



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 100 819**

⑫ Número de solicitud: 9502335

⑤① Int. Cl.⁶: C12P 19/36

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫② Fecha de presentación: **27.11.95**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.97**

Fecha de concesión: **13.11.97**

⑫⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **16.12.97**

⑫⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:
16.12.97

⑦③ Titular/es: **Universidad de Murcia**
Avda. Teniente Flomesta, s/n
Edf. Convalecencia, 3ª planta
30003 Murcia, ES

⑦② Inventor/es: **Iborra Pastor, José Luis;**
Obon de Castro, José María y
Manjón Rubio, Arturo

⑦④ Agente: **Ungría López, Javier**

⑤④ Título: **Método de retención de NAD(P)(H) en estado nativo con membranas de ultrafiltración no cargadas.**

⑤⑦ Resumen:

Método de retención de NAD(P)(H) en estado nativo con membranas de ultrafiltración no cargadas. Comprende introducir en el reactor de funcionamiento continuo para una síntesis química enzimática, los co(enzimas) NAD(P)(H) tanto en forma oxidada como reducida, incluyendo en el medio de reacción polietilenoimina que hace que tanto las co(enzimas) como el polímero sean retenidos por membranas de ultrafiltración no cargada con un límite de exclusión inferior al peso molecular de la polietilenoimina.

Aplicación en la industria química, y en especial, en síntesis orgánica vía enzimática.

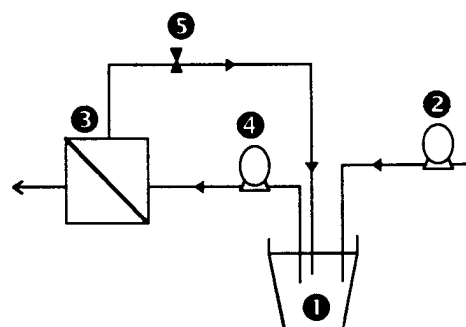


Figura 1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 100 819 B1

DESCRIPCION

Método de retención de NAD(P)(H) en estado nativo con membranas de ultrafiltración no cargadas.

Objeto de la invención

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de la síntesis química con enzimas en reactores de funcionamiento en continuo.

Más concretamente, la presente invención, proporciona un nuevo método para la retención de las coenzimas NAD^+ y NADP^+ en estado nativo dentro de un reactor químico.

Estado de la técnica anterior a la invención

Se conocen aproximadamente 500 enzimas que requieren NAD(P)(H), y que potencialmente pueden ser utilizadas en los procesos de síntesis química. Estas enzimas se clasifican siguiendo el criterio de la comisión de enzimas y dentro de cada grupo se va a destacar a modo de ejemplo la síntesis de algunos compuestos entre los que destacan ácidos orgánicos, aminoácidos, esteroides y feromonas:

- Oxidoreductasas que actúan sobre el grupo alcohol como donadores. Se ha descrito la obtención de ácido D y L-cloroláctico, ácido glicídico, o ácido (R)-2-hidroxi-4 -fenil-butanoico con D o L-lactato deshidrogenasa, de L-carnitina con L-carnitina deshidrogenasa, de (S)-(+)-sulcatol o (+)-gransidol o swerosido con alcohol deshidrogenasa, de ácido glucónico con glucosa 1-deshidrogenasa, de ácido 6-fosfogluconico con glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa, de fructosa o D-xilulosa con sorbitol deshidrogenasa, de manitol con manitol 2-deshidrogenasa, o de sorbitol con aldosa reductasa.

- Oxidoreductasas que actúan sobre grupos aldehidos y cetona como donadores. Entre las enzimas implicadas destacan aldehido deshidrogenasa, lactaldehido deshidrogenasa, o piruvato deshidrogenasa.

- Oxidoreductasas que actúan sobre grupos $\text{HC}=\text{CH}$ como donadores. Sirva como ejemplo las reducciones de dobles enlaces o aldehidos y cetonas α , β - insaturados con 2-enolato reductasa, o la síntesis de cortisona con cortisona α ó β reductasa.

- Oxidoreductasas que actúan sobre grupos CH-NH_2 como donadores. Se ha descrito la síntesis de L-alanina y L-serina con L-alanina deshidrogenasa, de L-leucina y L-valina con L-leucina deshidrogenasa, de L-fenilalanina con L-fenilalanina deshidrogenasa, o de L-glutámico con glutamato deshidrogenasa.

- Oxidoreductasas que actúan sobre grupos CH-NH como donadores, Enzimas importantes de este grupo son la efedrina deshidrogenasa, y la taupina deshidrogenasa.

- Oxidoreductasas que actúan sobre grupos CH-OH con la incorporación de oxígeno molecular. Sirva como ejemplo la obtención de lactonas quirales a partir de meso-cetonas con ciclohexanona monooxigenasa. Otras enzimas importantes dentro de este grupo son tolueno dioxigenasa, salicilato 1-monooxigenasa, anhidrotetraciclina monooxigenasa, limoneno 3-monooxigenasa, o esteroide monooxigenasa.

No todas estas enzimas son aplicables a la síntesis química de un determinado producto, ya que el proceso enzimático con enzimas NAD(P)(H) dependientes va a competir con procesos de síntesis química orgánica con procesos fermentativos o con procesos con células en estado durmiente. Para que el proceso enzimático pueda ser rentable será necesario que el enzima o enzimas implicadas presenten elevada actividad y estabilidad en las condiciones de reacción, que la coenzima sea regenerada eficazmente, así como que exista una accesibilidad económica de las preparaciones enzimáticas. La principal ventaja que supone la vía enzimática frente a la síntesis química es la elevada estereoespecificidad y regioespecificidad de las enzimas en el caso de que se quiera obtener un compuesto quiral. Frente a un proceso fermentativo o con células durmientes presenta las ventajas de ser un proceso más rápido y eficiente, obteniéndose un producto libre de subproductos de reacción.

En estos procesos de síntesis química con enzimas, se tiende a la utilización de reactores de funcionamiento continuo frente a los discontinuos, debido a que en estos últimos reactores es posible retener el enzima, lo que permite minimizar los costes de enzima y de operación, simplificar las operaciones de separación de producto y enzima y aumentar la productividad. Además, en el caso de las enzimas que necesitan coenzimas, el hecho de que este coenzima pueda quedar retenido supone también una reducción en los costes de producción.

En esta línea, la presente invención proporciona un procedimiento para la retención de NAD(P)(H) en estado nativo dentro del reactor que presenta dos ventajas fundamentales: la no necesidad de la modificación química del coenzima, con la reducción de costes que ello conlleva, y una mayor eficacia catalítica para las enzimas, lo que aumentará el número de las mismas que puedan emplearse con este método de retención de la coenzima.

Descripción detallada de la invención

La presente invención, tal y como se indica en su enunciado se refiere a un método de retención de NAD (P) (H) en estado nativo con membranas de ultrafiltración no cargadas.

El objetivo de la presente invención es por tanto, mejorar los métodos de retención de estos coenzimas, basándose en que el método propuesto no precisa una costosa modificación química de los coenzimas, ni necesita de membranas de separación específicos de elevado coste.

El método objeto de la invención se basa en la utilización del polímero de alto peso molecular, polietilenoimina, para la retención de las coenzimas NAD⁺ (dinucleótido de adenina y nicotinamida) y NADP⁺ (dinucleótido de adenina y nicotinamida fosfato) en sus estados oxidado y reducido. La polietilenoimina se retiene dentro de un reactor en funcionamiento continuo por medio de membranas de ultrafiltración no cargadas cuyo límite de exclusión es menor que el peso molecular del polímero, sin experimentar pérdidas apreciables durante el proceso. La polietilenoimina es introducida al inicio del proceso junto con el coenzima dentro del reactor, y será solo necesario adicionar nuevo coenzima si la retención en las condiciones de trabajo no es completa o para contrarrestar la desactivación del coenzima.

El sistema de síntesis química, de acuerdo con la invención se representa en el esquema de la Figura 1 y única. Como puede apreciarse el sistema consta de dos zonas. En una primera zona tiene lugar la síntesis química por presencia del enzima y del coenzima dentro del reactor (1) en contacto con el sustrato que es alimentado por medio de una bomba de entrada (2). Este reactor se deberá encontrar termostatzado de manera que la temperatura del proceso pueda ser adecuadamente controlada. La segunda zona es la encargada de separar el producto y el sustrato que no haya reaccionado, del enzima, coenzima y polietilenoimina que permanecen en el interior del reactor o en las conducciones correspondientes. La separación ocurre por filtración con membranas de ultrafiltración no cargadas (3) de límite de exclusión inferior al de la polietilenoimina y está gobernada por la presión transmembrana. Esta presión se genera bien por una bomba de recirculación (4) y una pinza restrictora del flujo (5) en el caso de una configuración de flujo transversal, o por gas a presión de acuerdo con una configuración de flujo paralelo que así lo permita. En el primer caso, la mezcla de reactivos está asegurada manteniendo un flujo de recirculación suficientemente alto, mientras que en el segundo caso sería necesaria la agitación mecánica. En este tipo de reactor la disminución de actividad enzimática debida a la transferencia de materia está minimizada, en comparación con reactores de flujo pistón.

El parámetro que caracteriza la retención de una molécula en un reactor continuo por una membrana es el grado de retención, cuyo valor está comprendido entre uno, para una retención total, y cero, en el caso de que la molécula no sea retenida. El grado de retención de NAD(P)⁺ en estado nativo se va a ver influido por factores como la concentración de polietilenoimina, la fuerza iónica y el pH del medio de reacción, así como por la composición y límite de exclusión de la membrana de ultrafiltración empleada.

La relación entre las concentraciones de polietilenoimina y NADP⁺ se ha visto que debe ser igual o superior a uno para maximizar el grado de retención. La concentración de polietilenoimina, polímero fácilmente soluble en agua, que se utilice va a depender del peso molecular del polímero. En general, con polietilenoimina comercial de 50kD de peso molecular, se pueden obtener concentraciones superiores a 2mM, que son mucho mayores que las concentraciones usadas de NAD(P)⁺ normalmente próximas a 0,2mM, acordes con los valores de la constante de Michaelis-Menten de las enzimas.

El aumento de fuerza iónica en el medio de reacción va a disminuir la retención del coenzima, que en un medio sin fuerza iónica es totalmente retenido. En la Tabla 1 se presentan los valores del grado de retención obtenidos en presencia de aditivos. Los valores han sido determinados en presencia de polietilenoimina y NADP⁺, ambos a una concentración 1mM, en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 9,0.

El aumento de la concentración de cloruro sódico lleva asociado una disminución del grado de retención, que puede ser parcialmente contrarrestado por presencia de proteínas como la albúmina de suero bovino. Igualmente es de esperar que la presencia de las enzimas implicadas en el proceso de síntesis química mejore el grado de retención. Otros aditivos como el sorbitol, ensayados hasta una concentración

3M, no afectaron al grado de retención.

El pH del medio de reacción no afecta al grado de retención en el rango entre pH 5,0 y 9,0, a valores superiores, pH 10,0, e inferiores, entre pH 3,0 y 5,0, hay sin embargo una disminución próxima al 15 %.

TABLA 1

Grado de retención de $NAD(P)^+$ en presencia de aditivos.

Aditivos ensayados	Grado de retención $NADP^+$	Grado de retención NAD^+
Sin aditivos	0,98	0,99
NaCl 0,05 M	0,98	0,65
NaCl 0,10 M	0,94	0,50
NaCl 0,15 M	0,89	-
NaCl 0,25 M	0,73	-
NaCl 0,40 M	0,60	-
NaCl 0,40 M, 1,5 % BSA	0,83	-

La membrana de ultrafiltración a elegir será aquella que permita obtener los mayores flujos, reteniendo la polietilenoimina, y que adicionalmente tenga una baja adsorción inespecífica de proteínas. La selección del límite de exclusión de la membrana va a depender del peso molecular de la polietilenoimina utilizada. En esta invención las membranas de ultrafiltración empleadas han sido asimétricas, y de polisulfona con un límite de exclusión de 10kD. La polietilenoimina aumenta la viscosidad del medio y consecuentemente disminuye los flujos de filtrado, mientras que la adición de cloruro sódico los aumenta. En el caso de una concentración 1 mM de polietilenoimina y las membranas de polisulfona de 10 kD la disminución del flujo inicial de 1,76 ml/h/cm²/bar en ausencia de cloruro sódico, es de un 50 %. Estos flujos son lo suficientemente altos como para permitir un escalado del proceso.

Breve descripción de la figura

La figura 1 y única que se incluye en esta memoria representa un esquema del dispositivo de síntesis química empleado para desarrollar el método de la presente invención. En dicha Figura, las referencias numéricas tienen los siguientes significados:

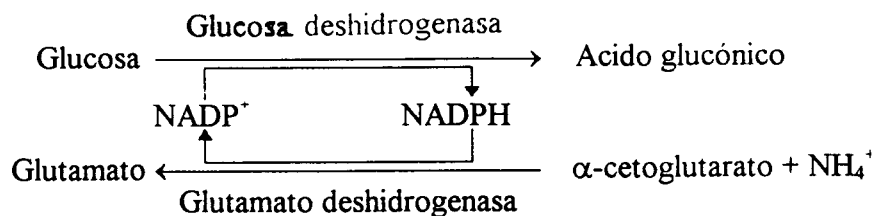
- 1.- Reactor
- 2.- Bomba de entrada
- 3.- Membranas de ultrafiltración no cargadas
- 4.- Bomba de recirculación
- 5.- Pinza restrictora de flujo

Modo de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente Ejemplo el cual no pretende ser limitativo de su alcance.

Ejemplo

Un ejemplo de la retención de $NADP^+$ en un reactor continuo para la síntesis química ha sido aplicado a la obtención simultánea de gluconato sódico y glutamato sódico por reacción acoplada de las enzimas glucosa deshidrogenasa y glutamato deshidrogenasa dependientes de $NADP^+$ y de origen halófilo. Los sustratos de las reacciones son glucosa y α -cetoglutarato y amonio, respectivamente para cada producto. En un esquema del proceso se pueden ver más claramente las reacciones acopladas.



Estas enzimas han sido seleccionadas como ejemplo al ser una de las más utilizadas en la regeneración enzimática de NADPH (glucosa deshidrogenasa) y de NADP^+ (glutamato deshidrogenasa). El sistema continuo utilizado es el descrito en la figura 1, y en él se retiene el NADP^+ , las enzimas, y la polietilenoimina por medio de membranas de ultrafiltración de polisulfona de 10kD de límite de exclusión.

El primer paso para la utilización de estas enzimas es establecer en qué condiciones las enzimas se muestran estables y activas de manera que la reacción acoplada pueda llevarse a cabo. Aunque la polietilenoimina es usada como agente precipitante de proteínas, y en general no afecta negativamente a la estabilidad, este hecho debe ser comprobado experimentalmente. Estudios de termoestabilidad mostraron que las enzimas eran estables a 30°C en presencia de cloruro sódico 0,3 M, polietilenoimina 1 mM, sorbitol 3 M, en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 9,0. Los tiempos de vida media calculados fueron de 26,7 días, para glucosa deshidrogenasa, y 14,6 días para glutamato deshidrogenasa. Bajo estas condiciones la reacción acoplada en continuo tiene lugar.

Un experimento en continuo con la misma actividad glucosa deshidrogenasa y glutamato deshidrogenasa ($V_m=0,04$ mM/min) permitió estudiar el efecto del flujo de entrada de sustrato en la conversión, y por tanto la productividad del reactor. El grado de retención de NADP^+ determinado fue de 0,9. Las concentraciones de sustrato empleadas fueron de 20 mM glucosa, 30 mM α -cetoglutarato, 60 mM amonio, y el medio de reacción fue el mismo en el que se obtuvieron valores de estabilidad enzimática adecuados. La conversión viene expresada con glucosa como sustrato. Los valores obtenidos vienen presentados en la Tabla 2.

TABLA 2
Productividad de ácido glucónico con la reacción acoplada.

Flujo (ml/h)	Conversión (%)	Productividad (g/l/h)
1	90	0,16
2	80	0,29
5	40	0,36
10	20	0,36
15	12	0,32

La pérdida de actividad enzimática por la temperatura se puede contrarrestar con la adición de nueva enzima, y la productividad que se obtiene puede aumentarse con la concentración de enzima, no siendo sin embargo el objeto de la invención el hacer una evaluación económica de la obtención de ácido glucónico y glutamato, sino ofrecer un ejemplo de aplicabilidad.

En este ejemplo la regeneración del coenzima tiene lugar por acoplamiento de dos reacciones enzimáticas. La regeneración del coenzima se puede hacer extensiva a la vía electroquímica que permite alcanzar números de regeneración lo suficientemente altos como para competir frente a un sistema de regeneración enzimática.

REIVINDICACIONES

1. Método de retención de NAD(P) (H) en estado nativo con membranas de ultrafiltración no cargadas aplicable a procesos de síntesis química con dichas enzimas en reactores de funcionamiento en continuo;
5 **caracterizado** porque dichos enzimas NAD⁺ (dinucleótido de adenina y nicotinamida) y NADP⁺ (dinucleótido de adenina y nicotinamida fosfato), en su forma oxidada y reducida, se encuentran retenidas dentro del reactor de funcionamiento en continuo, habiendo presente en el medio de reacción un polímero de alto peso molecular la polietilenoimina, que hace que tanto dichos dinucleótidos como dicho polímero sean retenidos por medio de membranas de ultrafiltración no cargadas con un límite de exclusión inferior
10 al peso molecular de la polietilenoimina.
2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se emplea polietilenoimina de cualquier peso molecular o uno de sus derivados.
- 15 3. Método según las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado** porque las membranas de ultrafiltración están o no cargadas y son simétricas o asimétricas, con una composición distinta a la de la polisulfona, que de por sí y en ausencia de polietilenoimina no retenga la enzima.
- 20 4. Método según las reivindicaciones 1, 2 ó 3, **caracterizado** porque el módulo de ultrafiltración utiliza tanto un sistema de flujo tangencial como un sistema de flujo paralelo.

25

30

35

40

45

50

55

60

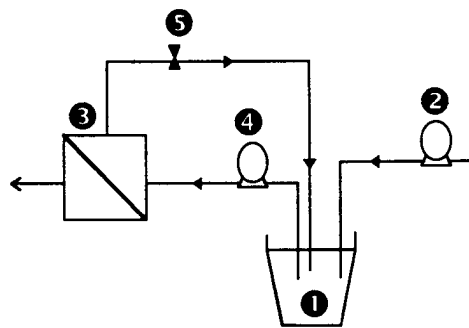


Figura 1



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 100 819
⑫ N.º solicitud: 9502335
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 27.11.95
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: C12P19/36

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	KULBE, K.D., et al., "Rejection and continuous regeneration of the native coenzyme NAD(P)H in a charged ultrafiltration membrane enzyme reactor", Annals New York Academy of Sciences, 1990, vol. 613, págs. 820-826. *Ver toto el documento*	1-4
A	HOWALDT, M. et al., "A continuous enzyme membrane reactor retaining the native nicotinamide cofactor NAD(H)", Annals New York Academy of Sciences, 1990, vol. 589, págs. 253-260. *Ver todo el documento*	1-4
A	IKEMA, M., et al., "Sorbitol production in charged membrane bioreactor with coenzyme regeneration system: I. Selective retainment of NADP(H) in a continuous reaction", Biotechnology and Bioengineering, 1990, vol. 36, págs. 149-154. *Ver todo el documento*	1-4
A	IKEMA, M., et al., "Sorbitol production in charged membrane bioreactor with coenzyme regeneration system: II. Theoretical analysis of a continuous reaction with retained and regenerated NADPH", Biotechnology and Bioengineering, 1990, vol. 36, págs. 155-165. *Ver todo el documento*	1-4

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
12.05.97

Examinador
J.L. Vizán Arroyo

Página
1/2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 100 819
⑫ N.º solicitud: 9502335
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 27.11.95
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁶: C12P19/36

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 4304858 A (WANDREY et al.) 08.12.81 *Ver todo el documento*	1-4
A	US 4100029 A (PROSPERI et al.) 11.07.78 *Ver todo el documento*	1-4
A	EP 99742 A (GRAND METROPOLITAN BIOTECHNOLOGY LTD.) 01.02.84 *Ver todo el documento*	1-4

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
12.05.97

Examinador
J.L. Vizán Arroyo

Página
2/2