

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 844**

21 Número de solicitud: 201030515

51 Int. Cl.:
C12N 11/14 (2006.01)
B01J 32/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **09.04.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **20.03.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
20.03.2012

71 Solicitante/s:
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC)
SERRANO 117
28006 MADRID, ES**

72 Inventor/es:
**DÍAZ CARRETERO, ISABEL y
BLANCO MARTÍN, ROSA MARÍA**

74 Agente/Representante:
Pons Ariño, Ángel

54 Título: **BIOCATALIZADORES HÍBRIDOS.**

57 Resumen:

Biocatalizadores híbridos que comprenden Organosílices Mesoporosos Periódicos (PMO) y lipasas inmovilizados sobre los mismos. Además, la presente invención se refiere al procedimiento de obtención de los mismos y al uso de dichos biocatalizadores en diferentes áreas industriales.

ES 2 376 844 A1

DESCRIPCIÓN

BIOCATALIZADORES HÍBRIDOS

La presente invención se refiere a nuevos biocatalizadores híbridos que comprenden materiales Organosílices Mesoporosas Periódicas (PMO) y
5 enzimas inmovilizados sobre los mismos y al procedimiento de obtención de los mismos. Dichos biocatalizadores son muy estables en disolventes orgánicos o medios de reacción orgánicos.

Además la presente invención se refiere al uso de dichos biocatalizadores en
10 diferentes áreas industriales.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las lipasas son una familia de enzimas con actividad acil hidrolasa, que poseen
15 un dominio hidrofóbico en su superficie, mediante el cual se regula el acceso de sustratos al centro activo. La inmovilización de lipasas por interacciones hidrofóbicas se lleva a cabo a través de este dominio, sobre soportes de superficie hidrofóbica. Esta inmovilización de carácter no covalente no supone modificación química para la lipasa que podría resultar en una pérdida de
20 actividad.

Los soportes que se suelen utilizar más frecuentemente son de diferente naturaleza (polímeros orgánicos hidrofóbicos, polímeros naturales hidrofílicos funcionalizados con grupos hidrofóbicos, o materiales inorgánicos como sílice o
25 vidrio poroso funcionalizado con grupos hidrofóbicos). En general se utilizan materiales meso/macroporosos de estructura amorfa, en los que el contacto entre la lipasa y la pared del soporte está limitado a una pequeña parte de la superficie enzimática.

30 Los Materiales Mesoporosos Ordenados (en adelante MMO), de naturaleza silíceo, tienen diámetros de poro entre 2 y 50 nm y ofrecen una estructura interna regular y una excelente interconexión entre el entramado poroso que

facilita la difusión de sustratos y productos. La inmovilización de lipasas sobre MMO requiere la funcionalización de la superficie de la sílice con grupos hidrofóbicos. La obtención de MMO funcionalizados por co-condensación o por anclaje da lugar a superficies sobre las que van enganchados los grupos hidrofóbicos, lo que reduce el diámetro de poro. Dado que estos materiales tienen de por sí un reducido diámetro de poro, esta reducción adicional dificulta la entrada y difusión del enzima y por tanto las cargas enzimáticas que se alcanzan son demasiado bajas.

- 10 Así, el descubrimiento de las Organosílices Mesoporosas Periódicas (en adelante PMO, del inglés: Periodic Mesoporous Organosilica) [*F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell, M. Fröba, Angew. Chem. Int. Ed. 45 (2006) 3216*], un tipo de MMO en los que la parte orgánica hidrofóbica, no está anclada sobre la superficie del material silíceo, sino que forma parte de la misma pared como especie de silicio que se entrecruza formando el esqueleto del material poroso final, abre una prometedora línea de soportes para enzimas.

- Tras el primer estudio de *J. F. Díaz, K. J. Balkus Jr., J. Mol. Catal. B: Enzymatic 2 (1996) 115*, se ha tratado de inmovilizar muchos enzimas por adsorción física en MMO [*H. P. Yiu, P. A. Wright, J. Mat.Chem. 15 (2005) 3690; M. Hartmann, Chem. Mater. 17 (2005) 4577*]. En el caso particular de lipasas, aunque se han alcanzado algunos resultados prometedores, aún hay mucho por mejorar tanto en carga como en estabilidad y lixiviado. Por las dimensiones de la lipasa (generalmente alrededor de 4nm) se prevé que quepa bien en un MMO común, si bien el confinamiento no conlleva ventajas en cuanto al proceso de inmovilización en sí. En estudios previos en nuestro laboratorio hemos analizado el efecto de un leve grado de hidrofobicidad incluido como grupos metilo anclados a la sílice sobresaliendo de las paredes de los poros. Los resultados nos permitieron concluir que aunque tienen una influencia positiva marcada en la prevención de la lixiviación de la lipasa cuando se suspenden en medios acuosos, el injerto de MMO con las cadenas hidrofóbicas reduce el diámetro de los poros y puede obstaculizar la difusión del enzima. [*E. Serra, A.*

Mayoral, Y. Sakamoto, R. M. Blanco, I. Díaz, *Micropor. Mesopor. Mater.* 114 (2008) 201]. Por ejemplo, el material silíceo mesoporoso conocido como FDU-12 funcionalizado con grupos octilo precisa de altas presiones para alcanzar un confinamiento eficiente de la enzima en el interior de sus cajas mesoporosas [Y. Han, S. S. Lee, J. Y. Ying, *Chem Mater.* 18 (2006) 643]. Sin embargo, esta estrategia es difícil de generalizar pues requiere el embalaje del MMO en una columna cromatográfica. El anclaje de grupos butílicos ha resultado menos eficaz llevando a cargas incluso más bajas que las contrapartes silíceas, de nuevo probablemente debido a la reducción adicional del tamaño de poro en un material que ya tenía de por sí un diámetro muy ajustado para la lipasa [A. Galarneau, M. Mureseanu, S. Atger, G. Renard, F. Fajula, *New J. Chem* 30 (2006) 562].

Así, la conclusión inmediata, es la necesidad de diseñar soportes hidrofóbicos (al menos para la lipasa) que presenten estructuras porosas regulares con alta conectividad y volumen de poro, con dominios hidrofóbicos abundantes sin comprometer el diámetro de poro. En este sentido, el descubrimiento reciente de los PMO, con los grupos orgánicos formando parte de la sílice que condensa estructurando el material, ha proporcionado nuevas oportunidades para la inmovilización de la enzima. En la bibliografía sólo se han encontrado algunos estudios preliminares haciendo uso de PMO's como soportes de enzimas, y ninguno de ellos con lipasa. Se ha empleado un PMO basado en puentes etano como soporte de citocromo c y xilanasina sin observarse mejora en la carga ni en el lixiviado de la enzima en comparación con pura sílice SBA-15 [S. Z. Qiao, C. Z. Yu, W. Xing, Q. H. Hu, H. Djojoputro, G. Q. Lu, *Chem. Mater.* 17 (2005) 6172; S. Hudson, E. Magner, J. Cooney, B. K. Hodnett, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 19496].

También se pueden encontrar esfuerzos en fabricar paredes más hidrofóbicas para fijar lisozima empleando PMO bifuncionalizados con diversas fracciones de grupos dietilbenceno y etano [C. Li, J. Liu, X. Shi, J. Yang, Q. Yang, *J. Phys. Chem. C* 111 (2007) 10948], o mezclas de propilamina, benceno y

bifenilo [M. Park, S. S. Park, M. Selvaraj, D. Zhao, C-S. Ha, *Micropor. Mesopor. Mater.* 124 (2009)].

DESCRIPCION DE LA INVENCION

5

En la presente invención, la novedosa utilización de PMO con puentes etileno como soportes para la inmovilización de lipasa nos ha permitido alcanzar cargas enzimáticas lo suficientemente altas mientras que la eficiencia catalítica del biocatalizador resultante muestra excelentes valores, mayores que los
10 obtenidos con otros catalizadores de lipasa inmovilizada bien sobre MMO funcionalizados con grupos metilo o bien sobre sílices amorfas funcionalizadas con grupos octilo, de poro más ancho. Con respecto a estas últimas, la menor hidrofobicidad del grupo etilo frente al octilo está compensada en los PMO por el mayor grado de sustitución: así, mientras que las sílices amorfas tienen tan
15 solo un 6% de materia orgánica correspondiente a los octilo (medido por TGA), en los PMO la materia orgánica es del 18%. La alta hidrofobicidad de la pared junto con el confinamiento de la enzima en los poros reduce además la flexibilidad facilitando la formación de interacciones enzima-soporte. La intensa interacción reduce la movilidad de la proteína, y por tanto ralentiza su
20 desnaturalización. Como consecuencia, la estabilidad aumenta. Esto es especialmente interesante en medios orgánicos desnaturalizantes, como son los codisolventes solubles en agua, principalmente alcoholes y especialmente el metanol.

25 La obtención de biocatalizadores de lipasa inmovilizada más estables en presencia de metanol es por tanto clave de su utilización en procesos que han de ser llevados a cabo en estos medios como por ejemplo la obtención de biodiesel por vía enzimática, y es donde reside la importancia de la presente invención.

30

La presente invención se refiere a un nuevo tipo de biocatalizadores que consiguen solventar los problemas anteriormente enunciados y que

comprenden: materiales mesoporosos ordenados del tipo de los PMO y enzimas (lipasas) inmovilizados sobre los mismos.

Además tienen las siguientes ventajas:

5

- son muy estables en disolventes orgánicos o en medios de reacción orgánicos, frente a otros biocatalizadores que contienen lipasa inmovilizada hidrofóbicamente.

10

- poros de tamaño controlado y homogéneo.

- alto grado de hidrofobicidad sin sacrificar el diámetro ni el volumen de mesoporo.

15

- el confinamiento de la enzima en poros de tamaño controlado maximiza la superficie de contacto hidrofóbica.

- el confinamiento más la hidrofobicidad de la superficie hace aumentar la estabilidad en medio orgánico por hacerse más intensa la interacción de la lipasa.

20

- Tras un número indeterminado de ciclos de reacción, la enzima (lipasa) se puede ir desnaturalizando y queda inactiva, mientras que el soporte (PMO) sigue manteniendo sus características iniciales. Debido a que la enzima está unida al soporte mediante interacciones no covalentes, esta se puede reemplazar fácilmente y el soporte puede ser re-utilizado.

25

Por lo tanto un primer aspecto esencial de la presente invención se refiere a biocatalizadores híbridos que comprenden:

30

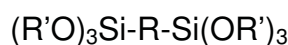
- Organosílices Mesoporosas Periódicas (PMO); y
- lipasas inmovilizadas en dichos PMO.

Según otra realización preferida, el tamaño de poro del PMO está dentro del rango, de 5 a 20 nm, preferiblemente de 5 a 15 nm, y más preferiblemente de 5 a 10 nm.

- 5 Según otra realización preferida, la lipasa se encuentra inmovilizada mediante interacciones hidrofóbicas.

- Según otra realización preferida, las lipasas están en una cantidad de al menos 5 mg por gramo del material mesoporoso, preferiblemente en una cantidad de
10 al menos 10 mg por gramo del material mesoporoso.

- Según otra realización preferida, el material mesoporoso ordenado es de tipo organosílices mesoporosas periódicas y está compuesto por unidades de organosilanos puente de fórmula general (I)
15



(I)

- donde R se selecciona entre alquil C₁-C₆, alquenil C₁-C₆ o cicloalquil C₄-C₇, y R' se selecciona entre grupos etoxido o metoxido. Preferiblemente R se
20 selecciona entre alquenil C₁-C₆ y más preferiblemente R son un grupo etileno y R' son grupos etoxido.

- Los organosilanos puente de fórmula general (I) permiten ajustar la hidrofobicidad de la pared del mesoporo simplemente variando "R".
25

- Un segundo aspecto esencial de la presente invención se refiere a un método para preparar los biocatalizadores híbridos que comprende las siguientes etapas:

- a - adición de una fuente de sílice a una mezcla del surfactante pluronic
30 P123, agua, cloruro potásico y ácido clorhídrico;
b - calentar la mezcla;
c - eliminación del surfactante;

d - preparación de una disolución tampón de la lipasa; y

e - adición de la disolución de la etapa d, sobre el material obtenido tras la etapa c;

5 Según una realización preferida, la fuente de sílice es 1,2-bis(trietoxisilil)etano.

Según otra realización preferida, la mezcla que se forma en la etapa b es un material de tipo organosílice mesoporosa periódica.

10 Según otra realización preferida la mezcla se mantiene a temperatura ambiente durante 24 horas y seguidamente durante otras 24 horas a 100°C.

Según otra realización preferida la eliminación del surfactante se lleva a cabo mediante una disolución de EtOH/HCl.

15

La inmovilización de la lipasa tiene lugar a partir de una disolución que puede contener distintas cantidades de enzima en una disolución tamponadora a pH entre 3 y 9. Se adiciona entre 5 y 15 ml, preferiblemente entre 7 y 12 ml de esta disolución previamente ensayada su actividad catalítica se añaden sobre una cantidad desde 50 a 150 mg, preferiblemente desde 75 a 120 mg de PMO. La suspensión se mantiene en agitación suave.

20

Periódicamente se ensaya la actividad catalítica de suspensión y sobrenadante hasta actividad nula o constante en el sobrenadante, que indica el final del proceso de inmovilización. Simultáneamente se realizan ensayos de la actividad catalítica de una disolución enzimática control, que asegura que la pérdida de actividad del sobrenadante no se debe a inactivación del enzima.

25

Adicionalmente tras según otra realización preferida tras la etapa e, se llevan a cabo las siguientes etapas:

30

- agitación;

- filtrado y lavado de la suspensión con la misma disolución tamponadora;
- secado suspendiendo en acetona; y
- filtrado a sequedad a vacío.

5

Un tercer aspecto esencial de la presente invención se refiere al uso de los biocatalizadores híbridos para procesos catalizados por lipasas en medios orgánicos de reacción, para reacciones de condensación destinadas a la obtención de compuestos con utilidad en la industria farmacéutica, química
10 fina, cosmética y alimentaria.

Por otro lado la elevada estabilidad que adquiere la lipasa inmovilizada sobre PMO en medios tan desnaturalizantes como el metanol proporciona la posibilidad de catalizar reacciones en condiciones que no permiten su uso con
15 otras preparaciones (comerciales o no comerciales) de lipasa inmovilizada. Por lo tanto según otra realización preferida la presente invención se refiere al uso de los biocatalizadores híbridos, para reacciones de condensación de biocombustibles que deban ser llevadas a cabo en disolventes o medios orgánicos de reacción, preferiblemente en las reacciones de condensación de
20 alcoholes con ácidos grasos para dar lugar a biodiesel.

Un ejemplo es la síntesis de biodiesel: ésteres metílicos de ácidos grasos. Este proceso se puede hacer directamente a partir de metanol y ácidos grasos, catalizado por una lipasa, pero la aplicación se ve muy limitada industrialmente
25 por la rápida inactivación del enzima en presencia de metanol.

Por este motivo la vía preferente para la obtención de este biocombustibles es la química, aunque ofrece menor sostenibilidad que la enzimática y es más contaminante ya que la metanolisis se realiza por catalizadores alcalinos. El
30 subproducto (glicerol) queda disuelto en álcalis, así como los ácidos grasos libres, que forman jabones de difícil eliminación.

La reacción con Lipasa-PMO transcurre simplemente en presencia de ácidos grasos (que pueden ser procedentes de grasas residuales) y metanol, no se requiere medio alcalino. La enzima puede catalizar ambos procesos: liberación de los ácidos grasos (esterificación del triglicérido) y metanolisis de los ácidos grasos libres. No se generan nuevos materiales de residuo.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, 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. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Difractograma de rayos X de PMO tras eliminación del surfactante.

Figura 2. Isotermas de adsorción/desorción de N₂ de PMO.

20

Figura 3. Termograma del PMO.

Figura 4. Micrografía de microscopía electrónica de barrido del PMO.

25 **Figura 5.** Resonancia Magnética Nuclear de ²⁹Si del PMO.

Figura 6. Espectros Infrarrojo del PMO antes y después de inmovilizar la Lipasa.

30 **Figura 7.** Curso de inmovilización de lipasa sobre PMO a pH 3,5, 7,0 y 9,0.

Figura 8. Incubación en mezcla metanol-agua al 50% (v/v) de lipasa soluble e inmovilizada sobre PMO y sobre sílice amorfa-octilo.

Figura 9. Incubación en 100% metanol de lipasa soluble e inmovilizada sobre PMO y sobre sílice amorfa-octilo.

Figura 10. Incubación a 55°C en medio acuoso (fosfato 0,1M pH 7,0) de lipasa soluble e inmovilizada sobre PMO y sobre sílice amorfa-octilo.

10 EJEMPLOS

A continuación se describen algunos ejemplos de aplicación del procedimiento descrito que se proporcionan a modo de ilustración y no tienen el propósito de limitar la presente invención.

15

Ejemplo 1: Caracterización del soporte (PMO):

a) Difracción de Rayos X

Se realizó en un difractómetro Seifert XRD 3000P operando a bajo ángulo (figura 1).

20

Los tres picos observados en el difractograma corresponden a los índices de Miller 100, 110 y 200. Por las leyes de la cristalografía estos índices corresponden a una estructura hexagonal plana $pm\bar{6}m$. El parámetro de red calculado es de 11,6 nm. Se confirma por lo tanto que el soporte presenta una estructura ordenada hexagonal plana en la que los canales unidireccionales se empaquetan formando una estructura hexagonal.

25

b) Isotermas de adsorción/desorción de nitrógeno.

Se llevaron a cabo a -196°C en un Micromeritics TriStar3000. Las áreas superficiales específicas se dedujeron usando el método BET y la distribución

30

de tamaño de poro aplicando el protocolo BJH a la rama de adsorción de la isoterma.

5 La isoterma presentada en la figura 2 es típica de un material mesoporoso (Tipo IV) con una distribución estrecha de diámetro de poro, con un valor de 7,5 nm. El área superficial específica es de 960 m²/g, y el volumen de poro de 1,18 cm³/g.

c) Análisis termogravimétrico:

10 Se registró en un equipo Perkin-Elmer TGA7, con un barrido de temperatura de 20-900°C a una velocidad de calentamiento de 20°C/min (figura 3).

15 El análisis termogravimétrico revela una pérdida de peso del 18% que corresponde a los grupos etileno que forman las paredes del soporte. Por la derivada se puede observar que la descomposición de estos grupos ocurre a temperaturas elevadas (400°C) lo cual indica el amplio rango de estabilidad térmica del PMO. Además, la ausencia de pico a 200°C indica que se ha eliminado el surfactante (Pluronic) con éxito.

20 **d) Microscopía electrónica de barrido:**

Las micrografías se obtuvieron con un JEOL JSM 6400 Philips XL30 operando a 20 kV (figura 4).

25 Las micrografías obtenidas muestran una clara estructura fibrilar, constituida por largos hilos que a su vez se agregan en fibras. Son partículas alargadas de alrededor de 1 micra de largo un unas 5 micras de ancho, conectadas entre sí a lo largo formando fibras de unas 70 micras. El interior de cada fibra está a su vez formado por canales unidireccionales en empaquetamiento hexagonal, según se demostró por difracción de rayos X.

30

e) Resonancia magnética nuclear de ^{29}Si :

Se realizó en un espectrómetro Bruker AV400 usando $\pi/3$ de pulsos de 4 μs a intervalos de 240 s. Las muestras fueron giradas al ángulo mágico a 5kHz (figura 5).

5

El espectro de resonancia magnética nuclear de silicio permite identificar y cuantificar las especies de silicio que forman la red del soporte. Como era de esperar el 100% de los átomos de Si están unidos a un átomo de C ($\equiv\text{Si}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Si}\equiv$). Si bien, la red de $\text{Si}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Si}$ no está totalmente conectada como muestra la intensa señal correspondiente a especies T^2 , es decir, especies -
 (SiO) $_2\text{R}'\text{OSi}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SiOR}'(\text{OSi})_2^-$, por lo tanto, se espera un alto grado de grupos etoxi restantes en la estructura que puede incrementar el carácter hidrofóbico de la muestra.

10

f) Espectroscopía IR:

15

Los espectros fueron registrados con espectrómetro ABB MB3000 con un accesorio de ATR de Pike MIRacle con cristal de diamante sobre ZnSe.

20

En la figura 6 se recogen los espectros de IR del soporte PMO (abajo) y del biocatalizador híbrido Lipasa-PMO (arriba). Las bandas más intensas corresponden a las vibraciones de grupos Si-O-Si a 1090 (hombro), 1020, 910, 765 y 692 cm^{-1} presentes en el esqueleto. Por otra parte, en el espectro del PMO se pueden distinguir las bandas de vibración de grupos $\text{Si}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Si}$ a 1413, 1270 y 1157 cm^{-1} . Por último se observan una banda de agua adsorbida a 1640 cm^{-1} . Tras el proceso de inmovilización se observan bandas adicionales a 1543, 1063 (hombro) y 874 cm^{-1} (hombro) correspondientes a la lipasa.

25

Ejemplo 2: Ensayo de actividad catalítica de rutina durante la inmovilización: hidrólisis de p-nitrofenil acetato 0,4 mM disuelto en fosfato 50 mM pH 7,0. (Figura 7)

30

Ensayo espectrofotométrico, que mide a 348 nm el aumento de absorbancia por minuto debido a la liberación de p-nitrofenol debida a la acción de la lipasa sobre el sustrato, a 25°C y pH 7,0. Sobre las cubetas conteniendo 1,9 ml de esta disolución se añaden 50 microlitros de la disolución o suspensión de lipasa. El coeficiente de extinción molar del p-nitrofenol en estas condiciones es de 5150 M⁻¹cm⁻¹.

El punto isoelectrico de la lipasa de Candida Antarctica es 6. El hecho de que a un pH superior (pH 7,0) se alcancen rendimientos de inmovilización análogos a los obtenidos a pH 3,5 indica que no sólo son las interacciones electrostáticas las que dirigen la unión, sino que ésta se produce principalmente a través de interacciones hidrofóbicas.

Los datos obtenidos por espectroscopía IR indican la presencia del enzima en el interior de los poros por lo que se puede descartar que la inmovilización haya tenido lugar principalmente sobre la superficie externa de las partículas de PMO.

Actividad y Eficiencia catalítica

20

Material	Actividad catalítica (U/g cat)	Eficiencia catalítica(U/mg enz)
Oct-AS (a)	37000	80
Me-SBA-15 (b)	2009	88
PMO	18280	202

Tabla 1.- Actividad y eficiencia catalítica de lipasa inmovilizada sobre PMO y otros soportes hidrofóbicos

25 *Actividad expresada en unidades de tributirina*

Catalizadores a y b descritos anteriormente:

(a) R.M. Blanco, P. Terreros, N. Muñoz, E. Serra, J. Mol. Catal. B: Enzym. 47 (2007) 13.

(a) R. M. Blanco, P. Terreros, M. Fernández-Pérez, C. Otero, G. Díaz-González, *J Mol Catal B: Enzym.* 30 (2004) 8.

(b) E. Serra, A. Mayoral, Y. Sakamoto, R. M. Blanco, I. Díaz, *Micropor. Mesopor. Mater.* 114 (2008) 201.

5

Ensayo de actividad de tributirina:

Se sigue la hidrólisis de tributirina para liberar ácido butírico en un pHstato a pH 7,0. La velocidad de adición de NaOH 0,1 N para mantener el pH constante da la velocidad de reacción y por tanto la actividad de la enzima. Sobre 48,5 ml de tampón fosfato potásico 10 mM pH 7 y 1,47 ml de tributirina en agitación se añade el catalizador. Una unidad de actividad corresponde a los micromoles de tributirina transformados por minuto.

La eficiencia catalítica es la relación entre la actividad catalítica y la carga de enzima, refleja la actividad por miligramo de enzima inmovilizado. Por tanto es un parámetro muy útil para comparar distintos biocatalizadores con distintas cargas enzimáticas de la misma enzima. En la tabla se muestra el dato del PMO en comparación con los datos recogidos para lipasa inmovilizada en otros soportes: sílice amorfa activada con grupos octilo y mayor tamaño de poro (Oct-AS) y un MMO funcionalizado con grupos metilo anclados sobre la superficie (Me-SBA-15).

La eficiencia catalítica del catalizador de PMO es mucho mayor a la de los otros soportes. En comparación con la sílice amorfa octilada, el resultado obtenido con PMO debe estar relacionado con el alto ordenamiento de la estructura interna del PMO, responsable de una buena conectividad entre los poros. Sin embargo, comparando con los resultados sobre Me-SBA-15, con el mismo ordenamiento y confinamiento poroso pero menor hidrofobicidad, se ve la importancia de la hidrofobicidad de la superficie. El hecho de que el contacto con grupos octilo de lugar a catalizadores con menor eficiencia catalítica podría indicar una excesiva interacción con un área localizada del enzima que condujera a un cambio conformacional que pudiera suponer pérdida de

actividad. Por tanto el PMO es un soporte que reúne a la vez las características de grado de hidrofobicidad adecuado y una estructura ordenada con buena conectividad.

5 **Ejemplo 3: Estabilidad en medio orgánico del biocatalizador lipasa-PMO**

Estabilidad en metanol

Se incubaron viales herméticamente sellados con las siguientes
10 concentraciones:

- 6 mg de catalizador PMO+Lipasa/ml de metanol.
- 6 mg de catalizador PMO+Lipasa/ml de mezcla metanol-agua al 50%.
- 3 mg de catalizador SAOct+Lipasa/ml de metanol (Figura 9)
- 3 mg de catalizador SAOct+Lipasa/ml de mezcla metanol-agua al 50%.
15 (figura 8)
- $2,5 \cdot 10^{-3}$ mg de lipasa soluble /ml de metanol.
- $2,5 \cdot 10^{-3}$ mg de lipasa soluble /ml de mezcla metanol-agua al 50%.

Los viales se mantuvieron en un agitador de rodillos a temperatura ambiente
20 para que la mezcla fuera homogénea.

Hasta las 3 horas de incubación en 50% metanol se observa que es más estable la lipasa inmovilizada sobre PMO, perdiendo sólo un 5% de actividad. En 100% de metanol la lipasa soportada sobre PMO es el más estable a corto
25 plazo, manteniendo después de 1 hora en el medio el 75% de actividad mientras que los otros dos catalizadores en este tiempo ya sólo tenían en 30% aproximadamente. En incubación prolongada las actividades caen notablemente en los tres casos, ya que este medio es altamente desnaturalizante.

30

La estabilización que se obtiene en PMO es superior a la del catalizador donde la lipasa se inmoviliza sobre un soporte silíceo funcionalizado con grupos más

hidrofóbicos (octilo) y con mayor diámetro medio de poro (estructura amorfa). En principio la interacción hidrofóbica debe tener lugar no a través de un único punto sino que, al haber sobre la lipasa una zona hidrofóbica, la interacción sobre el soporte debe tener lugar a través de varios aminoácidos.

5 Esto hace más rígida la estructura proteica y la protege frente a los cambios conformacionales inducidos por la presencia del disolvente. De hecho, la inmovilización de la lipasa de C Antartica sobre sílice amorfa-octilo ya se ha descrito que confiere gran estabilización en medio orgánico.

10 Es conocido que en presencia de disolventes orgánicos tienen lugar cambios en la orientación de los aminoácidos en las proteínas, de manera que algunos residuos hidrofóbicos que se encuentran en medio acuoso plegados hacia el interior de la estructura terciaria, sufren una reorientación para exponerse hacia el exterior de la misma, donde se encuentra el disolvente. Este efecto es
15 especialmente acusado en presencia de codisolventes orgánicos como el metanol con capacidad para interferir con los enlaces de hidrógeno de la proteína y para formar otros nuevos.

Cuando la inmovilización por varios puntos tiene lugar sobre la superficie de un
20 soporte de tipo plano, la superficie de contacto entre ambos es muy limitada. Esto ocurre cuando, como en el caso de la sílice amorfa, el diámetro de poro del soporte es muy superior al del enzima.

Cuando la lipasa se encuentra confinada en el interior de los poros hidrofóbicos
25 de PMO, al ser mayor la superficie de contacto hay más probabilidades de que se establezca un mayor número de uniones. Además, los aminoácidos de cadena hidrofóbica reorientados hacia la superficie de la proteína pueden a su vez interaccionar con la superficie interna de los poros. Debido al confinamiento, estas interacciones adicionales pueden tener lugar a lo largo de
30 casi toda la superficie exterior de la lipasa. De manera que la intensidad de la interacción hidrofóbica lipasa-PMO puede aumentar considerablemente en presencia de un medio orgánico. La consecuencia de esta mayor interacción es

una mayor rigidez de la estructura terciaria de la proteína y por tanto un aumento en la estabilidad del enzima.

5 Si esto es así, entonces este método de inmovilización no resultaría tan eficaz para aumentar la estabilidad de la lipasa en medio acuoso. Se comprobó este aspecto incubando en disolución acuosa tamponada a pH 7 y 55°C lipasa soluble e inmovilizada sobre sílice octil-amorfa y sobre PMO. Los viales se mantuvieron en un baño con agitación a 55°C.

10 Como se observa en la figura 10, la tendencia en medio acuoso es la contraria a la encontrada en medio orgánico, siendo la lipasa inmovilizada sobre PMO incluso menos estable que el enzima soluble.

15 En el desplegamiento de la proteína en medio acuoso los grupos apolares siguen hacia dentro, por lo que no hay posibilidad de una interacción adicional con el soporte como ocurre en medio orgánico. Sin embargo la baja estabilidad parece indicar que puede haber incluso un efecto de repulsión por los mismos grupos polares de la superficie que al intentar desplegarse se aproximarían a la superficie hidrofóbica del PMO. Esta repulsión podría ser la causante de algún
20 cambio conformacional que inactive el enzima y corrobora la hipótesis expuesta acerca de la estabilización en medio orgánico.

Debido a que estos nuevos tipos de biocatalizadores presentan estabilidad frente a metanol, este mismo ejemplo podría ser trasladado al uso de este tipo
25 de biocatalizadores en la obtención de biodiesel a través de reacciones de trans-esterificación en las cuales es necesaria la presencia de este tipo de disolventes orgánicos.

REIVINDICACIONES

1. Biocatalizadores híbridos que comprenden un soporte de organosílices mesoporosos periódicos y lipasas en una cantidad de al menos 5 mg por gramo del material mesoporoso.
 2. Biocatalizadores híbridos según la reivindicación 1, donde las lipasas están en una cantidad de entre 5 y 100 mg por gramo de material mesoporoso
 3. Biocatalizadores híbridos según las reivindicaciones 1 y 2, donde las lipasas están en una cantidad de 50 mg por gramo del material mesoporoso.
 4. Biocatalizadores híbridos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el material mesoporoso tiene un tamaño de poro de 5 a 20 nm, preferiblemente de 5 a 15 nm, y más preferiblemente de 5 a 10 nm.
 5. Biocatalizadores híbridos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde el material mesoporoso ordenado está compuesto por unidades de organosilanos puente de fórmula general (I)
- $$(R'O)_3Si-R-Si(OR')_3$$
- (I)**
- donde R se selecciona entre alquil C₁-C₆, alquenil C₁-C₆ o cicloalquil C₄-C₇, y R' se selecciona entre grupos etóxido o metóxido.
- 6. Biocatalizadores híbridos según de la reivindicación 5, donde R se seleccionan entre alquenil C₁-C₆, preferiblemente un grupo etileno.
- 7. Biocatalizadores híbridos según la reivindicación 5, donde R' es un grupo etóxido.

8. Método para preparar los biocatalizadores híbridos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende las siguientes etapas:
 - a. adición de una fuente de sílice a una mezcla del surfactante pluronic P123, agua, cloruro potásico y ácido clorhídrico;
 - 5 b. eliminación del surfactante; y
 - c. adición de una disolución tampón de una lipasa sobre el material obtenido tras la etapa b
9. Método según la reivindicación 8, donde la fuente de sílice es 1,2-bis(trietoxisilil)etano.
10
10. Método según la reivindicación 8, donde la mezcla que se forma en la etapa a es un material de tipo organosílice mesoporosa periódica.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde la mezcla
15 procedente de la etapa a) se mantiene a temperatura ambiente durante 24 horas.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, donde tras la etapa
20 a), se calienta la mezcla durante un período de tiempo de entre 12 a 36 horas, preferiblemente durante 24, a una intervalo de temperatura de entre 50 a 200°C, preferiblemente de entre 75 y 150°C y más preferiblemente a 100°C.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, donde la
25 eliminación del surfactante se lleva a cabo mediante extracción con una disolución de EtOH/HCl.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, donde la
30 disolución tampón está a un pH entre 3 y 9.

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14, donde se adiciona entre 5 y 15 ml de la disolución tampón, preferiblemente entre 7 y 12 ml.
16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15, donde el material
5 obtenido tras la etapa c, está en una cantidad desde 50 a 150 mg, preferiblemente desde 75 a 120 mg.
17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 16, donde tras la etapa e, además se llevan a cabo las siguientes etapas:
10 - agitación;
 - filtrado y lavado de la suspensión con la disolución tamponadora de la etapa c;
 - secado suspendiendo en acetona; y
 - filtrado a sequedad a vacío.
15
18. Uso de los biocatalizadores híbridos de las reivindicaciones 1 a 7, para procesos catalizados por lipasas en medios orgánicos de reacción, para reacciones de condensación destinadas a la obtención de compuestos con utilidad en la industria farmacéutica, química fina, cosmética y alimentaria.
20
19. Uso de los biocatalizadores híbridos de las reivindicaciones 1 a 7, para reacciones de condensación de biocombustibles que son llevadas a cabo en disolventes o medios orgánicos de reacción.
- 25 20. Uso de los biocatalizadores híbridos según la reivindicación 19, en las reacciones de condensación de alcoholes con ácidos grasos para dar lugar a biodiesel.

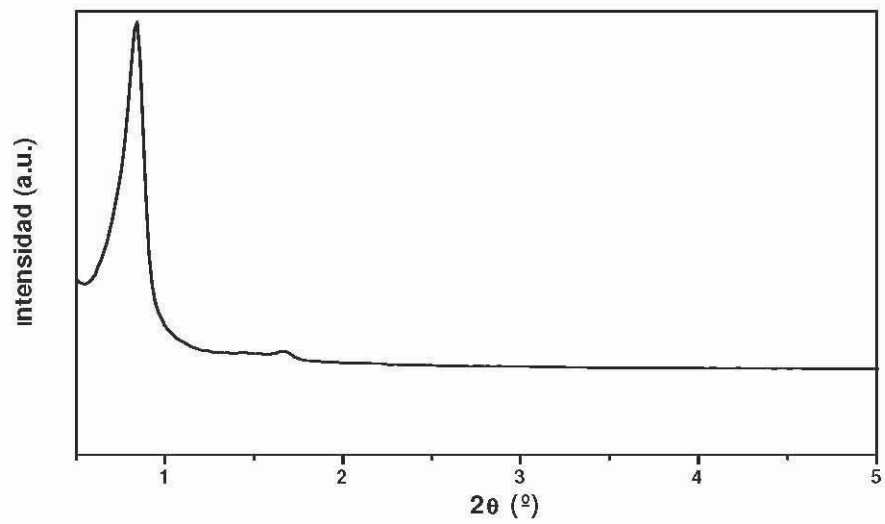


FIG. 1

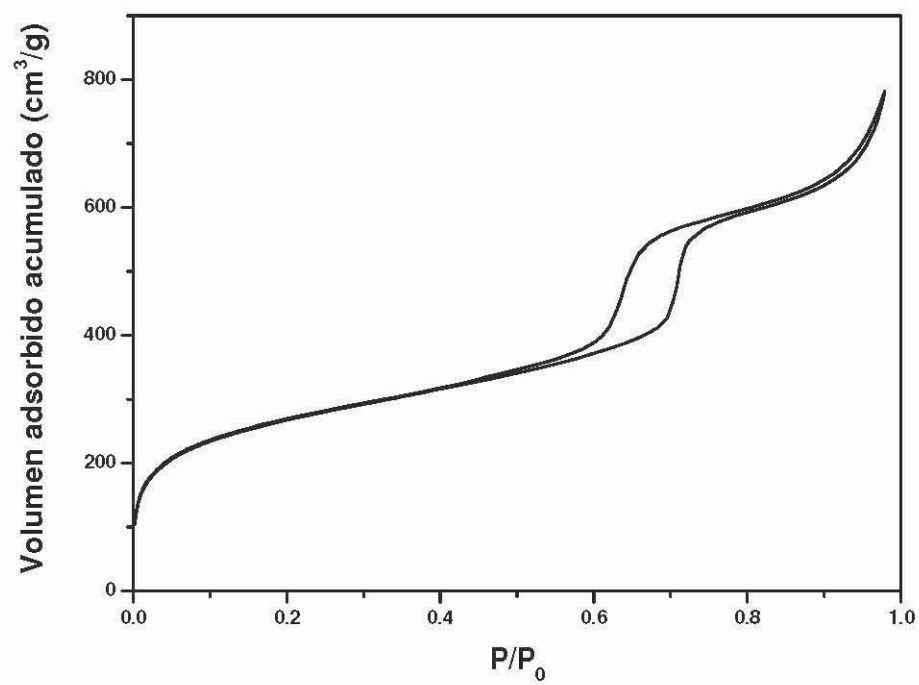


FIG. 2

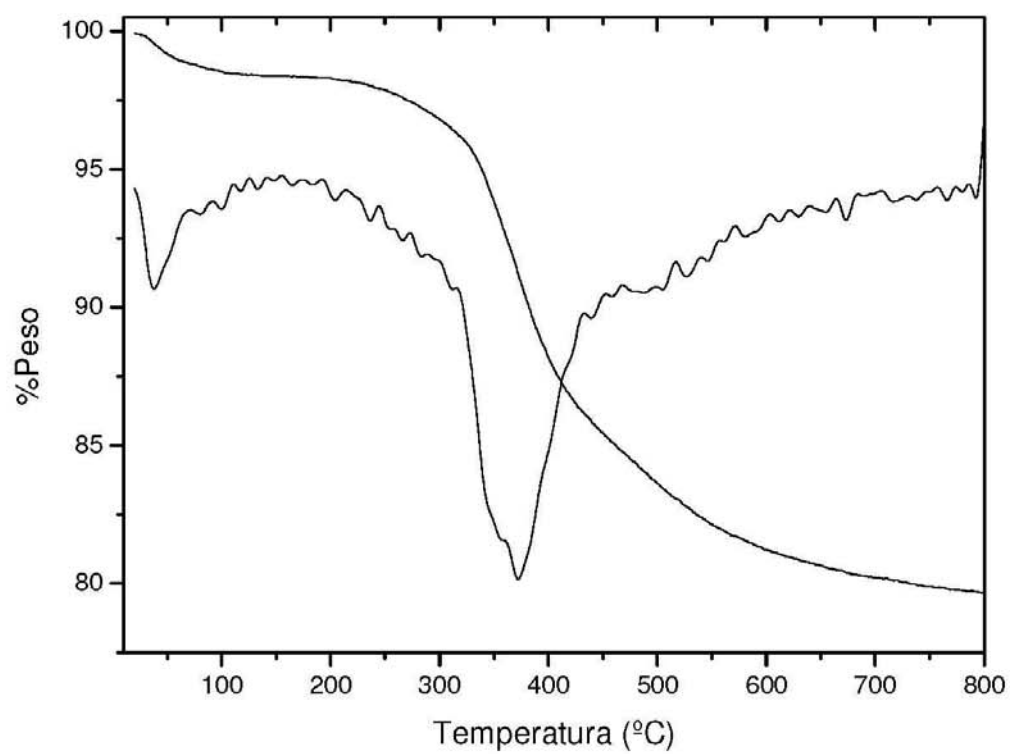


FIG. 3

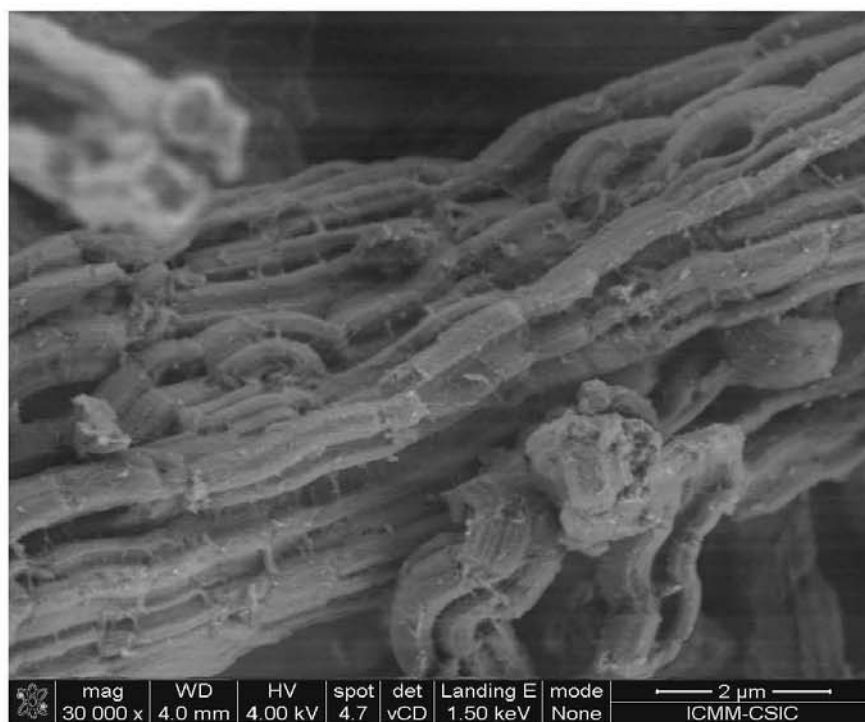


FIG. 4

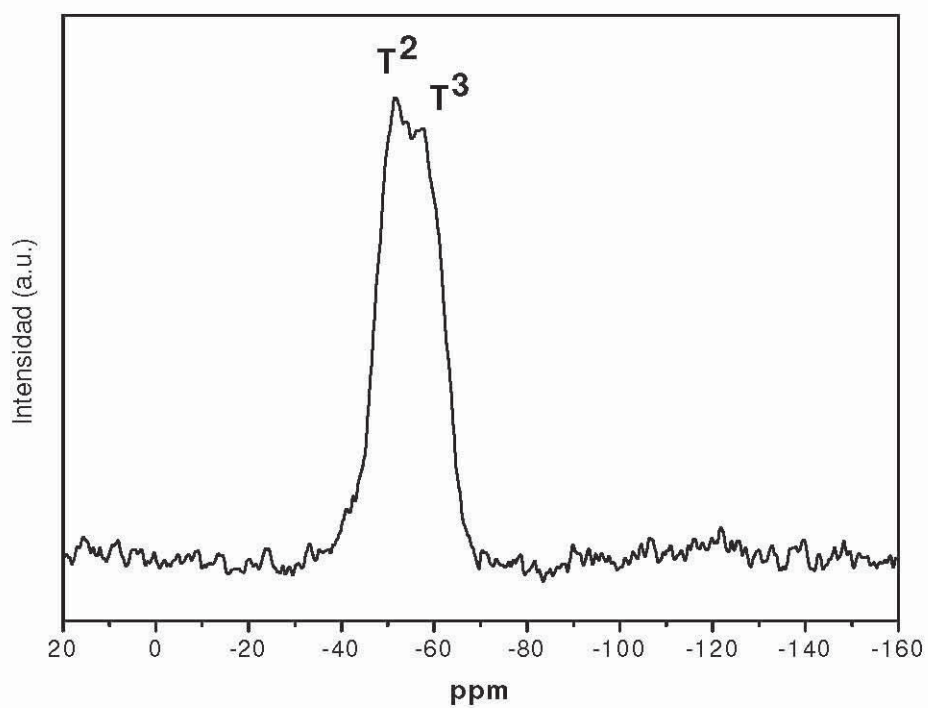


FIG. 5

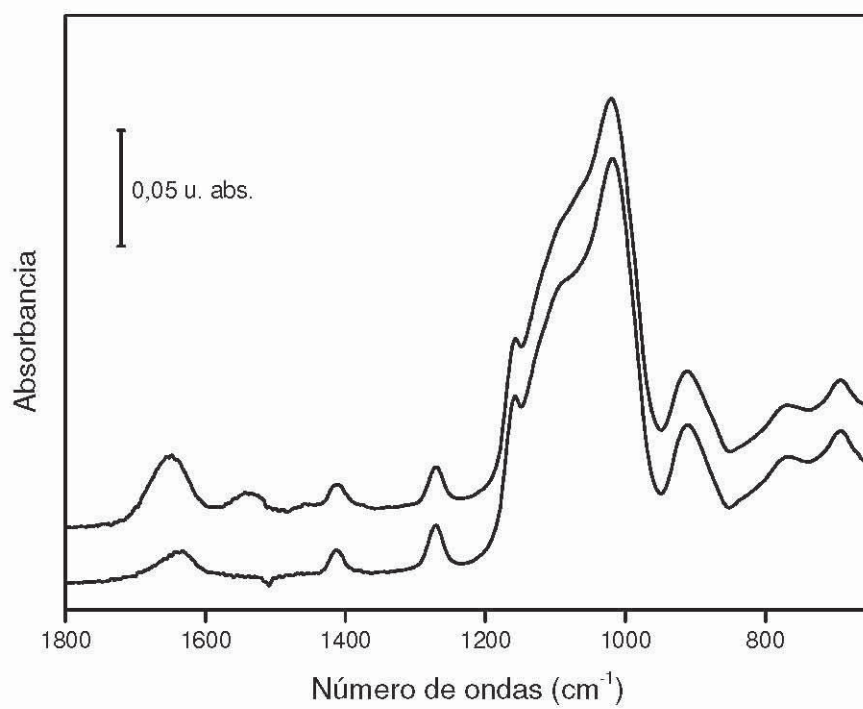


FIG. 6

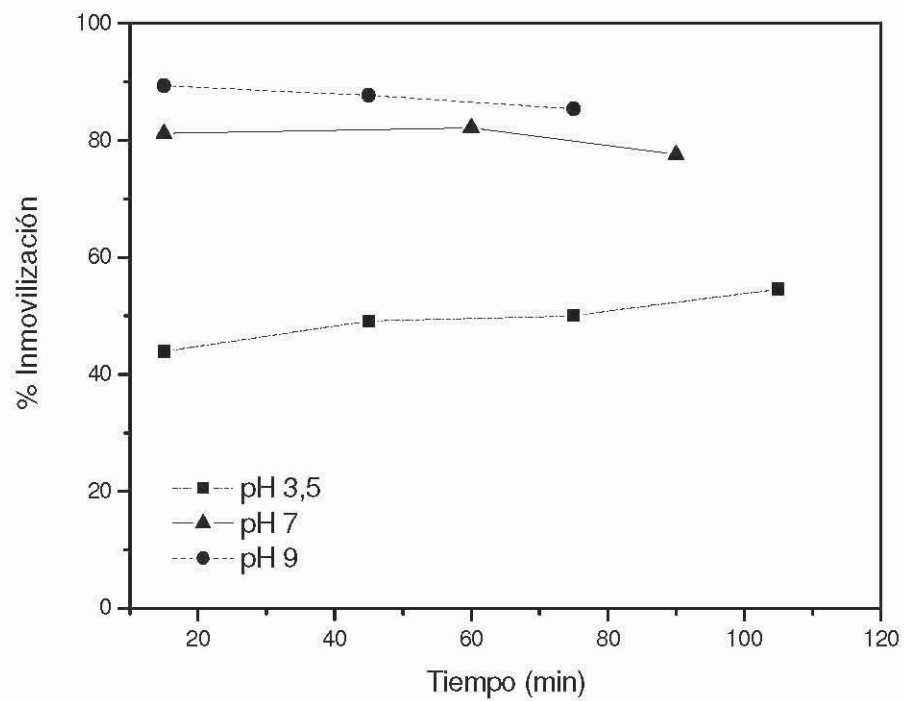


Fig 7

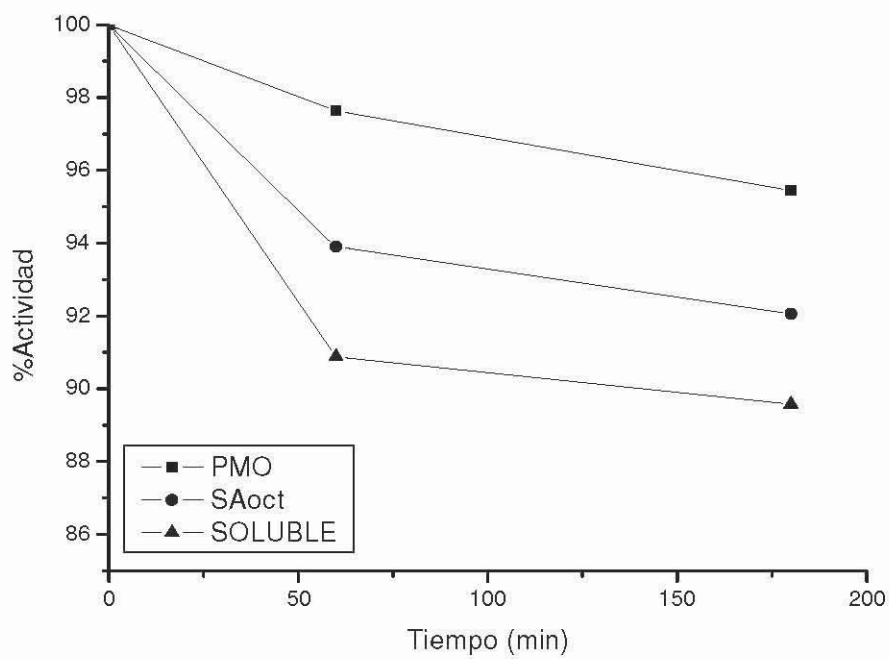


FIG. 8

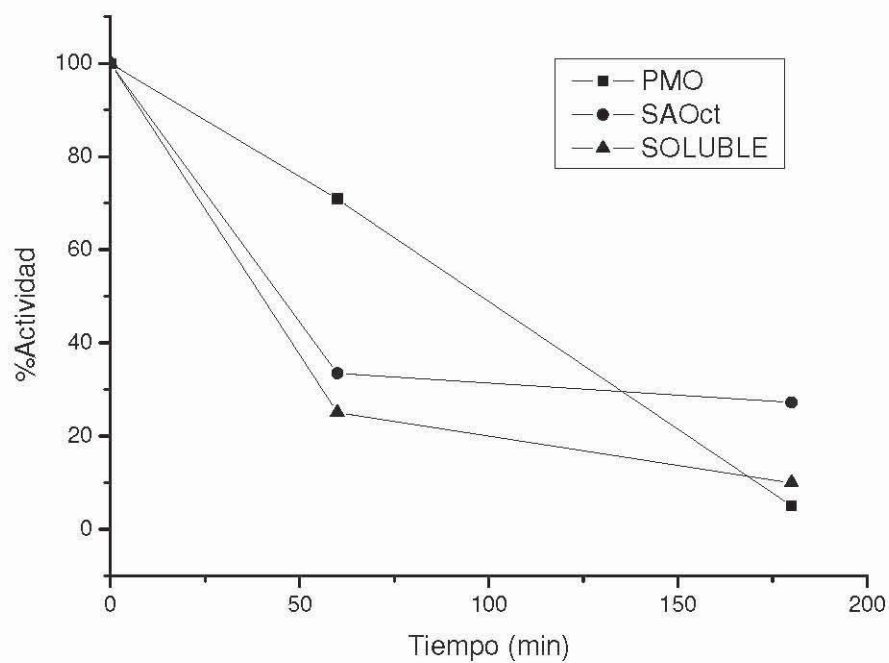


FIG. 9

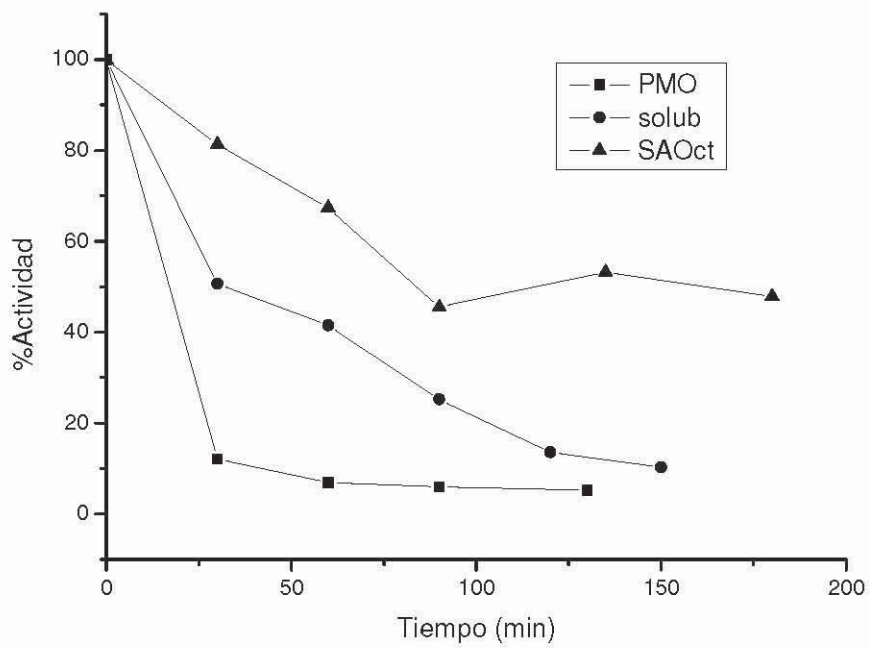


FIG. 10



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030515

②② Fecha de presentación de la solicitud: 09.04.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12N11/14** (2006.01)
B01J32/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	M. SHAKERI et al., "Effect of the structural chemical composition of mesoporous materials on the adsorption and activation of the <i>Rhizopus oryzae</i> lipase-catalyzed trans-esterification reaction in organic solvent", Catalysis Communications, 2008, vol. 10, nº 2, Páginas 165-168.	1-20
X	E. SERRA et al., "A comparative study of periodic mesoporous organosilica and different hydrophobis mesoporous silicas for lipase immobilization", Microporous and Mesoporous Materials, 2010 [accesible en línea 31.03.2010], vol. 132, nº 3, páginas 487-493.	1-18
X	S. URREGO et al., "Bottle-around-the-ship: A method to encapsulate enzymes in ordered mesoporous materials", Microporous and Mesoporous Materials, 2010 [accesible en línea 29.09.2009], vol. 129, nº 1-2, páginas 173-178.	1-18
A	WO 2009010561 A1 (NOVOZYMES) 22.01.2009, todo el documento.	1-20
A	R. M. BLANCO et al., "Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization. Characterization of the support and the catalyst", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2004, vol. 30, nº 2, páginas 83-93.	1-20

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
02.03.2012

Examinador
E. Davila Muro

Página
1/4

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

C12N, B01J

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, XPESP, CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 02.03.2012

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 19,20

SI

Reivindicaciones 1-18

NO**Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)**

Reivindicaciones

SI

Reivindicaciones 1-18

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	M. SHAKERI et al., Catal. Commun., 2008, vol. 10, nº 2, pgs. 165-168	
D02	E. SERRA et al., Micropor. Mesopor. Mat., 2010, vol. 132, nº 3, pgs. 487-493	
D03	S. URREGO et al., Micropor. Mesopor. Mat., 2010, vol. 129, nº 1-2, pgs.173-178	

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 invención se refiere a unos biocatalizadores híbridos formados por un soporte de organosilices mesoporosas periódicas (PMO) y lipasas inmovilizadas sobre dicho soporte en una cantidad superior a 5 mg/g de material mesoporoso. La invención también se refiere a la preparación de los biocatalizadores híbridos y uso de los mismos en procesos de condensación para la obtención de compuestos con utilidad en distintas áreas industriales.

El documento D01 divulga unos biocatalizadores que comprenden una lipasa obtenida a partir de *Rhizopus oryzae* (ROL) que es inmovilizada sobre un soporte de sílice pura SBA-15 o una organosílice PMO con puentes etileno (ver páginas 165-166), en una proporción de 61,8 y 65,2 mg de lipasa por g de soporte SBA-15 o PMO respectivamente (ver página 167, Tabla 2). Estos catalizadores se utilizan en una reacción de transesterificación de (S)-glicidol y vinil n-butirato (ver página 166, Esquema 1). En el caso del soporte de PMO, éste se prepara a partir de precursores bisalcoxisililados ($(R_1O)_3Si-R-Si(OR_1)_3$) como tetraetilortosilicato (TEOS) y 1,2-bis(trimetoxisilil)etano (BTMSE), y el surfactante pluronic P123; a continuación se elimina el surfactante y se adiciona una solución tamponanda de lipasa ROL.

El documento D02 divulga biocatalizadores formados por una lipasa obtenida a partir de *Candida antarctica* fracción B (CaLB) inmovilizada sobre distintos soportes de sílices mesoporosas, en concreto, sílice amorfa Oct-AS-Me y Oct-AS-Et funcionalizada con octiltrimetoxisilano y octiltriethoxisilano respectivamente, sílices SBA-15 y Me-SBA-15, y organosílice mesoporosa PMO con puentes etileno (ver páginas 488-489 y Tabla 1). La cantidad máxima de lipasa inmovilizada sobre estos soportes es de 20-200 mg/g de soporte, siendo 91 mg/g en el caso de PMO. En D02 se estudia la actividad hidrolítica de estos catalizadores sobre tributirina (ver página 488).

El documento D03 divulga el procedimiento de obtención de materiales organosilices mesoporosos ordenados en los que se inmoviliza una lipasa de tipo CaLB. Se preparan biocatalizadores con una carga enzimática de 20-90 mg de lipasa por g de soporte mesoporoso (ver página 178, Tabla 3). En este caso también se divulga la utilización de estos catalizadores heterogéneos en la hidrólisis de tributirina.

En consecuencia, el objeto de la invención recogido en las reivindicaciones 1-18 ya es conocido a la vista de los documentos D01-D03. Por lo tanto, esas reivindicaciones no se considera nuevas ni con actividad inventiva según los artículos 6.1 y 8.1 LP 11/1986.

Respecto a las reivindicaciones 19 y 20, relativas al uso de estos biocatalizadores heterogéneos en reacciones de condensación de ácidos grasos y alcoholes para obtener biodiesel, queda divulgado en D01 la utilización de catalizadores de lipasas inmovilizadas sobre soportes PMO en reacciones de transesterificación de alcoholes (glicidol) y ésteres (vinil butirato), y por tanto se considera que no implica actividad inventiva el hecho de utilizar ácidos grasos o sus ésteres. En consecuencia, las reivindicaciones 19-20 se considera que carecen de actividad inventiva según el artículo 8.1 LP 11/1986.