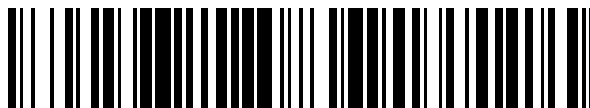


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 661**

21 Número de solicitud: 201031819

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

C12H 1/15 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

10.12.2010

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.09.2012

Fecha de la concesión:

21.10.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

31.10.2013

73 Titular/es:

**BIOLAN MICROBIOSENSORES S.L. (100.0%)
Parque Tecnológico de Bizkaia Edificio 206B
48170 Zamudio (Bizkaia) ES**

72 Inventor/es:

**ALONSO RODRÍGUEZ, Pablo;
QUIRÓS FERNÁNDEZ, Luis Manuel;
CASTAÑÓN DE LA TORRE, Sonia;
CRESPO SUSPERREGUI, Ainara y
MAZA DEL RIO, Sonia**

74 Agente/Representante:

URÍZAR BARANDIARAN, Miguel Ángel

54 Título: **PROCESO DE PURIFICACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE LA ENZIMA GLUCONATO DESHIDROGENASA (GADH, EC 1.1.99.3); ENZIMA GLUCONATO DESHIDROGENASA (GADH, EC 1.1.99.3); Y USO DE LA ENZIMA GLUCONATO DESHIDROGENASA (GADH, EC 1.1.99.3).**

57 Resumen:

Proceso de purificación y estabilización de la enzima Gluconato Deshidrogenasa (GADH, EC 1.1.99.3) recombinante o no, a partir de varios microorganismos como por ejemplo: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Gluconobacter oxydans*, *Gluconobacter industrius*, *Serratia marcescens* *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* y su uso como elemento de reconocimiento biológico en biosensores para la determinación del ácido glucónico en muestras de interés.

Biosensor bío-catalítico con transducción electroquímica libre de interferentes gracias a la alta selectividad de la enzima obtenida mediante el método detallado y estabilizada con los agentes químicos optimizados.

ES 2 387 661 B1

DESCRIPCIÓN

PROCESO DE PURIFICACIÓN Y ESTABILIZACIÓN DE LA ENZIMA GLUCONATO DESHIDROGENASA (GADH, EC 1.1.99.3); ENZIMA GLUCONATO DESHIDROGENASA (GADH, EC 1.1.99.3); Y USO DE LA ENZIMA GLUCONATO DESHIDROGENASA (GADH, EC 1.1.99.3)

5 ESTADO DEL ARTE

Frente a los métodos analíticos convencionales (HPLC con varios detectores, espectrofotometría de absorción atómica, polarografía...etc.) los métodos bio-analíticos han experimentado un gran interés gracias a la alta selectividad de los elementos de reconocimiento biológico. El ejemplo más revelante de este aumento de interés es la invención revolucionaria de los biosensores desde 1962 gracias a los trabajo de Clark y Lyon [L.C. Clark and C. Lyons, *Ann. NY. Acad. Sci* 120 (1962) 29]. Son dispositivos compactos que se basan en la integración íntima de elementos de reconocimiento biológico en un sistema de transducción de la señal física [D.R Thévenot et al *Pure. Appl. Chem* 71(1999)2333]. El desarrollo de estos dispositivos pasa de forma genérica por tres líneas de investigación: la elección del sistema de transducción de la señal física adecuado, la inmovilización y/o la integración de este elemento en la superficie sensora, y la correlación de la señal generada con la presencia del analito de interés. Estos dispositivos compactos sufren la presencia de interferentes presentes en la matriz., lo que se puede paliar mediante desarrollos quimiométricos o aplicando al biosensor materiales compatibles con el ERB.

En el bagaje bibliográfico actual se pueden encontrar muchas invenciones centradas en esta última aproximación, la aplicación de capas protectoras que sirven tanto para proteger los ERBs de los posibles inhibidores como al sistema de transducción de la señal de los interferentes. De hecho se ha usado con abundancia y con mucho éxito polímeros biocompatibles como son el acetato de celulosa [H. Gunasingham et al, *Biosensors* 4 (1989)349; X. Ren et al *Colloids Surf B Biointerfaces* 72 (2009)188; R. Vaidya and E. Wilkins, *Electroanalysis* 6 (1994) 617; L.N. Wu et al *Electrochim. Acta* 51 (2006) 1208], el quitosano [J. Lin et al *Sensors Actuators B: Chem* 137 (2009) 768; S. Hikima et al, *Fereseniu's. J. Anal. Chem* 345 (1993) 607; H. Yu et al, *Anal. Biochem* 331 (2004) 98; G. Wang

et al *Biosens. Bioelectron* 18 (2003) 335; X. Kang et al *Biosens. Bioelectron* 25 (2009) 901; J. Chem, *Electroanalysis* 18 (2006) 670] y el Nafion [M. ElKaoutit and Col WO/2009/022035; M. ElKaoutit and Col WO/2009/034200; J. Wang et al, *J. Am. Chem. Soc* 125(2003) 2408; S. H. Lim, *Biosens. Bioelectron* 20 (2005) 2341; 5 Y-C. Tsai et al *Langmuir* 21 (2005) 3653; A. A Karyakin et al, *Anal. Chem* 72 (2000) 1720; M. ElKaoutit et al *J. Agric. Food. Chem* 55 (2007)8011; M. ElKaoutit et al, *Talanta* 75 (2008) 1348; M. ElKaoutit et al, *Biosens. Bioelectron* 22 (2007) 2958].

La presente invención se ha centrado en una aproximación totalmente novedosa 10 para evitar problemas de inhibición de la enzima Gluconato Deshidrogenasa (GADH, 1.1.99.3), protegerla y darle cierta durabilidad a temperatura ambiente en una matriz típicamente compleja como es el vino o el mosto de uva. Es destacable el hecho de que la sensibilidad a ciertos inhibidores e interferentes de las enzima puede depender del organismo de donde se extrae este elemento 15 de reconocimiento biológico, de su proceso de purificación e incluso de los estabilizantes necesarios para mantener una cierta conformación estructural de la proteína. Se ha conseguido la purificación de la enzima GADH (1.1.99.3) a partir de varios microorganismos, mediante métodos muy novedosos y su estabilización en una disolución específica. Como aplicación se han fabricado 20 biosensores con simple retención física sobre una base conductora de una alícuota líquida de esta enzima mediante una membrana de diálisis junto con el mediador químico; sin aplicación de ninguna matriz de inmovilización ni un protector. El dispositivo resultante ha demostrado satisfactoria selectividad y estabilidad al ácido glucónico como sustrato en matrices típicamente complejas 25 como son el vino (muy rico en taninos y sulfitos) o/y el mosto de uva (con elevado grado de glucosa y ácido ascórbico por ejemplo).

El presente invento preconiza un proceso de purificación y estabilización de la enzima Gluconato Deshidrogenasa (GADH, EC 1.1.99.3) recombinante o no, en la que la purificación de GADH se realiza a partir de células de *Serratia* 30 *marcescens*, *Klebsella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Gluconobacter oxydans*, *Gluconobacter industrius* o *Escherichia coli*

o mezcla de ellas, y en el que la rotura celular se produce mediante sonicación u otro tipo de rotura física, procediéndose a obtener sus membranas, en el que:

a) las membranas se resuspenden por extrusión y

5 b) se realiza la solubilización de la enzima GADH de la membrana mediante la adicción de detergentes como n-Octyl- β -D-tioglucoído, Zwittergent 3-12, Twenn 80, Brij 58 o Triton X-100 en porcentajes v/v entre el 0,1% y el 3 %, se ultracentrifuga la suspensión y se recoge el sobrenadante,

c) se somete al sobrenadante a una cromatografía de intercambio iónico a un pH entre 4 y 8,5.

10 También se caracteriza porque a la enzima GADH así purificada se le añade:

- ácido glucónico a una concentración entre 5 y 20 mM;
- una concentración v/v de glicerol entre el 10 y el 50%;
- detergentes como n-Octyl- β -D-tioglucoído, Zwittergent 3-12, Twenn 80, Brij 58 o Triton X-100 a una concentración v/v entre el 0.05 y 2%;

15 - un catión divalente que puede ser MgCl₂, CaCl₂ o BaCl₂ a una concentración entre 1 y 10 mM; y

uno o varios de los siguientes hidratos de carbono en una concentración v/v entre el 1 y el 20%; trehalosa, malitol, manitol, sorbitol, dextran y Ficoll™.

20 También es objeto de la invención la Enzima Gluconato Deshidrogenasa (GADH) obtenida de acuerdo con este proceso.

Así mismo, es objeto de la invención el uso de la enzima, obtenida de acuerdo con el proceso anteriormente descrito, como elemento de reconocimiento biológico para el desarrollo de dispositivos de medida del sustrato enzimático

25 ácido glucónico.

También es objeto del invento el uso de la enzima, obtenida de acuerdo con el proceso anteriormente descrito, para medir los valores de ácido glucónico en muestras alimentarias, por ejemplo, mostos y vinos.

EXPLICACIÓN DE UNA FORMA DE REALIZACIÓN PREFERENTE

- 5 Para una mejor comprensión de la presente invención, se exponen los siguientes ejemplos, descritos en detalle, que deben entenderse sin carácter limitativo del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1. Purificación de gluconato 2-deshidrogenasa (GADH, 1.1.99.3) a partir de *Pseudomonas aeruginosa*

- 10 La cepa bacteriana utilizada para esta invención, *Pseudomonas aeruginosa* CECT 108, puede ser cultivada en cualquier medio que induzca el ciclo de las pentosas fosfato.

- En el paso de producción se emplearon 2 matraces Erlenmeyer de 2 litros, cada uno conteniendo 600 ml de medio, que habían sido inoculados con un 10% de volumen de cultivo crecido en el mismo medio hasta obtener una $OD_{600}=2,5$. Los
15 cultivos fueron incubados a 28°C hasta su fase exponencial tardía (aproximadamente 12 horas).

- Los cultivos fueron centrifugados durante 45 minutos a 9000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se recogió el precipitado. La masa celular fue conservada en
20 congelación a -80°C hasta el momento de su ruptura.

- Para comenzar la ruptura de las células, se descongelaron y se resuspendieron en 5 veces su volumen en tampón acetato 50 mM y un pH=4.5 de ruptura. Se añadieron 5 mg/ml de lisozima e inhibidor de proteasas y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. En este momento, se
25 añadió 0,5 ml de DNasa II 1 mg/ml en NaCl 0,15 M y se mantuvieron las células en agitación en el tampón descrito a 4°C hasta el día siguiente.

Más tarde las células se sometieron a 6 pulsos de sonicación, con un 50% de amplitud. Se centrifugaron, para separar las células no rotas y las paredes celulares (precipitado) del sobrenadante, que contenía las proteínas

citoplasmáticas y las membranas celulares en suspensión. Se evitó recoger el sobrenadante de mayor densidad, que quedaba sobre el precipitado, por la dificultad que suponía la separación de las proteínas citoplasmáticas de las proteínas de membrana.

- 5 El sobrenadante se ultracentrifugó a 20000 rpm, tras lo cual se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado nuevamente en tampón acetato 50 mM pH=4,5 para eliminar la mayor cantidad posible de proteínas citoplasmáticas retenidas en las membranas precipitadas. Se ultracentrifugó a 20000 rpm y se desechó nuevamente el sobrenadante.
- 10 Las membranas se resuspendieron esta vez en tampón acetato 20 mM pH=4,5 aproximadamente 2 ml. Para homogeneizar la suspensión se sometieron a baño de ultrasonidos, evitando el calentamiento de la muestra mediante la introducción del tubo de vidrio que la contenía en hielo en escamas.

- En este momento, se cuantificó proteína mediante reactivo de Bradford en espectrofotómetro a 595 nm de longitud de onda y actividad enzimática, también en espectrofotómetro, a 600 nm durante 5 minutos. Los reactivos empleados para el ensayo enzimático fueron 700 µl de tampón fosfato 135 mM pH=4.5, 100 µl de gluconato 165 mM en el mismo tampón fosfato, 100 µl de DCPIP 2,2 mM y 100 µl de PMS 13 mM.
- 15

- 20 Se incrementó el volumen de tampón de resuspensión hasta obtener una concentración de proteína 10 mg/ml. Se añadió detergente Triton X-100 al 0,5% para solubilizar las proteínas de membrana y se mantuvo en agitación a 4°C durante la noche.

- Al día siguiente, se ultracentrifugó a 35000 rpm la suspensión. Se desechó el precipitado, se recogió el sobrenadante y se midió nuevamente la actividad enzimática.
- 25

- El sobrenadante se sometió a cromatografía de intercambio iónico en un equipo FPLC, utilizando como tampón A: acetato 20 mM pH=4,5 y Triton X100 al 0,1% y, como tampón B, el mismo, añadiendo KCl 1M. Se eluyó la muestra con un gradiente de 0 a 50%, con un flujo de 1 ml/min. Se realizó ensayo enzimático y
- 30

cuantificación de proteína de las fracciones eluidas, para realizar una selección de aquellas fracciones que tuviesen mayor actividad específica.

Se concentró la enzima mediante ultrafiltración en membrana de 50000 MWCO de diámetro de corte hasta obtener una concentración aproximada de 0,2 UE/ μ l.

- 5 Para su conservación, se añadió como agente solovofóbico 15% de glicerol y detergente 1% de Triton X-100, un agente crioprotector 1% de Trehalosa y estabilizantes a base de cationes divalentes y/o sustratos naturales de la enzima.

Ejemplo 2. Purificación de gluconato 2-deshidrogenasa (GADH, 1.1.99.3) a partir de *Gluconobacter Oxydans*.

- 10 La cepa bacteriana utilizada para esta invención, *Gluconobacter oxydans* CECT 360, puede ser cultivada en cualquier medio que induzca el ciclo de las pentosas fosfato.

- 15 En el paso de producción se emplearon 6 matraces Erlenmeyer de 2 litros, cada uno conteniendo 600 ml de medio, que habían sido inoculados con un 10% de volumen de cultivo crecido en el mismo medio hasta obtener una $OD_{600}=2$. Los cultivos fueron incubados a 30°C hasta su fase exponencial tardía (aproximadamente 48 horas).

- 20 Los cultivos fueron centrifugados durante 45 minutos a 9000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se recogió el precipitado. La masa celular fue conservada en congelación a -80 °C hasta el momento de su ruptura.

- 25 Para comenzar la ruptura de las células, se descongelaron y se resuspendieron en 5 veces su volumen en tampón fosfato 100 mM pH=6. Se añadieron 5 mg/ml de lisozima e inhibidor de proteasas y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. En este momento, se añadió 0,5 ml de DNasa II 1 mg/ml en NaCl 0,15 M y se mantuvieron las células en agitación en el tampón descrito a 4°C hasta el día siguiente.

Más tarde las células se descongelaron y se sometieron a dos pasos por prensa French a 1000 Kg/cm². Se centrifugaron, para separar las células no rotas y las paredes celulares (precipitado) del sobrenadante, que contenía las proteínas

citoplasmáticas y las membranas celulares en suspensión. Se evitó recoger el sobrenadante de mayor densidad, que quedaba sobre el precipitado, por la dificultad que suponía la separación de las proteínas citoplasmáticas de las proteínas de membrana.

- 5 El sobrenadante se ultracentrifugó a 20000 rpm, tras lo cual se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado nuevamente en tampón fosfato 50 mM pH=6 para eliminar la mayor cantidad posible de proteínas citoplasmáticas retenidas en las membranas precipitadas. Se ultracentrifugó a 20000 rpm y se desechó nuevamente el sobrenadante.
- 10 Las membranas se resuspendieron esta vez en tampón fosfato 20 mM pH=7, aproximadamente 6 ml. Para homogeneizar la suspensión se sometieron a baño de ultrasonidos, evitando el calentamiento de la muestra mediante la introducción del tubo de vidrio que la contenía en hielo en escamas.

- En este momento, se cuantificó proteína mediante reactivo de Bradford en espectrofotómetro a 595 nm de longitud de onda y actividad enzimática, también en espectrofotómetro, a 600 nm durante 5 minutos. Los reactivos empleados para el ensayo enzimático fueron 700 µl de tampón fosfato 135 mM pH=5, 100 µl de gluconato 165 mM en el mismo tampón fosfato, 100 µl de DCPIP 2,2 mM y 100 µl de PMS 13 mM.
- 15

- 20 Se incrementó el volumen de tampón de resuspensión hasta obtener una concentración de proteína 10 mg/ml. Se añadió detergente Twenn 80 al 0.5% para solubilizar las proteínas de membrana y se mantuvo en agitación a 4 °C durante la noche.

- Al día siguiente, se ultracentrifugó a 35000 rpm la suspensión. Se desechó el precipitado, se recogió el sobrenadante y se midió nuevamente la actividad enzimática.
- 25

- El sobrenadante se sometió a cromatografía de intercambio iónico en un equipo FPLC, utilizando como tampón A: fosfato 20 mM pH=7 y Twenn 80 al 0,1% y, como tampón B, el mismo, añadiendo KCl 1M. Se eluyó la muestra con un gradiente de 0 a 50%, con un flujo de 1 ml/min. Se realizó ensayo enzimático y
- 30

cuantificación de proteína de las fracciones eluídas, para realizar una selección de aquellas fracciones que tuviesen mayor actividad específica.

Se concentró la enzima mediante ultrafiltración en membrana de 50000 MWCO de diámetro de corte hasta obtener una concentración aproximada de 0,2 UE/μl.

- 5 Para su conservación, se añadió como agente solvofóbico 15% de glicerol y detergente 1% de Twenn 80, un agente crioprotector 3% de Dextran 40 y estabilizantes a base de cationes divalentes y/o sustratos naturales de la enzima.

Ejemplo 3. Purificación de gluconato 2-deshidrogenasa (GADH, 1.1.99.3) a partir de *Serratia marcescens*.

- 10 La cepa bacteriana utilizada para esta invención, *Serratia marcescens* IFO 3054, fue cultivada en un medio que contenía 0,1% de polipeptona, 0,1% de extracto de levadura, 0,1% de NaCl, 0,3% de KH₂PO₄, 0,04% Na₂SO₄ y 0,04 de MgSO₄ x 7H₂O.

- 15 En el paso de producción se emplearon 2 matraces Erlenmeyer de 2 litros, cada uno conteniendo 600 ml de medio, que habían sido inoculados con un 10% de volumen de cultivo crecido en el mismo medio hasta obtener una OD₆₀₀=3. Los cultivos fueron incubados a 26 °C hasta su fase exponencial tardía (aproximadamente 48 horas).

- 20 Los cultivos fueron centrifugados durante 45 minutos a 9000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se recogió el precipitado. La masa celular fue conservada en congelación a -80 °C hasta el momento de su ruptura.

- 25 Para comenzar la ruptura de las células, se descongelaron y se resuspendieron en 5 veces su volumen en tampón fosfato 100 mM pH=6. Se añadieron 5 mg/ml de lisozima e inhibidor de proteasas y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos. En este momento, se añadió 0,5 ml de DNasa II 1 mg/ml en NaCl 0,15 M y se mantuvieron las células en agitación en el tampón descrito a 4°C hasta el día siguiente.

Más tarde las células se descongelaron y se sometieron a dos pasos por prensa French a 1000 Kg/cm². Se centrifugaron, para separar las células no rotas y las

paredes celulares (precipitado) del sobrenadante, que contenía las proteínas citoplasmáticas y las membranas celulares en suspensión. Se evitó recoger el sobrenadante de mayor densidad, que quedaba sobre el precipitado, por la dificultad que suponía la separación de las proteínas citoplasmáticas de las proteínas de membrana.

El sobrenadante se ultracentrifugó a 20000 rpm, tras lo cual se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado nuevamente en tampón fosfato 50 mM pH=6 para eliminar la mayor cantidad posible de proteínas citoplasmáticas retenidas en las membranas precipitadas. Se ultracentrifugó a 20000 rpm y se desechó nuevamente el sobrenadante.

Las membranas se resuspendieron esta vez en tampón acetato 20 mM pH=5, aproximadamente 2 ml. Para homogeneizar la suspensión se sometieron las membranas a extrusión a través de una jeringa.

En este momento, se cuantificó proteína mediante reactivo de Bradford en espectrofotómetro a 595 nm de longitud de onda y actividad enzimática, también en espectrofotómetro, a 600 nm durante 5 minutos. Los reactivos empleados para el ensayo enzimático fueron 700 µl de tampón fosfato 135 mM pH=4.5, 100 µl de gluconato 165 mM en el mismo tampón fosfato, 100 µl de DCPIP 2,2 mM y 100 µl de PMS 13 mM.

Se incrementó el volumen de tampón de resuspensión hasta obtener una concentración de proteína 15 mg/ml. Se añadió detergente n-Octyl-β-D-tiogluósido al 2% para solubilizar las proteínas de membrana y se mantuvo en agitación a 4°C durante la noche.

Al día siguiente, se ultracentrifugó a 35000 rpm la suspensión. Se desechó el precipitado, se recogió el sobrenadante y se midió nuevamente la actividad enzimática.

El sobrenadante se sometió a cromatografía de intercambio iónico en un equipo FPLC, utilizando como tampón A: fosfato 20 mM pH=7 y n-Octyl-β-D-tiogluósido al 0,1% y, como tampón B, el mismo, añadiendo KCl 1M. Se eluyó la muestra con un gradiente de 0 a 50%, con un flujo de 1 ml/min. Se realizó ensayo

enzimático y cuantificación de proteína de las fracciones eluidas, para realizar una selección de aquellas fracciones que tuviesen mayor actividad específica.

- Finalmente se concentró la enzima mediante ultrafiltración en membrana de 50000 MWCO de diámetro de corte hasta obtener una concentración
- 5 aproximada de 0,2 UE/ μ l.

Para su conservación, se añadió como agente solvofóbico 15% de glicerol y detergente 1% de n-Octyl- β -D-tioglucoído, un agente crioprotector 10% de Ficoll y estabilizantes a base de cationes divalentes y/o sustratos naturales de la enzima.

- 10 *Abreviaturas:*

DNAse: deoxiribonucleasa

OD₆₀₀: densidad óptica a 600 nm.

r.p.m.: revoluciones por minuto

DCPIP: diclorofenol indofenol

- 15 PMS: metosulfato de fenazina

MWCO: peso molecular de corte

FPLC: cromatografía líquida para proteínas

Aplicación

- La enzima así obtenida se ha ensayado en el desarrollo de un biosensor electro-
- 20 bio-electrocatalítico de segunda generación en vinos y mostos de uva en modo amperométrico y los resultados han sido satisfactorios.

REIVINDICACIONES

- 1.- Proceso de purificación y estabilización de la enzima Gluconato Deshidrogenasa (GADH, EC 1.1.99.3) recombinante o no, en la que la purificación de GADH se realiza a partir de células de *Serratia marcescens*,
5 *Kleibsellia pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Gluconobacter oxydans*, *Gluconobacter industrius* o *Escherichia coli* o mezcla de ellas, y en el que la rotura celular se produce mediante sonicación u otro tipo de rotura física, procediéndose a obtener sus membranas, caracterizado porque:
- a) las membranas se resuspenden por extrusión y
- 10 b) se realiza la solubilización de la enzima GADH de la membrana mediante la adicción de detergentes como n-Octyl- β -D-tioglucoído, Zwittergent 3-12, Twenn 80, Brij 58 o Triton X-100 en porcentajes v/v entre el 0,1% y el 3 %, se ultracentrifuga la suspensión y se recoge el sobrenadante,
- c) se somete al sobrenadante a una cromatografía de intercambio iónico a un pH
15 entre 4 y 8,5.
- 2.- Proceso de purificación y estabilización de la enzima Gluconato Deshidrogenasa (GADH, EC 1.1.99.3) recombinante o no, según reivindicación 1, caracterizado porque a la enzima GADH así purificada se le añade ácido glucónico a una concentración entre 5 y 20 mM.
- 20 3.- Proceso de purificación y estabilización de la enzima Gluconato Deshidrogenasa (GADH, EC 1.1.99.3) recombinante o no, según reivindicación 2, caracterizado porque a la enzima GADH así purificada se le añade una concentración v/v de glicerol entre el 10 y el 50%.
- 4.- Proceso de purificación y estabilización de la enzima Gluconato
25 Deshidrogenasa (GADH, EC 1.1.99.3) recombinante o no, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque a la enzima GADH así purificada se le añade detergentes como n-Octyl- β -D-tioglucoído, Zwittergent 3-12, Twenn 80, Brij 58 o Triton X-100 a una concentración v/v entre el 0.05 y 2%.

5.- Proceso de purificación y estabilización de la enzima Gluconato Deshidrogenasa (GADH, EC 1.1.99.3) recombinante o no, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque a la enzima GADH así purificada se le añade un catión divalente que puede ser $MgCl_2$, $CaCl_2$ o $BaCl_2$ a una
5 concentración entre 1 y 10 mM

6.- Proceso de purificación y estabilización de la enzima Gluconato Deshidrogenasa (GADH, EC 1.1.99.3) recombinante o no, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque a la enzima GADH así purificada se le añade uno o varios de los siguientes hidratos de carbono en una
10 concentración v/v entre el 1 y el 20%; trehalosa, malitol, manitol, sorbitol, dextran y Ficoll™.

7.- Enzima Gluconato Deshidrogenasa (GADH, EC 1.1.99.3) recombinante o no, obtenida de acuerdo con el proceso de las anteriores reivindicaciones.

8.- Uso de la enzima Gluconato Deshidrogenasa (GADH, EC 1.1.99.3)
15 recombinante o no, obtenida de acuerdo con el proceso de las anteriores reivindicaciones, para medir los valores de ácido glucónico en muestras alimentarias.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031819

②② Fecha de presentación de la solicitud: 10.12.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	S.CAMPUZANO et al. "Integrated Electrochemical gluconic acid biosensor based on self-assembled monolayer-modified gold electrodes. Application to the analysis of gluconic acid in musts and wine" JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, vol. 55, 2007, páginas 2109-2114. Página 2110, columna izquierda.	1-8
A	K. MATSUSHITA et al. "Membrane-bound D-Gluconate Dehydrogenase from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Purification and structure of cytochrome-binding form". J. BIOCHEM, vol 85, 1979, páginas 1173-1181. Páginas 1174-1176.	1-8
A	K. MATSUSHITA et al. "D-Gluconate Dehydrogenase from bacteria, 2-keto-D-gluconate- yielding, membrane-bound". METHODS ENZYMOL, vol 89, 1982, páginas 187-193. Páginas 188-191.	1-8
A	K.MATSUSHITA et al. "D-Glucose Dehydrogenase from <i>Pseudomonas fluorescens</i> , membrane-bound" METHODS ENZYMOL, vol 89, 1982, páginas 149-154. Páginas 150-151.	1-8

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
11.09.2012

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N9/02 (2006.01)**C12N9/04** (2006.01)**C12H1/15** (2006.01)

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

C12N, C12H

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, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 11.09.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-8	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-8	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	S.CAMPUZANO et al. "Integrated Electrochemical gluconic acid biosensor based on self-assembled monolayer-modified gold electrodes. Application to the analysis of gluconic acid in musts and wine" JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, vol. 55, 2007, páginas 2109-2114. Página 2110, columna izquierda.	
D02	K. MATSUSHITA et al. "Membrane-bound D-Gluconate Dehydrogenase from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Purification and structure of cytochrome-binding form". J. BIOCHEM, vol 85, 1979, páginas 1173-1181. Páginas 1174-1176.	
D03	K. MATSUSHITA et al. "D-Gluconate Dehydrogenase from bacteria, 2-keto-D-gluconate- yielding, membrane-bound". METHODS ENZYMOL, vol 89, 1982, páginas 187-193. Páginas 188-191.	
D04	K.MATSUSHITA et al. "D-Glucose Dehydrogenase from <i>Pseudomonas fluorescens</i> , membrane-bound" METHODS ENZYMOL, vol 89, 1982, páginas 149-154. Páginas 150-151.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente, tal y como ha sido presentada, hace referencia a un proceso de purificación y estabilización de la enzima Gluconato Deshidrogenasa (GADH EC 1.1.99.3), recombinante o no, en la que la purificación de GADH se realiza a partir de células de *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Gluconobacter oxydans*, entre otras, y en la que la rotura celular se produce mediante sonicación u otro tipo de rotura física para obtener las membranas, y dichas membranas se resuspenden por extrusión; se realiza la solubilización de la enzima GADH de la membrana mediante la adición de detergentes, se ultracentrifuga la suspensión y se recoge el sobrenadante, y éste último se somete a una cromatografía de intercambio iónico (reivindicación 1). A la enzima GADH así purificada se le añade ácido glucónico (reivindicación 2), glicereol (reivindicación 3), detergentes (reivindicación 4), un catión divalente (reivindicación 5), e hidratos de carbono (reivindicación 6). Se reivindica, también, la enzima Gluconato Deshidrogenasa obtenida por dicho proceso (reivindicación 7), y el uso de Gluconato deshidrogenasa EC. 1.1.99.3 para medir los valores de ácido glucónico en muestras alimentarias (reivindicación 8).

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA LP, ARTS. 6 Y 8

El documento D01 hace referencia a un biosensor para detectar ácido glucónico en muestras de vino y mosto (véase resumen). Se trata de un biosensor amperométrico en el que tetratíafulvaleno (TTF) y gluconato deshidrogenasa, se encuentran co-inmovilizados cubriendo la superficie del electrodo con una membrana de diálisis. La enzima gluconato deshidrogenasa procede de *Pseudomonas sp.*, concretamente, EC.1.1.99.3 (véase página 2110, columna izquierda).

El documento D02 se refiere a una enzima D-gluconato deshidrogenasa (EC 1.1.99.3) solubilizada a partir de la membrana de *Pseudomonas aeruginosa* y purificada hasta un estado homogéneo con ayuda de detergentes (tales como Triton X-100) (véase resumen). Dicha gluconato deshidrogenasa se ha encontrado en bacterias tales como *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Serratia* etc (véase página 1173), y en dicho documento la solubilización y purificación de la enzima D-gluconato deshidrogenasa se ha llevado a cabo a partir de *P. Aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens* (véase página 1174, columna izquierda, segundo párrafo). En el proceso de purificación se cultivan las células, se someten a centrifugación, se utilizan sistemas de tampón a base de fosfato potásico, detergente Triton X-100, DNasa, etc y se llevan a cabo diferentes centrifugaciones para separar sobrenadantes y precipitados, y se somete a electroforesis (véase páginas 1174-1176).

El documento D03 trata sobre D-gluconato deshidrogenasa (EC 1.1.99.3) procedente de bacterias tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*. La purificación de D-gluconato deshidrogenasa se llevó a cabo a partir de las cepas anteriores y solubilizando dicha enzima de la membrana de *P. Aeruginosa* y *P. Fluorescens* con desoxicolato al 0,2%, - colato al 0,5% y colato al 1% respectivamente, y después, se purificó adicionalmente a través de una fracción de sulfato amónico y cromatografía en columna en presencia de Triton X-100. Por otro lado, la enzima procedente de *K. Pneumoniae* y *S. marcescens* se solubilizó con Triton X-100 al 2% y se purificó por cromatografía en columna en presencia de Triton X-100 (véase páginas 188-191).

El documento D04 describe la purificación de D-glucosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.a) a partir de *Pseudomonas fluorescens*. Los microorganismos se crecieron en un medio sintético. Para el procedimiento de purificación se utilizó tampón de fosfato potásico (pH 6,0) que contenía $MgCl_2$ 5mM. Las células se cultivaron y se almacenaron a $-20^{\circ}C$, se suspendieron en un tampón y se añadió DNasa obteniéndose por centrifugación la fracción de la membrana a la que se añadió KCl y Triton X-100 obteniéndose D-glucosa deshidrogenasa, después de una serie de centrifugaciones (véase páginas 150-151).

Por lo tanto, a la vista de los documentos citados del estado de la técnica, dicha solicitud de patente posee novedad y actividad inventiva para las reivindicaciones 1-8, ya que no se ha encontrado el procedimiento de purificación y estabilización de la enzima Gluconato deshidrogenasa (EC.1.1.99.3) recombinante o no recogido en las reivindicaciones 1-6, ni tampoco se ha encontrado dicha enzima de acuerdo con el procedimiento de purificación descrito (reivindicación 7), ni el uso de la citada enzima obtenida por dicho proceso (reivindicación 8). Por lo que, se considera que las reivindicaciones 1-8 son nuevas y poseen actividad inventiva en el sentido de los artículos 6 y 8 de la LP.