



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ N.º de publicación: ES 2 037 594

⑫ Número de solicitud: 9101711

⑮ Int. Cl.⁵: C12N 11/08

C12N 9/04

C12S 3/02

//C07H 3/02

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **23.07.91**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.93**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.06.93

⑰ Solicitante/es:
**Universitat Autònoma de Barcelona
Bellaterra
Barcelona, ES**

⑱ Inventor/es: **Serrat Jurado, Josep M.;
Caminal Saperas, Gloria;
Godia Casablancas, Francesc y
López Santin, José**

⑲ Agente: **Ponti Grau, Ignacio**

⑳ Título: **Procedimiento para la separación de sustancias con propiedades físico-químicas afines.**

㉑ Resumen:

Procedimiento para la separación de sustancias con propiedades físico-químicas afines.

Comprende la utilización de enzimas dependientes de coenzima (cofactor), estando el enzima inmovilizado, y una de las sustancias a separar (substrato) siendo absorbida específicamente por el enzima, sin sufrir cambio en su estructura química debido a la ausencia de coenzima.

Según una realización preferida, los enzimas dependientes de coenzima son enzimas responsables de reacciones de oxidación-reducción y se aplican a la separación de azúcares.

Más particularmente, el enzima dependiente de coenzima responsable de una reacción de oxidación-reducción y aplicada a la separación de azúcares puede ser la β -galactosa deshidrogenasa y los azúcares a separar pueden ser la ramnosa y la galactosa.

El procedimiento permite la separación y recuperación del substrato.

DESCRIPCION

La presente invención se refiere a un procedimiento para la separación de sustancias, en especial sustancias con estructura molecular y propiedades fisicoquímicas muy parecidas.

Son conocidas las dificultades existentes en la actualidad para la separación de sustancias, en especial cuando estas sustancias tienen una estructura molecular y propiedades físico-químicas muy parecidas y cuando se requiere un grado de pureza elevado.

En la actualidad se utilizan varios métodos de separación, aplicables a productos de alto valor añadido, entre los cuales las cromatografías de afinidad pueden mencionarse como técnicas de elevada selectividad.

Existen algunos precedentes de la utilización de enzimas en separaciones cromatográficas para aprovechar su elevada especificidad. Banateau et al. en "Separation of a natural α -chymotrypsin inhibitor in soybean flour using affinity chromatography on immobilized α -chymotrypsin" Stud. Cercet. Biochim., 24(2), 135-42 (1981), utilizan enzimas para retener inhibidores del mismo, pero no el sustrato, puesto que éste se transformaría.

Yashura, T. and Ohashi, A. en "Apocarbonylpeptidase B-Sepharose: a specific adsorbent for peptides" Biochem. Biophys. Res. Commun. 166(1), 330-5 (1990), utilizan un enzima modificado químicamente para bloquear su acción catalítica e interactuar con el sustrato.

Los métodos publicados, utilizando enzimas, no permiten, sin embargo separar el sustrato del enzima sin que tenga lugar la reacción.

Con el procedimiento de la invención se consiguen resolver los inconvenientes citados, obteniéndose la separación con un grado de pureza elevado.

El procedimiento para la separación de sustancias, objeto de la invención, se caracteriza por el hecho de que comprende la utilización de enzimas dependientes de coenzima (cofactor), estando el enzima inmovilizado, y una de las sustancias a separar (sustrato) siendo adsorbida específicamente por el enzima, sin sufrir cambio en su estructura química debido a la ausencia de coenzima, lo cual permite su separación y recuperación.

Este procedimiento se basa en la interacción enzima-sustrato ya que los enzimas dependientes de cofactor ven bloqueada su acción catalítica en ausencia de éste y sin embargo no se ve afectada la formación del complejo enzima-sustrato. La inmovilización del apoenzima permite retener el sustrato en una fase sólida y mediante un cambio de las propiedades físico-químicas del medio, su posterior recuperación.

Mediante el procedimiento descrito el proceso de purificación de mezclas puede ser reducido a una sola etapa, lo cual incide en el rendimiento de la purificación y en el precio final del bioproducto, ya que las etapas de purificación representan, en general, un elevado coste del proceso global.

Más particularmente, el procedimiento de la invención es aplicable en el caso de que los enzimas dependientes de coenzima son enzimas responsables de reacción de oxidación-reducción. Di-

cho procedimiento es aplicable, por ejemplo, a la separación de azúcares.

En el ejemplo que se describe a continuación, el enzima dependiente de coenzima responsable de una reacción de oxidación-reducción y aplicado a la separación de azúcares, es la β -galactosa deshidrogenasa, y los azúcares a separar son la ramnosa y la galactosa.

1) Inmovilización del enzima

El enzima β -galactosa deshidrogenasa se inmovilizó en Enzacril C según el método recomendado por Koch -Light Laboratories Ltd. A tal efecto, la resina Enzacril C (334 mg) se lavó con tampón acetato sódico (0,2 M, pH 5,0) durante 5 minutos, a una temperatura entre 0 y 5°C, con agitación magnética.

Después de filtrar al vacío, el sólido resultante se supendió de nuevo en tampón acetato sódico (0,2 M, pH 5,0), se le añadió la β -galactosa deshidrogenasa (65 unidades) y se mantuvo entre 0 y 5°C, en agitación magnética durante 2 horas.

Transcurrido este tiempo se añadió una alícuota (2 ml) de una solución saturada de β -naftol en una solución saturada de acetato de sodio y se dejó reaccionar durante 2 horas.

Finalmente, el complejo Enzacril C-enzima se sometió a un lavado con una solución diluida de tampón acetato sódico, ClNa (0,5-1 M) y tampón acetato sódico (0,2 M, pH 5,0).

2) Adsorción de la galactosa en la β -galactosa deshidrogenasa inmovilizada

Se empacó el complejo Enzacril C-enzima en una columna de 1 ml de volumen. Durante esta operación se dispuso de un mecanismo de inyección de muestras (válvula de tres vías), de un espectrofotómetro-UV conectado a la salida de la columna y de un sistema de bombeo de eluyente.

Se utilizó como eluyente tampón fosfato sódico (0,2 M, pH 8,6), el cual se introdujo en la columna a un caudal de 0,1 ml/min. Una vez estabilizado el lecho, se dejó fluir por la columna una solución de galactosa (0,05% P/V) durante 20 minutos (dos volúmenes de columna) para permitir la formación del complejo apoenzima-sustrato. Transcurrido este tiempo se lavó el lecho mediante tres volúmenes de tampón fosfato sódico (0,2 M, pH 8,6).

Para mostrar la retención de galactosa por la columna, se preparó una solución del cofactor del enzima (NAD 0,5% P/V) y se inyectaron a la columna 200 μ l del mismo. El espectro de absorción del efuyente presentó dos máximos de absorción (a 260 nm y a 340 nm) lo que indicó la reducción de NAD a NADH. La reducción del NAD no hubiera podido tener lugar sin la previa adsorción de la galactosa sobre el apoenzima.

Se determinó simultáneamente la adsorbancia a 340 nm del efuyente, con lo que se calcularon los moles de NAD reducidos y, a partir de la estequiometría de la reacción (1 mol de galactosa por cada mol de NADH), el número de moles de galactosa que había adsorbido la columna. La capacidad calculada fué de 100 mg de galactosa.

Después se procedió a la separación de una mezcla de ramnosa y galactosa, y a la recuperación de la galactosa mediante un cambio de las propiedades físico-químicas del eluyente.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la separación de sustancias, **caracterizado** por el hecho de que comprende la utilización de enzimas dependientes de coenzima (cofactor), estando el enzima inmovilizado, y una de las sustancias a separar (sustrato) siendo adsorbida específicamente por el enzima, sin sufrir cambio en su estructura química debido a la ausencia de coenzima, lo cual permite su separación y recuperación.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que los enzimas dependientes de coenzima son enzimas responsables de reacciones de oxidación-reducción.

3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** por el hecho de que los enzimas

dependientes de coenzima responsables de reacciones de oxidación-reducción se aplican a la separación de azúcares.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** por el hecho de que el enzima dependiente de coenzima responsable de una reacción de oxidación-reducción y aplicado a la separación de azúcares es la β -galactosa deshidrogenasa y los azúcares a separar son la ramnosa y la galactosa.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, **caracterizado** por el hecho de que el enzima β -galactosa deshidrogenasa es inmovilizado en Enzacril C, formándose el complejo Enzacril C-enzima para facilitar la adsorción de la galactosa en la β -galactosa deshidrogenasa.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 037 594
⑫ N.º solicitud: 9101711
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: **23.07.91**
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁵: C12N11/08, 9/04, C12S3/02 //C07H3/02

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP-A-0284960 (SIRAC SRL) * todo el documento *	1-5
A	ES-A-0337099 (LAEVOSAN-GESELLSCHAFT) * todo el documento *	1-5
A	BASE DE DATOS WPAT, no. acceso 83-835283/49, 1983, Derwent Publ. Ltd., London, GB & JP-A-58183094 (MATSUSHITA ELEC WORKS) 26.10.1983 * resumen *	1-5
A	BASE DE DATOS WPAT, no. acceso 90-169818/22, 1990, Derwent Publ. Ltd., London, GB & SU-A-1521775 (AS UKR SURFACE CHEM) 15.11.1989 * resumen *	1-5

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 n.º:

Fecha de realización del informe 14.07.92	Examinador A. Maquedano Herrero	Página 1/1
--	------------------------------------	---------------