°C. La actividad relativa en función de la temperatura de incubación se muestra en la Tabla 3. Como se observa, en general la actividad de la enzima (cruda y pura) inmovilizada esta menos afectada por la temperatura.

35

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
GO-Cruda	50	80
GO-Pura	60	83

5 **Ejemplo 6. Determinación de la actividad catalítica en función del pH de incubación.**

(Actividad relativa Unidades/mg Proteína)

10 *1 Unidad enzimática de actividad corresponde a la liberación de 1 μ mol de pNP por minuto*

15 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. 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 4). 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	53
Libre Pura	90	40
GO-Cruda	96	59
GO-Pura	95	48

20

Ejemplo 7. Estabilidad de la actividad catalítica en función de la temperatura de incubación.

(Actividad relativa Unidades/mg Proteína)

5 1 Unidad enzimática de actividad corresponde a la liberación de 1 μmol de pNP por minuto

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
 10 temperaturas entre 30 y 100°C, posteriormente se añade el sustrato Rha-pNP y se somete a ensayo de actividad en las condiciones del Ejemplo 4. Como se puede observar en la Tabla 5 a mayor temperatura la actividad de las enzimas inmovilizadas sobre GO es considerablemente superior a las enzimas libres.

15 **Tabla 5. Estabilidad térmica naringinasa libre e inmovilizada.**

Catalizador	Actividad Relativa%	
	30°C	80°C
Libre Cruda	100	80
Libre Pura	100	83
GO-Cruda	100	93
GO-Pura	100	89

Ejemplo 8. Cálculo de las constantes de Michaelis (K_M)

20

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.

25

Como se puede observar tanto la naringinasa cruda como pura inmovilizadas sobre GO 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 9. Estabilidad del enzima soportado

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 GO, a tres pH diferentes (4.5, 7 y 10) y tras comprobar que en los tres casos la inmovilización de la enzima era del 100 %, se realizaron dos gradientes de sal a 0.5M y a 1M. Como se observa en la Tabla 6, a los pH de inmovilización de 7 y 10 la cantidad de proteína desorbida del material es 0, ello indica que a estos pHs el enlace entre la enzima y el soporte es a través de enlaces covalentes.

Tabla 6. Desorción de proteína frente a gradiente de NaCl

GO-Enzima Cruda				
pH inmovilización	%Proteína inmovilizada	*Proteína desorbida 0,5 M	*Proteína desorbida 1 M	%Proteína desorbida
4.5	100	0.8	3.2	2.7
7	100	0	0	0
10	100	0	0	0

Ejemplo 10. 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.

20

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 75°C. 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 naringenin, 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

25

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

5

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 GO

Enzima Cruda-GO	
Compuesto	(% mmols)
Naringina	0.35
Prunina	11.11
Naringenina	25.81
Ramnosa	36.92
Glucosa	25.81

10

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

Enzima Pura-GO	
Compuesto	(%mmols)
Naringina	1.09
Prunina	47.29
Naringenina	1.44
Ramnosa	48.73
Glucosa	1.44

Como se observa en la Tabla 8 tras 30 min de reacción el derivado enzimático de la naringinasa cruda-GO 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
5 cuantitativa siendo en este caso los productos principales prunina y ramnosa.

Ejemplo 11: Estudio de la reusabilidad del catalizador

Una vez acabado el primer uso, el derivado enzimático es centrifugado a 6000
10 revoluciones por minuto durante 5 minutos, posteriormente se lava 2 veces con el tampón citrato 50mM pH=4.5 y se realiza el reuso tal como ha sido descrito en el Ejemplo 10.

Después de 10 ciclos la capacidad de producción de la GO-Cruda es 14.43mg
15 naringenina/mg Enzima-Cruda. Mientras que después de 10 ciclos la capacidad de producción de la GO-Pura es 34.61mg prunina/mg Enzima-Pura.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Derivado enzimático caracterizado por que comprende al menos una enzima naringinasa (EC 3.2.1.40) inmovilizada covalentemente sobre un soporte de óxido de grafeno.
2. Derivado enzimático según la reivindicación 1 donde la naringinasa procede del hongo *Penicillium decumbens*.
- 10 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 naringinasa está en una relación en peso enzima:soporte de entre 0.2 a 1000 mg de enzima por gramo de soporte.
- 15 5. 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.
6. Derivado enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 caracterizado por que tiene una K_M entre 0.1 y 1mM.
- 20 7. Procedimiento de obtención de un derivado enzimático según las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque comprende, al menos, las siguientes etapas:
 - a) Dispersar el soporte de óxido de grafeno en una solución tampón que se encuentra a una concentración de entre 1 a 200 mM y a un pH de entre 5 a 10,
 - 25 b) Someter la dispersión de la etapa a) a un tratamiento con ultrasonidos durante un tiempo de entre 1 a 60 minutos,
 - c) Poner en contacto la dispersión de la etapa b) con la enzima naringinasa (EC 3.2.1.40) en una relación en peso enzima:soporte de entre 0.2 y 1000 mg de enzima por gramo de soporte,
 - 30 d) Centrifugar la dispersión de la etapa c) y recoger el precipitado.
8. Procedimiento según la reivindicación 7 donde la relación enzima:soporte está entre 0.2 y 1000 mg de enzima por gramo de soporte.
9. Procedimiento según la reivindicación 8 donde la relación enzima:soporte está entre 0.2 a 70 mg de enzima por gramo de soporte.
- 35 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 donde la solución tampón de la etapa a) se selecciona de entre cualquiera de los siguientes:

tampón citrato, tampón fosfato, tampón de acetato de sodio y/o tampón de acetato de potasio

- 5
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 donde la solución tampón de la etapa a) se encuentra a una concentración de entre 5 a 100 mM.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 donde el pH de la solución tampón varía de entre 7 a 10.
13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12 donde el tratamiento con ultrasonidos de la etapa b) varía de entre 5 a 30 minutos.
- 10
14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13 caracterizado por que la etapa c) se lleva a cabo a una temperatura que varía de entre 4°C a 80°C y durante un tiempo de entre 0.1 a 24 h.
15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14 caracterizado por que la etapa c) se lleva a cabo a una temperatura que varía de entre 25 °C a 30°C y durante un tiempo de entre 15 a 24 h.
- 15
16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15 caracterizado por que la centrifugación de la etapa c) se lleva a cabo a 6000 rpm durante un tiempo de entre 10 a 15 min.
17. Procedimiento de hidrólisis de glicósidos en presencia del derivado enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 1a 6 que comprende las siguientes etapas:
- 20
- a) Disolver al menos un glicósido en una disolución tampón a pH entre 4 y 7 y a una temperatura de entre 50 y 70°C durante 10 minutos,
 - b) Enfriar la disolución de la etapa a)
 - 25
 - c) Contactar el derivado enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 con la disolución de la etapa b),
 - d) Calentar la mezcla del apartado c) a una temperatura comprendida de entre 50 a 100°C, durante un tiempo comprendido entre 5 a 60 minutos,
 - e) Separar mediante centrifugación el sólido de la etapa d) y lavarlo en
 - 30
 - una solución tampón,
 - f) Recuperar el sobrenadante de la etapa d) y analizar su composición.
18. Procedimiento de hidrólisis según la reivindicación 17 donde los glicósidos se seleccionan de la lista que comprende flavonoides, ramnolípidos y glicopéptidos.

19. Procedimiento de hidrólisis según la reivindicación 18 donde los flavonoides se seleccionan de la lista que comprende naringina, hesperidina y/o combinaciones de los mismos.
- 5 20. Procedimiento de hidrólisis según la reivindicación 19 donde el flavonoide es naringina.
21. Procedimiento de hidrólisis según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20 donde la relación en peso glicósido:enzima varía de 2 a 10.
22. Procedimiento de hidrólisis según la reivindicación 21 donde la relación en peso glicósido:enzima varía de 2 a 5.
- 10 23. Procedimiento de hidrólisis según cualquiera de la reivindicaciones 17 a 22 donde la temperatura de la etapa d) varía de entre 50 a 80°C.
24. Procedimiento de hidrólisis según cualquiera de la reivindicaciones 17 a 24 donde el tiempo de la etapa d) varía de entre 5 a 30 minutos.
- 15 25. Uso del derivado enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la hidrólisis de glicósidos.
26. Uso según la reivindicación 25 donde los glicósidos se seleccionan de la lista que comprende flavonoides, ramnolípidos y glicopéptidos.
27. Uso según la reivindicación 26 donde los flavonoides se seleccionan de la lista que comprende naringina, hesperidina y/o combinaciones de los mismos.
- 20 28. Uso según la reivindicación 27 donde el flavonoide es naringina.
29. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28 donde la hidrólisis se lleva a cabo a un pH de entre 4 a 6.
30. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29 donde la hidrólisis se lleva a cabo a una temperatura de entre 65°C a 100 °C.
- 25 31. Uso del derivado enzimático según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 como biocatalizador.

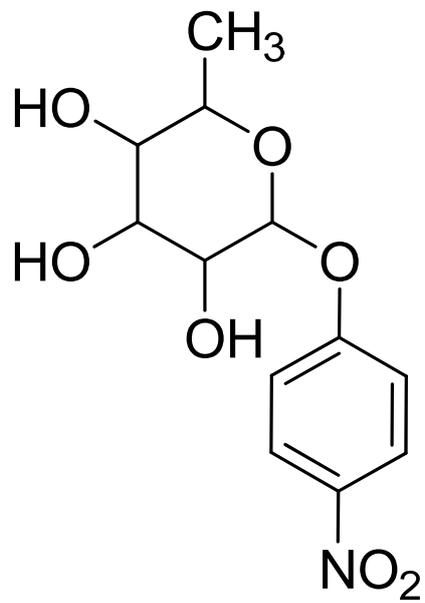


Figura 1

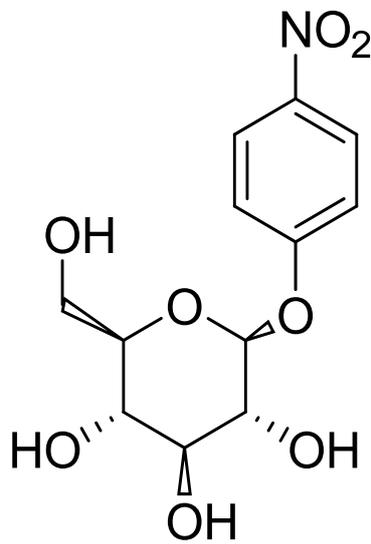


Figura 2

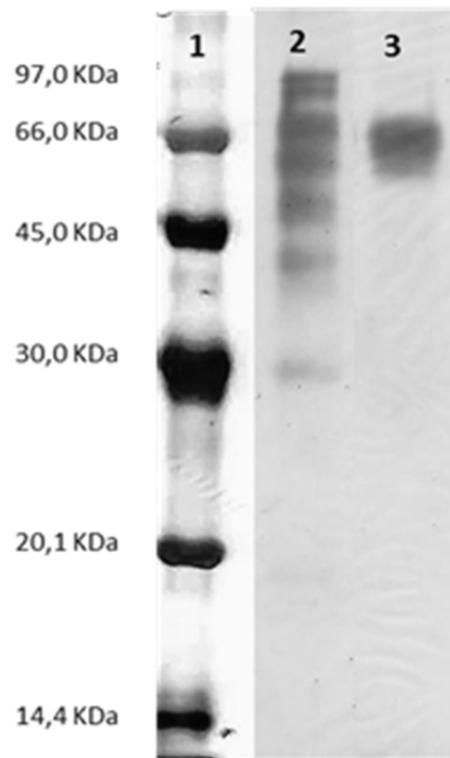


Figura 3

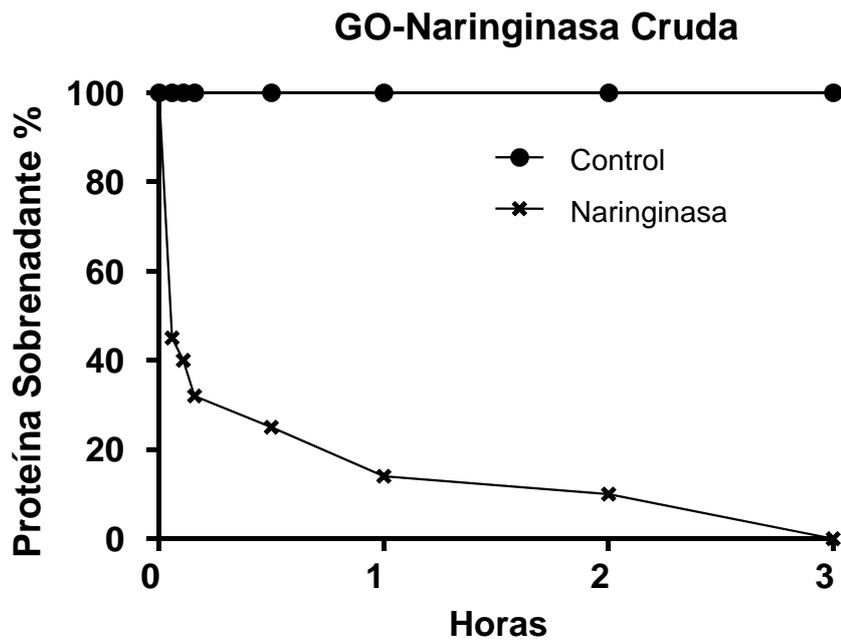


Figura 4

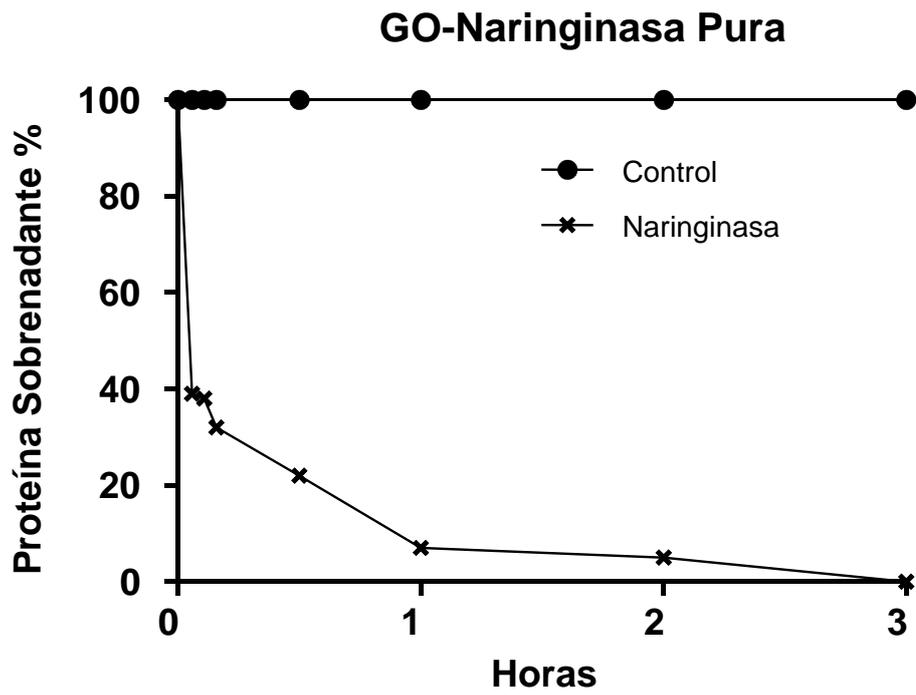


Figura 5

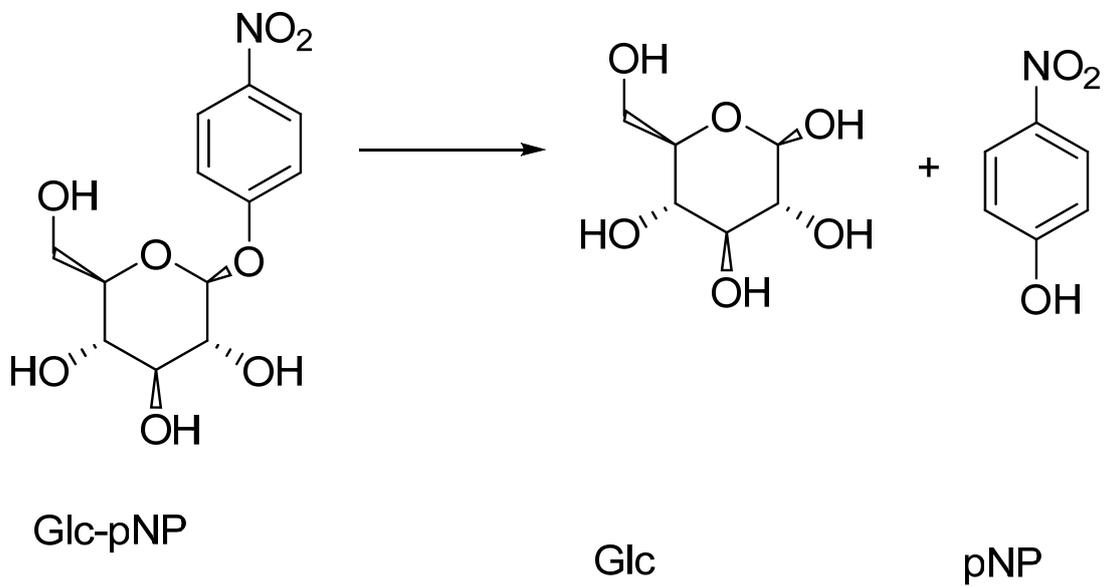


Figura 6

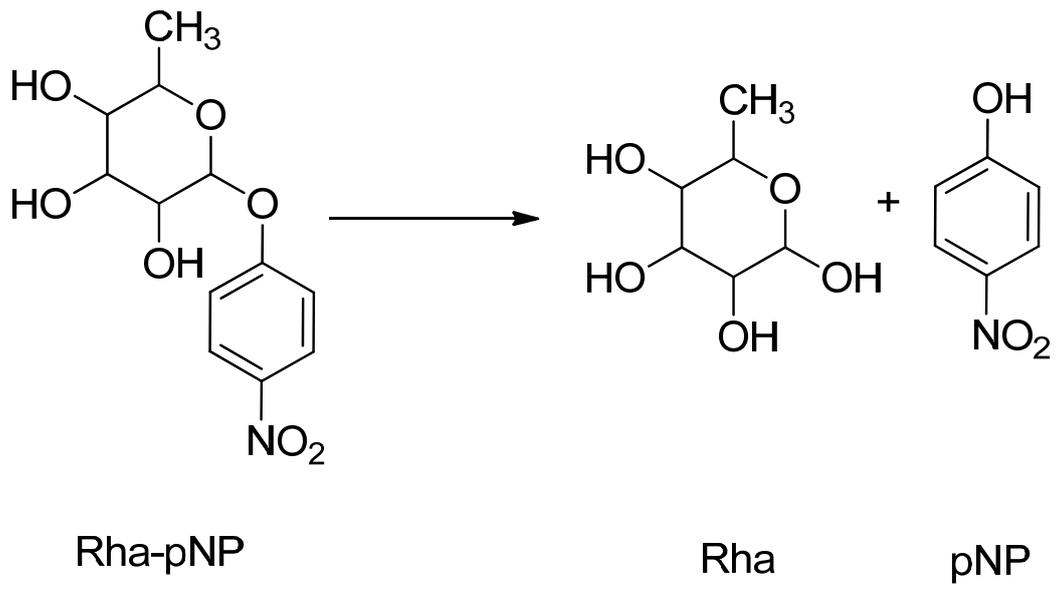


Figura 7

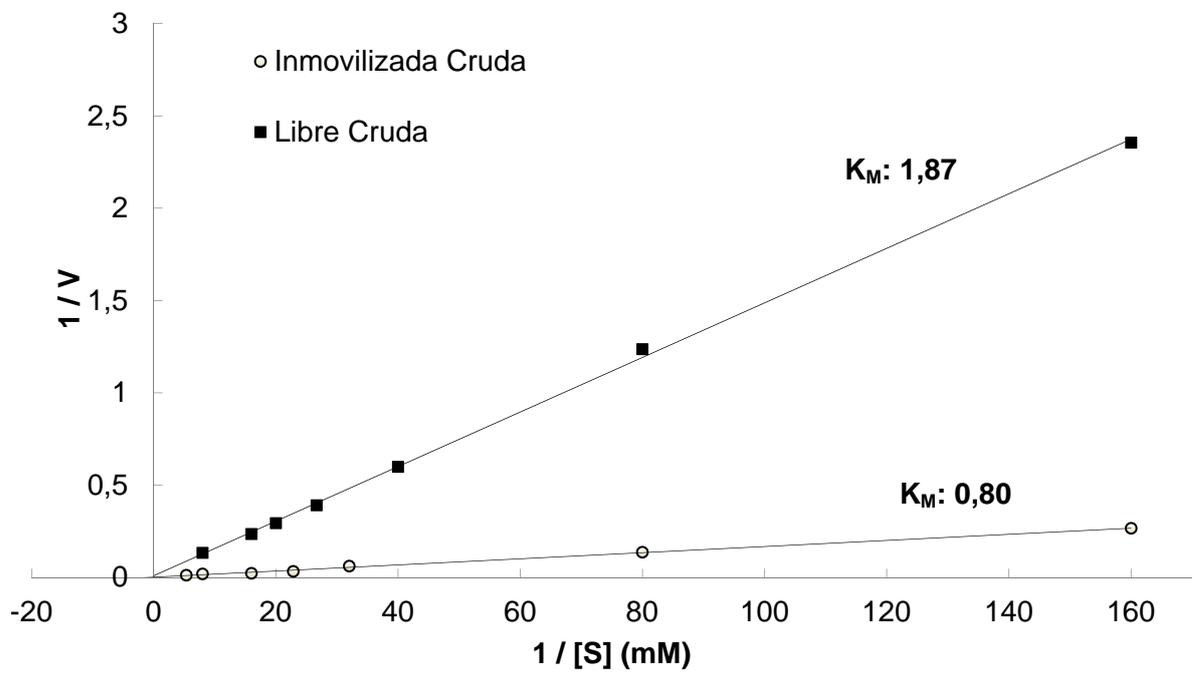


Figura 8

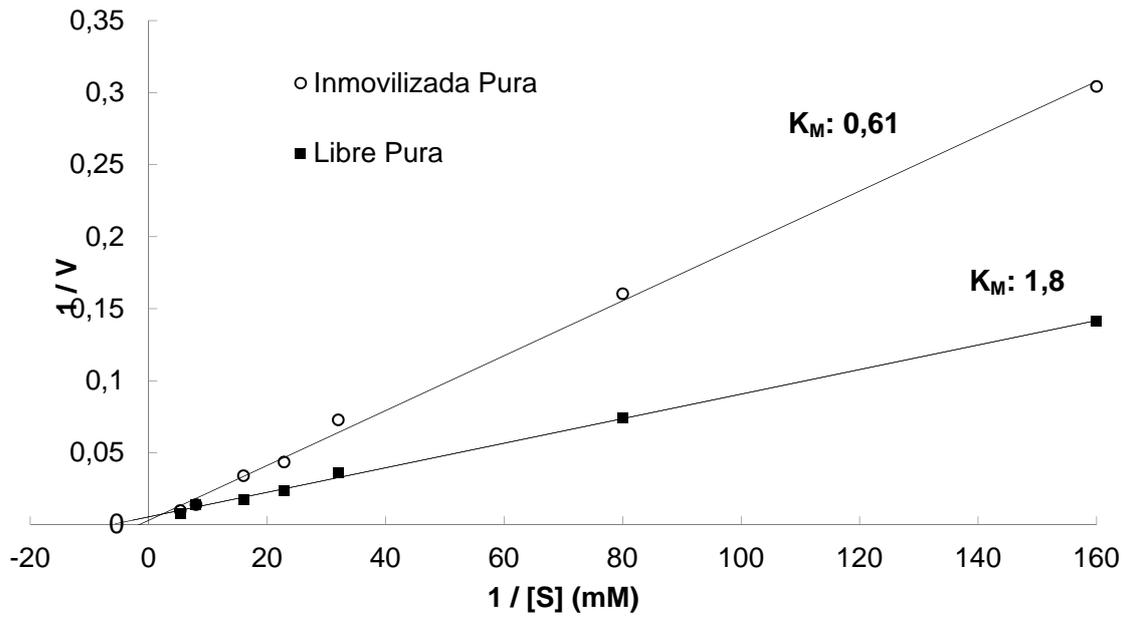


Figura 9

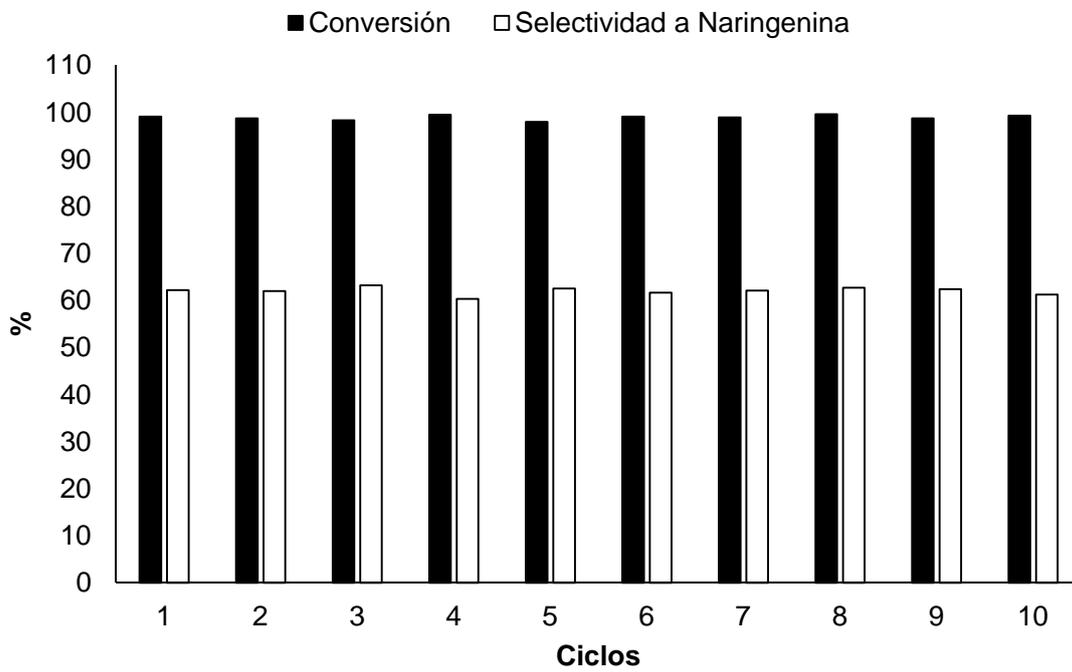


Figura 10

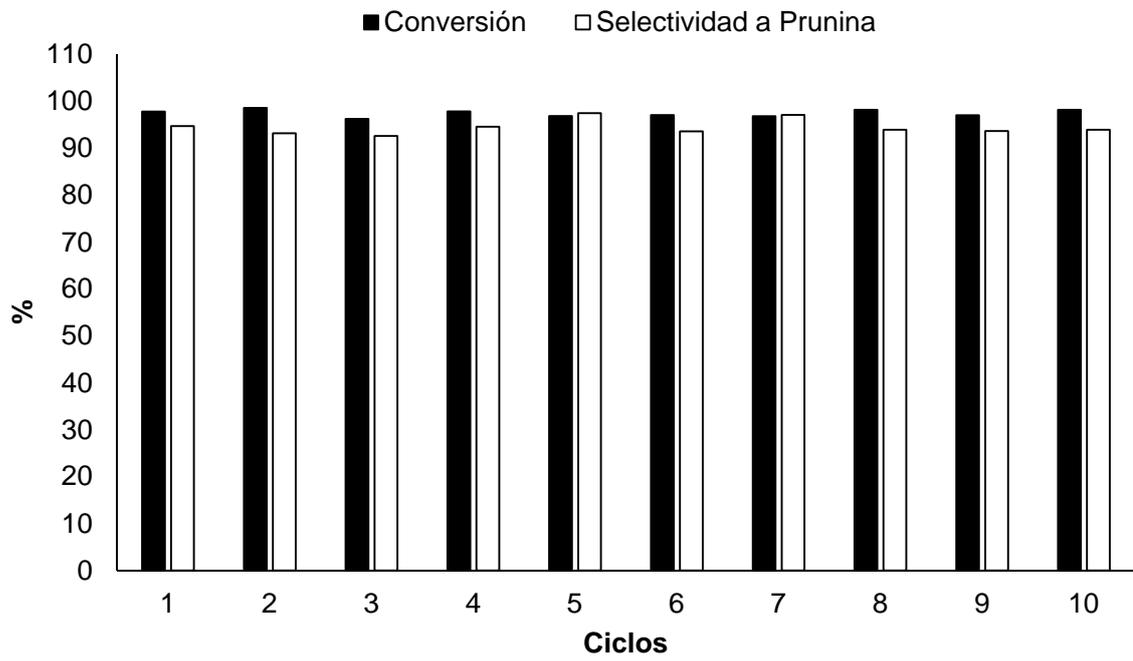


Figura 11



- ②① N.º solicitud: 201731286
②② Fecha de presentación de la solicitud: 03.11.2017
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MONTI R et al.: "Imobilização da Naringinase em Grafeno Oxidado: Estabilidade e Reuso do Derivado Enzimático", 2016, XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, [en línea] [recuperado el 12/04/2018]. Recuperado de Internet: https://www.ucs.br/site/midia/arquivos/4363-enzitec2016.pdf , Todo el documento; en particular, resumen, materiales y métodos, resultados y conclusiones.	1-3, 6, 17, 18-20 y 23-31
A	GONG A et al.: "Moving and unsinkable graphene sheets immobilized enzyme for microfluidic biocatalysis", 27/06/2017, Scientific Reports, Vol. 7, N° 4309, Páginas 1-15 [en línea] [recuperado el 13/04/2018]. Recuperado de Internet: https://www.nature.com/articles/s41598-017-04216-4 , DOI: 10.1038/s41598-017-04216-4, todo el documento; en particular, resumen, métodos y último párrafo de la página 10.	1-31
A	CN 105969826 A (UNIV JIANGSU SCIENCE & TECH) 28/09/2016, (resumen) BASE DE DATOS EPODOC [en línea], Recuperado de: EPOQUENET, E.P.O., [recuperado el 11/04/2018] & reivindicaciones.	1-31
A	CN 106191025 A (UNIV XIAMEN) 07/12/2016, (resumen) BASE DE DATOS EPODOC [en línea], Recuperado de: EPOQUENET, E.P.O., [recuperado el 11/04/2018] & reivindicaciones.	1-31
A	CN 106582810 A (UNIV JIANGNAN) 26/04/2017, (resumen) BASE DE DATOS WPI [en línea], Clarivate Analytics, [recuperado el 11/04/2018]. Recuperado de WPI en EPOQUENET, (E.P.O), DW 201736, N° DE ACCESO 2017-27953X & reivindicaciones.	1-31

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
16.04.2018

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N11/02 (2006.01)

C12N11/14 (2006.01)

C12N9/42 (2006.01)

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, EMBASE, BIOSIS, CA, INTERNET