

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 629**

21 Número de solicitud: 201031392

51 Int. Cl.:

C12N 11/08 (2006.01)

C12Q 1/34 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **17.09.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **27.07.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
27.07.2012

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

72 Inventor/es:
**BLANCO MARTÍN, ROSA MARÍA;
DÍAZ CARRETERO, ISABEL;
FERNÁNDEZ LAGO, ÓSCAR y
TORRES OLIVARES, CARLOS F.**

74 Agente/Representante:
Pons Ariño, Ángel

54 Título: **BIOCATALIZADORES BASADOS EN COMPOSITOS MIXTOS DE METACRILATO-SÍLICE.**

57 Resumen:

Biocatalizadores basados en composites mixtos de metacrilato-sílice.

Biocatalizadores basados en composites mixtos que contienen material de sílices mesoporosas unidas o cementadas con una resina orgánica y enzimas inmovilizados sobre los mismos. Estos biocatalizadores son útiles como soportes para la inmovilización de enzimas tales como las lipasas.

ES 2 385 629 A1

DESCRIPCIÓN

**BIOCATALIZADORES BASADOS EN COMPOSITOS MIXTOS DE
METACRILATO-SÍLICE**

La presente invención se refiere a un biocatalizador basado en
5 composites mixtos que contienen material de sílices mesoporosas unidas
o “cementadas” con una resina orgánica y enzimas inmovilizados sobre
los mismos. La presente invención también se refiere al procedimiento de
síntesis de dichos biocatalizadores así como a su uso como soportes
para la inmovilización de enzimas tales como las lipasas.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se ha descrito la utilización de diversos materiales silíceos como
soportes para la inmovilización de enzimas dada la gran versatilidad que
15 ofrecen estos materiales en diversos parámetros: A nivel textural existen
sílices con distintos tamaños de partícula, diámetros de poro, área
superficial e incluso en cuanto a poseer una estructura interna regular o
amorfa. A nivel químico también la versatilidad es enorme pues pueden
funcionalizarse con innumerables grupos funcionales con los que
20 interaccionar con las enzimas ya sea mediante unión covalente o
mediante interacciones no-covalentes. A este amplio margen de
posibilidades hay que sumarle además la ventaja que proporciona su
bajo coste.

25 La sílice mesoporosa tiene un diámetro de poro entre 2 y 50 nm. El
tamaño de poro es importante para poder permitir la funcionalización de
la sílice manteniendo diámetros suficientemente anchos en los canales
de los poros que no dificulten una buena difusión del enzima y por tanto
permitan un mejor aprovechamiento de la superficie interna del soporte.
30 La inmovilización de lipasas sobre sílices requiere la funcionalización de
la superficie de la sílice con grupos hidrofóbicos. El anclaje de grupos

hidrofóbicos sobre la superficie facilita la unión de lipasa sobre los soportes formando así “sílices funcionalizadas”.

5 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 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
10 soporte está limitado a una pequeña parte de la superficie enzimática.

Las lipasas son una familia de enzimas con actividad acil hidrolasa, que poseen un dominio hidrofóbico en su superficie, mediante el cual se regula el acceso de sustratos al centro activo. La inmovilización de
15 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 actividad.

20 Se han descrito estudios previos en los que se muestran excelentes cargas de lipasa sobre estas sílices funcionalizadas con grupos hidrofóbicos: (Blanco,R.M., et al., Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization: Characterization of the support and the catalysts. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2004. **30**(2): p. 83-
25 93) y se ha demostrado su gran eficacia como biocatalizador.

No obstante los biocatalizadores puramente síliceos presentan a menudo pequeños tamaños de partícula y baja resistencia mecánica, lo que hace imposible su uso en algunos tipos de reactores y dificulta en extremo la
30 recuperación del soporte.

Asimismo, se han descrito resinas orgánicas para inmovilizar lipasas, especialmente resinas de metacrilato (Miletic, N., et al., *Macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins Versatile immobilization supports for biocatalysts*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009. **56**(4): p. 196-201).

Este tipo de resinas orgánicas no permiten la obtención de cargas de enzima tan altas como las sílices mesoporosas funcionalizadas.

Por otro lado, la sílice se puede funcionalizar para dirigir las interacciones que se producen con la superficie de las enzimas para su inmovilización, alcanzándose altas cargas de enzima por gramo de sílice. Sin embargo, el tamaño de partícula de estos materiales no suele exceder de unas 60 micras, lo que en ocasiones dificulta su manejo.

Se han descrito recubrimientos de grupos orgánicos sobre materia inorgánica (patentes MXPA05008234 (A) y ES2152121 (A1), soportes sobre base inorgánica con lugares de fijación para enzimas orgánicos AR245502 (A1) y soportes comerciales para inmovilización de enzimas AR241793 (A1).

Por tanto, sería deseable proporcionar un nuevo tipo de biocatalizadores que consigan solventar los problemas de tamaño de la sílice mesoporosa funcionalizada y los problemas de carga de las resinas orgánicas. Es decir, sería deseable diseñar soportes capaces de soportar altas cargas enzimáticas (al menos parecidas a las de las sílices funcionalizadas), con suficiente área superficial, con suficiente diámetro medio de poro y con un tamaño de partícula superior a las 100 μm para facilitar su recuperación y uso en un reactor.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un compuesto, preferiblemente un biocatalizador mixto, que comprende un soporte de composites mixtos de sílice y un polímero orgánico, y uno o más enzimas caracterizados por estar inmovilizados sobre dicho soporte.

5

Otro aspecto de la presente invención se refiere al procedimiento de preparación del compuesto, preferiblemente biocatalizador mixto, mencionado anteriormente que comprende:

- una etapa de adición de la sílice a una mezcla de reactivos del polímero orgánico y una fase de componente inerte que comprende agua y una mezcla de uno o más alcoholes, preferentemente ciclohexanol y tetradecanol; y
- una etapa de adición de una disolución tamponada de la enzima, preferiblemente de lipasa.

15

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del compuesto, preferiblemente biocatalizador mixto, definido anteriormente para catalizar procesos destinados a la obtención de compuestos con utilidad en la industria farmacéutica, química fina, cosmética y alimentaria.

20

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del compuesto, preferiblemente biocatalizador mixto, definido anteriormente para catalizar procesos en disolventes o medios orgánicos de reacción.

- 25 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un soporte para preparar el compuesto, preferiblemente biocatalizador mixto, definido anteriormente.

- 30 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar el soporte de la reivindicación 19 que comprende una etapa de adición de la sílice a una mezcla de reactivos del polímero orgánico y una

fase de componente inerte que comprende agua y una mezcla de uno o más alcoholes, preferentemente ciclohexanol y tetradecanol.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende”
 5 y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, componentes o pasos.

El término “grupos alquilo”, significa uno o más grupos alquilo de cadena lineal o ramificada, saturada o insaturada, cíclica o acíclica, que contiene
 10 de 1 a 20 átomos de C, preferiblemente de 1 a 10, aún más preferiblemente de 1 a 8, y todavía más preferiblemente de 8 átomos de C, e incluye, entre otros, los grupos metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *sec*-butilo y *tert*-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, isopropenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 3-
 15 octenilo, etenilo, 1-propinilo, 2-propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 3-butinilo, 1,3-butadiinilo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, y 2-ciclooctenilo; que puede estar opcionalmente sustituido por uno o más grupos tales como halo (fluor, cloro, bromo, iodo), amino, hidroxilo, alcoxilo, nitro y nitrilo.

20 El término “grupos aromáticos”, se refiere a anillo monocíclico o bicíclico de 5 a 12 miembros, que contiene opcionalmente de 1 a 4 heteroátomos seleccionados de O, S y N donde hay dobles enlaces conjugados que dan lugar a al menos dos formas resonantes equivalentes, e incluye entre
 25 otros fenilo, naftilo, piridilo, tienilo y furanilo, que puede estar opcionalmente sustituido por uno o más grupos tales como halo (fluor, cloro, bromo, iodo), amino, hidroxilo, alcoxilo, nitro y nitrilo.

La invención se refiere pues a un compuesto, preferiblemente un
 30 biocatalizador mixto, según se ha definido anteriormente.

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto,

preferiblemente un biocatalizador mixto, tal y como se ha definido anteriormente en el que los enzimas son lipasas.

5 En otra realización, la invención se refiere a un compuesto, preferiblemente un biocatalizador mixto, tal y como se ha definido anteriormente en el que los enzimas están en una cantidad de al menos 10 mg por gramo de soporte, preferiblemente en una cantidad de entre 40 y 400 mg por gramo de soporte; y aún más preferiblemente en una cantidad de 150 mg por gramo de soporte.

10

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto, preferiblemente un biocatalizador mixto, tal y como se ha definido anteriormente en el que el polímero orgánico es metacrilato.

15 En otra realización, la invención se refiere a un compuesto, preferiblemente un biocatalizador mixto, tal y como se ha definido anteriormente en el que el soporte tiene un tamaño medio de poro de entre 5 y 30 nm,

20 En otra realización, la invención se refiere a un compuesto, preferiblemente un biocatalizador mixto, tal y como se ha definido anteriormente en el que el soporte tiene un tamaño medio de poro de entre 10 y 50 nm, preferiblemente de entre 12 y 30 nm.

25 En otra realización, la invención se refiere a un compuesto, preferiblemente un biocatalizador mixto, tal y como se ha definido anteriormente en el que el soporte tiene un tamaño de partícula de entre 10 y 500 μm , preferiblemente de entre 100 y 200 μm .

30 En otra realización, la invención se refiere a un compuesto, preferiblemente un biocatalizador mixto, tal y como se ha definido anteriormente donde la enzima, preferiblemente la lipasa, se encuentra

inmovilizada mediante interacciones hidrofóbicas.

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto, preferiblemente un biocatalizador mixto, tal y como se ha definido
5 anteriormente donde la sílice contiene un 8% de su peso como grupos hidrofóbicos anclados en su superficie.

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto, preferiblemente un biocatalizador mixto, tal y como se ha definido
10 anteriormente donde la sílice está funcionalizada, preferiblemente con grupos alquilo o grupos aromáticos; aún más preferiblemente con grupos alquilo; y todavía más preferiblemente con grupos octilo

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto, preferiblemente un biocatalizador mixto, tal y como se ha definido
15 anteriormente, donde la sílice está funcionalizada con distintos grupos reactivos orgánicos o inorgánicos que permiten la unión covalente o no – covalente de cualquier enzima, preferiblemente lipasa.

20 En otra realización, la invención se refiere a un compuesto, preferiblemente un biocatalizador mixto, tal y como se ha definido anteriormente donde:

- los enzimas son lipasas; y
- el polímero orgánico es metacrilato.

25

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto, preferiblemente un biocatalizador mixto, tal y como se ha definido anteriormente donde:

- los enzimas son lipasas;
- 30 - el polímero orgánico es metacrilato; y
- los enzimas están en una cantidad de al menos 10 mg por gramo de soporte, preferiblemente en una cantidad de entre 40 y 400 mg por

gramo de soporte; y aún más preferiblemente en una cantidad de 150 mg por gramo de soporte.

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto,
5 preferiblemente un biocatalizador mixto, tal y como se ha definido anteriormente donde:

- los enzimas son lipasas;
- el polímero orgánico es metacrilato; y
- el soporte tiene un tamaño medio de poro de entre 10 y 50 nm,
10 preferiblemente de entre 12 y 30 nm.

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto, preferiblemente un biocatalizador mixto, tal y como se ha definido anteriormente donde:

- 15 - los enzimas son lipasas;
- el polímero orgánico es metacrilato;
- los enzimas están en una cantidad de al menos 10 mg por gramo de soporte, preferiblemente en una cantidad de entre 40 y 400 mg por gramo de soporte; y aún más preferiblemente en una cantidad de 150 mg
20 por gramo de soporte y
- el soporte tiene un tamaño medio de poro de entre 10 y 50 nm, preferiblemente de entre 12 y 30 nm.

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto,
25 preferiblemente un biocatalizador mixto, tal y como se ha definido anteriormente donde:

- los enzimas son lipasas;
- el polímero orgánico es metacrilato; y
- el soporte tiene un tamaño de partícula de entre 10 y 500 μm ,
30 preferiblemente de entre 100 y 200 μm .

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto,

preferiblemente un biocatalizador mixto, tal y como se ha definido anteriormente donde:

- los enzimas son lipasas;
- el polímero orgánico es metacrilato;
- 5 - los enzimas están en una cantidad de al menos 10 mg por gramo de soporte, preferiblemente en una cantidad de entre 40 y 400 mg por gramo de soporte; y aún más preferiblemente en una cantidad de 150 mg por gramo de soporte y
- el soporte tiene un tamaño de partícula de entre 10 y 500 μm ,
- 10 preferiblemente de entre 100 y 200 μm .

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto, preferiblemente un biocatalizador mixto, tal y como se ha definido anteriormente donde:

- 15 - los enzimas son lipasas;
- el polímero orgánico es metacrilato; y
- donde la sílice está funcionalizada, preferiblemente con grupos alquilo o grupos aromáticos; aún más preferiblemente con grupos alquilo; y todavía más preferiblemente con grupos octilo.

20

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto, preferiblemente un biocatalizador mixto, tal y como se ha definido anteriormente donde:

- los enzimas son lipasas;
- 25 - el polímero orgánico es metacrilato;
- los enzimas están en una cantidad de al menos 10 mg por gramo de soporte, preferiblemente en una cantidad de entre 40 y 400 mg por gramo de soporte; y aún más preferiblemente en una cantidad de 150 mg por gramo de soporte; y
- 30 - donde la sílice está funcionalizada, preferiblemente con grupos alquilo o grupos aromáticos; aún más preferiblemente con grupos alquilo; y todavía más preferiblemente con grupos octilo.

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto, preferiblemente un biocatalizador mixto, tal y como se ha definido anteriormente donde:

- los enzimas son lipasas;
- 5 - el polímero orgánico es metacrilato;
- el soporte tiene un tamaño medio de poro de entre 10 y 50 nm, preferiblemente de entre 12 y 30 nm; y
- donde la sílice está funcionalizada, preferiblemente con grupos alquilo o grupos aromáticos; aún más preferiblemente con grupos alquilo; y
- 10 todavía más preferiblemente con grupos octilo.

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto, preferiblemente un biocatalizador mixto, tal y como se ha definido anteriormente donde:

- 15 - los enzimas son lipasas;
- el polímero orgánico es metacrilato;
- los enzimas están en una cantidad de al menos 10 mg por gramo de soporte, preferiblemente en una cantidad de entre 40 y 400 mg por gramo de soporte; y aún más preferiblemente en una cantidad de 150 mg
- 20 por gramo de soporte
- el soporte tiene un tamaño medio de poro de entre 10 y 50 nm, preferiblemente de entre 12 y 30 nm y
- donde la sílice está funcionalizada, preferiblemente con grupos alquilo o grupos aromáticos; aún más preferiblemente con grupos alquilo; y
- 25 todavía más preferiblemente con grupos octilo.

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto, preferiblemente un biocatalizador mixto, tal y como se ha definido anteriormente donde:

- 30 - los enzimas son lipasas;
- el polímero orgánico es metacrilato;
- el soporte tiene un tamaño de partícula de entre 10 y 500 μ m,

preferiblemente de entre 100 y 200 μm ; y

- donde la sílice está funcionalizada, preferiblemente con grupos alquilo o grupos aromáticos; aún más preferiblemente con grupos alquilo; y todavía más preferiblemente con grupos octilo.

5

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto, preferiblemente un biocatalizador mixto, tal y como se ha definido anteriormente donde:

- los enzimas son lipasas;

10 - el polímero orgánico es metacrilato;

- los enzimas están en una cantidad de al menos 10 mg por gramo de soporte, preferiblemente en una cantidad de entre 40 y 400 mg por gramo de soporte; y aún más preferiblemente en una cantidad de 150 mg por gramo de soporte;

15 - el soporte tiene un tamaño de partícula de entre 10 y 500 μm , preferiblemente de entre 100 y 200 μm ; y

- donde la sílice está funcionalizada, preferiblemente con grupos alquilo o grupos aromáticos; aún más preferiblemente con grupos alquilo; y todavía más preferiblemente con grupos octilo.

20

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto, preferiblemente un biocatalizador mixto, tal y como se ha definido anteriormente donde:

- los enzimas son lipasas;

25 - el polímero orgánico es metacrilato; y

- donde la sílice está funcionalizada con distintos grupos reactivos orgánicos o inorgánicos que permiten la unión covalente o no-covalente de cualquier enzima, preferiblemente lipasa.

30 En otra realización, la invención se refiere a un compuesto, preferiblemente un biocatalizador mixto, tal y como se ha definido anteriormente donde:

- los enzimas son lipasas;
- el polímero orgánico es metacrilato;
- los enzimas están en una cantidad de al menos 10 mg por gramo de soporte, preferiblemente en una cantidad de entre 40 y 400 mg por gramo de soporte; y aún más preferiblemente en una cantidad de 150 mg por gramo de soporte; y
- donde la sílice está funcionalizada con distintos grupos reactivos orgánicos o inorgánicos que permiten la unión covalente o no –covalente de cualquier enzima, preferiblemente lipasa.

10

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto, preferiblemente un biocatalizador mixto, tal y como se ha definido anteriormente donde:

- los enzimas son lipasas;
- el polímero orgánico es metacrilato;
- el soporte tiene un tamaño medio de poro de entre 10 y 50 nm, preferiblemente de entre 12 y 30 nm; y
- donde la sílice está funcionalizada con distintos grupos reactivos orgánicos o inorgánicos que permiten la unión covalente o no –covalente de cualquier enzima, preferiblemente lipasa.

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto, preferiblemente un biocatalizador mixto, tal y como se ha definido anteriormente donde:

- los enzimas son lipasas;
- el polímero orgánico es metacrilato;
- los enzimas están en una cantidad de al menos 10 mg por gramo de soporte, preferiblemente en una cantidad de entre 40 y 400 mg por gramo de soporte; y aún más preferiblemente en una cantidad de 150 mg por gramo de soporte
- el soporte tiene un tamaño medio de poro de entre 10 y 50 nm, preferiblemente de entre 12 y 30 nm y

- donde la sílice está funcionalizada con distintos grupos reactivos orgánicos o inorgánicos que permiten la unión covalente o no –covalente de cualquier enzima, preferiblemente lipasa.

5 En otra realización, la invención se refiere a un compuesto, preferiblemente un biocatalizador mixto, tal y como se ha definido anteriormente donde:

- los enzimas son lipasas;

- el polímero orgánico es metacrilato;

10 - el soporte tiene un tamaño de partícula de entre 10 y 500 μm , preferiblemente de entre 100 y 200 μm ; y

- donde la sílice está funcionalizada con distintos grupos reactivos orgánicos o inorgánicos que permiten la unión covalente o no –covalente de cualquier enzima, preferiblemente lipasa.

15

En otra realización, la invención se refiere a un compuesto, preferiblemente un biocatalizador mixto, tal y como se ha definido anteriormente donde:

- los enzimas son lipasas;

20 - el polímero orgánico es metacrilato;

- los enzimas están en una cantidad de al menos 10 mg por gramo de soporte, preferiblemente en una cantidad de entre 40 y 400 mg por gramo de soporte; y aún más preferiblemente en una cantidad de 150 mg por gramo de soporte;

25 - el soporte tiene un tamaño de partícula de entre 10 y 500 μm , preferiblemente de entre 100 y 200 μm ; y

- donde la sílice está funcionalizada con distintos grupos reactivos orgánicos o inorgánicos que permiten la unión covalente o no –covalente de cualquier enzima, preferiblemente lipasa.

30

En otra realización, la invención también se refiere a un procedimiento para preparar el compuesto, preferiblemente biocatalizador mixto,

definido anteriormente donde en la etapa de adición de la sílice interviene un agente director, preferiblemente polivinil pirrolidona.

- 5 En otra realización, la invención también se refiere a un procedimiento para preparar el compuesto, preferiblemente biocatalizador mixto, definido anteriormente donde en la etapa de adición de la sílice interviene un iniciador, preferiblemente azobisciclohexanocarbonitrilo.
- 10 En otra realización, la invención también se refiere a un procedimiento para preparar el compuesto, preferiblemente biocatalizador mixto, definido anteriormente donde el agente director de la estructura, el polímero orgánico, el iniciador y la mezcla de alcoholes son de la misma naturaleza.
- 15 En otra realización, la invención también se refiere a un procedimiento para preparar el compuesto, preferiblemente biocatalizador mixto, definido anteriormente donde la mezcla se mantiene a una temperatura de entre 50 y 100°C, preferiblemente de entre 50 y 80 °C.
- 20 En otra realización, la invención también se refiere a un procedimiento para preparar el compuesto, preferiblemente biocatalizador mixto, definido anteriormente el tiempo de reacción es de entre 2 y 12 horas, preferiblemente durante 6 h.
- 25 En otra realización, la invención también se refiere a un procedimiento para preparar el compuesto, preferiblemente biocatalizador mixto, definido anteriormente donde el soporte es lavado con un disolvente, preferiblemente etanol.
- 30 En otra realización, la invención también se refiere a un procedimiento para preparar el compuesto, preferiblemente biocatalizador mixto,

definido anteriormente donde el soporte es posteriormente secado y tamizado.

- En otra realización, la invención también se refiere a un procedimiento
- 5 para preparar el compuesto, preferiblemente biocatalizador mixto, definido anteriormente que comprende las siguientes etapas:
- a - adición de sílice, preferiblemente funcionalizada con grupos octilo, a una mezcla de reactivos de polímero orgánico, preferiblemente de metacrilato (tales como glicidil metacrilato y etilenglicol dimetacrilato) y
- 10 una fase de componente inerte consistente en agua y alcoholes (tales como ciclohexanol y tetradecanol), se usa polivinil pirrolidona como agente director de la estructura y azobis-ciclohexanocarbonitrilo como iniciador; preferiblemente en las siguientes cantidades: entre 13,8 y 27,6 gramos de glicidil metacrilato, entre 13,8 y 20,7 g de etilenglicol dimetacrilato 13,8 g de etilenglicol dimetacrilato o dietilenglicol-
- 15 dimetacrilato,, 8,8 g de iniciador azobisciclohexanocarbonitrilo, 45,2 g: 40,7g de ciclohexanol como componente inerte y 4,5 g de un alcohol, preferiblemente, tetradecanol o hexadecanol, polivinilpirrolidona 2,4 g y 240 g de agua, y 1 g sílice.
- 20 b - Se mantiene esta mezcla a una temperatura entre 50° y 70°C durante 2h con agitación suave y posteriormente a una temperatura entre 70° y 80°C durante 4h con una agitación de 200rpm.
- c - Una vez polimerizado, se lava con agua y etanol, se conserva en etanol 12h y se seca en rotavapor a 45° y un vacío de 30mbar.
- 25 d.- Se tamiza el material para separar las distintas fracciones de tamaño de partícula.
- e - Preparación de una disolución tamponada de la enzima, preferiblemente lipasa; y
- f - Adición de la disolución de la etapa e, sobre el material obtenido tras la
- 30 etapa d;

En otra realización, la invención también se refiere a un procedimiento para preparar el compuesto, preferiblemente biocatalizador mixto, definido anteriormente que comprende las etapas de a a f definidas anteriormente donde el material que se obtiene en la etapa d presenta un tamaño de partícula entre 100 y 200 micras de diámetro.

En otra realización, la invención también se refiere a un procedimiento para preparar el compuesto, preferiblemente biocatalizador mixto, definido anteriormente que comprende las etapas de a a f definidas anteriormente donde, tras la etapa f, se lleva a cabo una etapa de agitación.

En otra realización, la invención también se refiere a un procedimiento para preparar el compuesto, preferiblemente biocatalizador mixto, definido anteriormente que comprende las etapas de a a f definidas anteriormente donde, tras la etapa f, se lleva a cabo una etapa de filtrado y lavado de la suspensión con la misma disolución tamponadora.

En otra realización, la invención también se refiere a un procedimiento para preparar el compuesto, preferiblemente biocatalizador mixto, definido anteriormente que comprende las etapas de a a f definidas anteriormente donde, tras la etapa f, se lleva a cabo una etapa de secado suspendiendo en acetona.

En otra realización, la invención también se refiere a un procedimiento para preparar el compuesto, preferiblemente biocatalizador mixto, definido anteriormente que comprende las etapas de a a f definidas anteriormente donde, tras la etapa f, se lleva a cabo una etapa de filtrado a sequedad a vacío.

En otra realización, la invención también se refiere a un procedimiento para preparar el compuesto, preferiblemente biocatalizador mixto,

definido anteriormente que comprende las etapas de a a f definidas anteriormente donde la mezcla se mantiene en etanol 12 horas y seguidamente se seca completamente empleando temperaturas suaves y vacío.

5

Asimismo, la presente invención cubre todas las combinaciones posibles de las realizaciones particulares y preferidas descritas aquí arriba.

En otra realización, la invención se refiere al compuesto, preferiblemente
10 biocatalizador mixto, definido anteriormente seleccionado del ejemplo 1.

La inmovilización de la lipasa tiene lugar a partir de una disolución que puede contener distintas cantidades de enzima entre 0,1 y 4 mg de enzima por ml, por ejemplo 1,7 mg/ml en una disolución tamponadora a
15 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, sobre una cantidad desde 50 a 150 mg, preferiblemente desde 75 a 120 mg de soporte. La suspensión se mantiene en agitación suave.

20 Periódicamente se ensaya la actividad catalítica de suspensión y sobrenadante espectrofotométricamente por hidrólisis de pNPA a 348 nm (según se describe más adelante) hasta actividad nula o constante en el sobrenadante, que indica el final del proceso de inmovilización. Para obtener alícuotas de sobrenadante, se centrifugan las alícuotas de
25 suspensión a 13000 rpm durante 2 min. 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.

30 Por tanto, las ventajas de la presente invención son el diseño de un soporte para preparar un biocatalizador mixto en que se combinan materiales orgánicos e inorgánicos para así aumentar el tamaño de

partícula y poder así manejarlos sin dificultad. Para aumentar el tamaño de partícula se ha polimerizado alrededor de la sílice un polímero orgánico, que mejora la estabilidad mecánica del soporte y su manejo.

- 5 Así pues, en la presente invención se describe combinación de materiales orgánicos e inorgánicos para producir un soporte adecuado para biocatalizadores, es decir, al uso de una resina orgánica como “cementante” de partículas silíceas para fabricar soportes para inmovilización de enzimas.

10

Asimismo, en la presente invención se desarrollan composites mixtos a partir de sílices que se han aglomerado mediante la polimerización de metacrilato. Dichos composites presentan gran variedad de tamaños de partícula, siendo de especial interés los comprendidos entre 100 y 200 micras, que permiten alcanzar altas cargas enzimáticas de enzima inmovilizado y buenas propiedades catalíticas. Se preservan así las excelentes propiedades texturales que la sílice proporciona al biocatalizador final, mientras que se mejora la manejabilidad del catalizador y se facilita su empleo en diversos tipos de reactores.

20

La unión de varias partículas de sílice unidas entre sí por el polímero orgánico presentan tamaños de partícula mucho mayores que las de sílice. Los catalizadores con tamaños de partícula relativamente grandes (entre 100 y 200 micras en este caso) son más manejables que los de menor tamaño. Dichos biocatalizadores mixtos, presentan un tamaño de partícula mucho más grande que el de la sílice mesoporosa, de entre 100 y 200 μm , lo que facilita su recuperación y su versatilidad en cualquier tipo de reactor. Se pueden usar atrapados tras rejillas o membranas de poro o luz de gran tamaño, lo que permite que sustratos y productos difundan a través de la rejilla o membrana muy fácilmente.

30

Además los composites de sílice octilada agloremada con metacrilato preservan no sólo la capacidad de alojar alta carga enzimática de las sílices amorfas, sino también la actividad catalítica del enzima inmovilizado en el composite.

5

Estos biocatalizadores de lipasa inmovilizada sobre composites de sílice octilada aglomerada con metacrilato son muy estables en presencia de disolventes orgánicos o en medios orgánicos de reacción. Es por tanto clave de su utilización en procesos que han de ser llevados a cabo en
10 estos medios, como por ejemplo la obtención de lípidos estructurados para alimentos funcionales por vía enzimática, y es donde reside la importancia de la presente invención.

La presente invención describe así un nuevo tipo de biocatalizadores que
15 consiguen solventar los problemas de tamaño de la sílice mesoporosa funcionalizada y los problemas de carga de las resinas orgánicas, y que comprenden: Biocatalizadores basados en composites mixtos de metacrilato-sílice y enzimas (lipasas) inmovilizados sobre los mismos.

20 Asimismo, estos biocatalizadores mixtos soportan altas cargas enzimáticas y poseen altas actividades catalíticas. Mayor que el de las resinas puramente orgánicas.

Por otro lado, los biocatalizadores mixtos de la presente invención tienen
25 una mayor versatilidad debido a su fácil manejo y elevada actividad.

Tras un número indeterminado de ciclos de reacción con el biocatalizador mixto de la presente invención, la enzima (preferiblemente la lipasa) se puede ir desnaturalizando y queda inactiva, mientras que el soporte
30 sigue manteniendo sus características iniciales. Debido a que la enzima está unida al soporte mediante interacciones no covalentes, ésta se puede reemplazar fácilmente y el soporte puede ser reutilizado.

La actividad de los biocatalizadores se determina por hidrólisis de tributirina y síntesis de oleato de butilo (según se describe más adelante).

- 5 Por otro lado la elevada estabilidad que adquiere la lipasa inmovilizada sobre los soportes mixtos en medios orgánicos como el acetonitrilo proporciona la posibilidad de catalizar reacciones en condiciones que no permiten su uso con otras preparaciones (comerciales o no comerciales) de lipasa inmovilizada.

10

Un ejemplo es la síntesis de lípidos estructurados para su uso en alimentos funcionales. Aunque algunos procesos se siguen realizando por vía química, la biocatálisis ha demostrado ser una herramienta eficaz para la producción de estos ingredientes. Con lipasas inmovilizadas en

- 15 los soportes mixtos de metacrilato y sílice se alcanzan elevadas cargas y se consigue un soporte versátil y funcional, capaz de emplearse no sólo para la producción de lípidos estructurados sino también en industria farmacéutica y química fina.

- 20 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.

25

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Análisis termogravimétricos de los soportes orgánico-silíceos y de una sílice octilada.

30

Figura 2. Micrografía de microscopía electrónica de barrido de una sílice octilada.

Figura 3. Incubación a 35°C en medio orgánico (acetonitrilo) de lipasa inmovilizada sobre los composites mixtos de metacrilato sílice. Actividad residual en hidrólisis de tributirina en los sucesivos ciclos de incubación en acetonitrilo.

EJEMPLOS

10

Ejemplo 1: Caracterización del soporte composites mixtos de metacrilato-sílice

a) 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 de tamaño de poro aplicando el protocolo BJH a la rama de adsorción de la isoterma. La desgasificación se realizó a temperatura ambiente para mantener intactos los grupos orgánicos presentes

Las isotermas realizadas mostraron que los nuevos soportes mixtos presentan un diámetro de poro medio de 17.5 nm, un área superficial de 66 m² y un volumen de poro de 0.35 cm³/g.

Tabla 1. Ejemplo de las características texturales, de carga enzimática y actividad en hidrólisis de tributirina de los biocatalizadores de lipasa basados en soportes mixtos de metacrilato-sílice de tamaño entre 100 y 200 µm en comparación con los obtenidos sobre sílice funcionalizada con octilo y sobre metacrilato independientemente. (nd: no determinado)

Ejemplo	Superficie (m ² /g)	Diámetro de poro (nm)	Volumen de poro (cm ³ /g)	Materia inorgánica (%)	Carga enzimática (mg/g)	Actividad Tributirina (U/g)
Ejemplo 1 (lote 1)*	66.99	17.56	0.385211	21	161	15333
Ejemplo 1 (lote 2)*	61.3520	17.41nm	0.3388	20	155	14500
Sílice octil	254	25	2.2	92	190	18000
Metacrilato	nd	nd	nd	nd	40	900

* Lotes 1 y 2 del mismo biocatalizador mixto.

b) Análisis termogravimétrico:

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 1).

El análisis termogravimétrico revela una pérdida de peso del 81% que corresponde a los grupos octilo anclados sobre la sílice más el polímero orgánico de metacrilato que aglomera las partículas de sílice. 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 soporte, y confirma que el soporte final contiene en su estructura material orgánico e inorgánico. En la sílice funcionalizada con octilos, la pérdida de peso es del 8% y se debe a los grupos octilo anclados.

Como se desprende de la figura 1, los soportes finales contienen un 20% de material silíceo en su estructura. Este porcentaje aumenta cuando los tamaños de partículas son inferiores a 100 µm en las que el material

silíceo es un 60%, y disminuye si tomamos tamaños de partícula superiores a las 200 μm , en las que la sílice es un 15%.

c) Microscopía electrónica de barrido:

Las micrografías se obtuvieron con un JEOL JSM 6400 Philips XL30
5 operando a 20 kV (figura 2).

Las micrografías obtenidas muestran que los soportes contienen dos tipos de materiales (orgánicos e inorgánicos) y que la resina orgánica (metacrilato) actúa como cementante uniendo las partículas de sílice.

Asimismo las figuras muestran las diferencias tanto morfológicas como
10 de tamaño entre la sílice octilada y la misma aglomerada con metacrilato.

Ejemplo 2: Ensayos de actividad catalítica

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

15 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 μl de la disolución o suspensión de lipasa. El coeficiente de extinción molar del *p*-nitrofenol en
20 estas condiciones es de $5150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

b) Ensayo de actividad hidrolítica de tributirina (tributirato de glicerol):

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
25 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.

Ejemplo 3.- Caracterización de los biocatalizadores de lipasa sobre composites mixtos de metacrilato-sílice y comparación con los catalizadores de lipasa sobre metacrilato y sobre sílice-octilo.

La inmovilización de lipasa sobre metacrilato y sobre sílice octilo se realiza en ambos casos de manera idéntica a la descrita para los biocatalizadores de lipasa sobre composites sílice-metacrilato. Se prepara una disolución tamponada de lipasa conteniendo entre 0.1 y 6 mg/m que se suspende sobre una cantidad entre 75 y 120 mg de metacrilato o de sílice octilada. Periódicamente se ensaya la actividad catalítica de suspensión y sobrenadante espectrofotométricamente por hidrólisis de pNPA a 348 nm hasta actividad nula o constante en el sobrenadante, que indica el final del proceso de inmovilización. Las cargas enzimáticas alcanzadas y las actividades de los catalizadores en hidrólisis de tributirina fueron para la sílice octilada de 190 mg/g y 18000 Unidades de tributirina/g respectivamente y para el metacrilato de 40 mg/g y 900 U/g respectivamente (tabla 1)

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 1 se muestra el dato del soporte mixto en comparación con los datos recogidos para lipasa inmovilizada en metacrilato y en sílice amorfa activada con grupos octilo .

Los resultados obtenidos fueron:

Soporte mixto composites mixtos de metacrilato-sílice:

Se alcanzaron cargas enzimáticas de 150mg/g de media, y muestra una actividad de 13,000 Unidades de tributirina por gramo de media.

Sílice funcionalizada con grupos octilo:

(Blanco,R.M., et al., Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization: Characterization of the support and the catalysts. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2004. **30**(2): p. 83-93)

Se obtuvieron cargas de 190 mg/g. La actividad de este catalizador fue de 18,000 unidades de tributirina por gramo.

.Resina de metacrilato:

10 sintetizada siguiendo el método de , Miletic, N., et al., *Macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins* Versatile immobilization supports for biocatalysts. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009. **56**(4): p. 196-201.

La carga enzimática alcanzada fue de 40 mg/g. La actividad de este catalizador fue de 900 unidades de tributirina por gramo

Eficiencia catalítica:

Sílice octilo: $16000 \text{ U.g}^{-1} / 200 \text{ mg.g}^{-1} = 80 \text{ U.mg}^{-1}$

Composite 100-100 (sílice octilo): $15333 \text{ U.g}^{-1} / 161 \text{ mg.g}^{-1} = 92 \text{ U.mg}^{-1}$

20

De estos ejemplos se deduce que:

La actividad hidrolítica de los biocatalizadores lipasa-composite (sílice octilo) es similar a la alcanzada por los biocatalizadores lipasa-sílice octilo; y muy superior a los soportes puramente orgánicos.

25 La eficiencia catalítica (relación entre actividad y carga enzimática) es también muy similar entre el soporte híbrido y el puramente silíceo, a pesar de que un mayor tamaño de partícula lleva implícito un aumento de las limitaciones debido a la difusión interna de sustratos y productos a través del entramado poroso de la misma.

30

Ejemplo 4: Estabilidad en medio orgánico (acetonitrilo) del biocatalizador lipasa-composite mixto de metacrilato-sílice

Se incubó el biocatalizador con 150mg de lipasa inmovilizada por gramo de soporte en acetonitrilo en un vial sellado, se mantuvo en agitación de 200 rpm y temperatura de 35°C.

- 5 A intervalos de una hora se filtró la mezcla para recuperar el soporte, se secó con acetona y vacío y se procedió al análisis de la actividad del biocatalizador por hidrólisis de tributirina., posteriormente se volvió a incubar en acetonitrilo repitiendo para cada ciclo la misma operación. En 16 ciclos no se observó pérdida de actividad aparente (figura 3).

10

Ejemplo 5. Actividad enzimática en síntesis. Formación de oleato de butilo:

- En este ejemplo se evaluó la capacidad de formación de oleato de butilo, usando como sustratos ácido oleico (Sigma) y butanol. Se empleó un
15 soporte orgánico silíceo con 20% de materia inorgánica con 150mg/g de lipasa inmovilizados en su superficie.

- Se utilizó una mezcla con 75mg de ácido oleico y 50 mg de butanol, aplicando agitación orbital a 200rpm y 30°C. Se añadió una cantidad de
20 enzima conocida (con precisión al menos de 10^{-4} g) y se dejó nuevamente en la agitación orbital a 200rpm y 30°C.

- La reacción se paró a los 5 minutos añadiendo cloroformo (grado HPLC, Panreac).

25

- Los análisis se realizaron por HPLC en una columna kromasil silica 60, de 250mm de largo y 4.6 mm de diámetro interno (Análisis Vínicos, Tomelloso, España) acoplada a un horno CTO 10A VP2, una bomba LC-10AD VP, un módulo de gradiente FCV-10AL VP, un degasificador DGU-
30 14^a y un detector evaporativo de dispersión de luz ELSD-LT de Shimadzu (IZASA, España). El bucle utilizado para inyectar las muestras fue de 20 µL.

La lipasa inmovilizada sobre estos soportes demostró su actividad en síntesis mediante la formación de oleato de butilo.

- 5 La enzima inmovilizada en las resinas de metacrilato con sílice tuvieron una actividad de 1587.6 μ moles de oleico consumidos/minuto/gramo de soporte.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto, preferiblemente un biocatalizador mixto, que comprende:
 - un soporte de composites mixtos de sílice y polímero orgánico; y
 - 5 - al menos uno enzima caracterizado por estar inmovilizado sobre dicho soporte.
2. El compuesto según la reivindicación 1 en el que los enzimas son lipasas.
- 10 3. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 en los que los enzimas están en una cantidad de al menos 10 mg por gramo de soporte, preferiblemente en una cantidad de entre 40 y 400 mg por gramo de soporte; y aún más preferiblemente en una cantidad de 150 mg
- 15 por gramo de soporte.
4. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en los que el polímero orgánico es metacrilato.
- 20 5. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el soporte tiene un tamaño medio de poro de entre 10 y 50 nm, preferiblemente de entre 12 y 30 nm.
6. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde el
- 25 soporte tiene un tamaño de partícula de entre 10 y 500 μm , preferiblemente de entre 100 y 200 μm .
7. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde la enzima se encuentra inmovilizada mediante interacciones hidrofóbicas.

8. El compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde la sílice está funcionalizada, preferiblemente con grupos alquilo o grupos aromáticos; aún más preferiblemente con grupos alquilo; y todavía más preferiblemente con grupos octilo.

5

9. Procedimiento para preparar el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende:

- una etapa de adición de la sílice a una mezcla de reactivos del polímero orgánico y una fase de componente inerte que comprende agua y una mezcla de uno o más alcoholes, preferentemente ciclohexanol y tetradecanol; y
- una etapa de adición de una disolución tamponada de la enzima, preferiblemente de lipasa.

10. Procedimiento según la reivindicación 9 donde en la etapa de adición de la sílice interviene un agente director, preferiblemente polivinil pirrolidona.

11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10 donde en la etapa de adición de la sílice interviene un iniciador, preferiblemente azobisciclohexanocarbonitrilo.

12. Procedimiento según la reivindicación 11 donde el agente director de la estructura, el polímero orgánico, el iniciador y la mezcla de alcoholes son de la misma naturaleza.

13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, donde la mezcla se mantiene a una temperatura de entre 50 y 100°C, preferiblemente de entre 50 y 80 °C.

30

14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13 donde el tiempo de reacción de la etapa de adición de la sílice es de entre 2 y 12 horas, preferiblemente durante 6 h.

5 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, donde el soporte es lavado con un disolvente, preferiblemente etanol.

16. Procedimiento según la reivindicación 15, donde el soporte es posteriormente secado y tamizado.

10

17.- Uso del compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para catalizar procesos destinados a la obtención de compuestos con utilidad en la industria farmacéutica, química fina, cosmética y alimentaria.

15 18.- Uso según la reivindicación 17 para catalizar procesos en disolventes o medios orgánicos de reacción.

19. Un soporte de composites mixtos de sílice y polímero orgánico para preparar el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

20

20. Procedimiento para preparar el soporte de la reivindicación 19 que comprende una etapa de adición de la sílice a una mezcla de reactivos del polímero orgánico y una fase de componente inerte que comprende agua y una mezcla de uno o más alcoholes, preferentemente
25 ciclohexanol y tetradecanol.

Figura 1

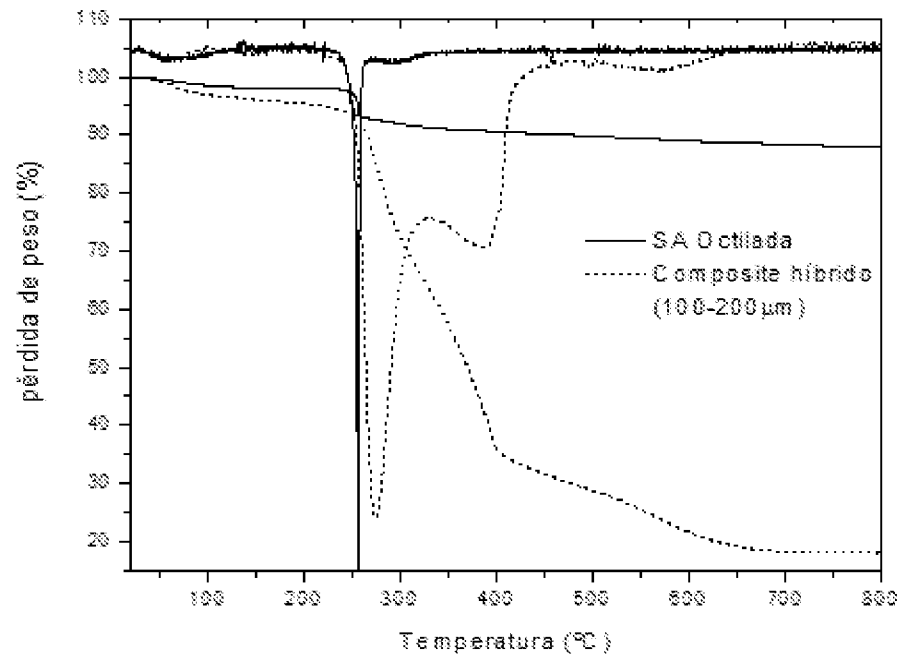
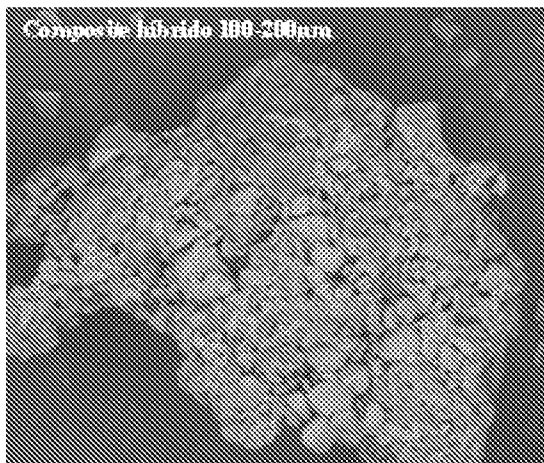
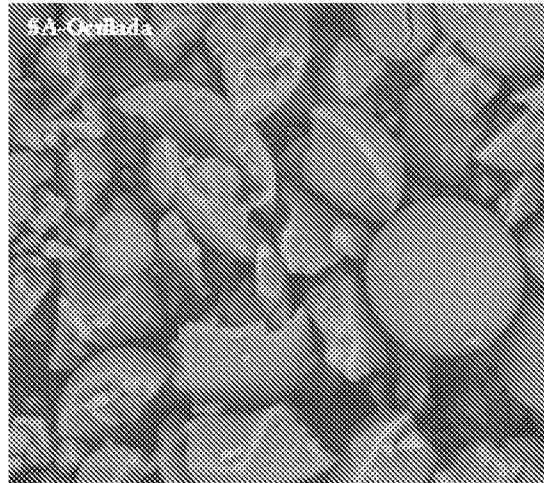


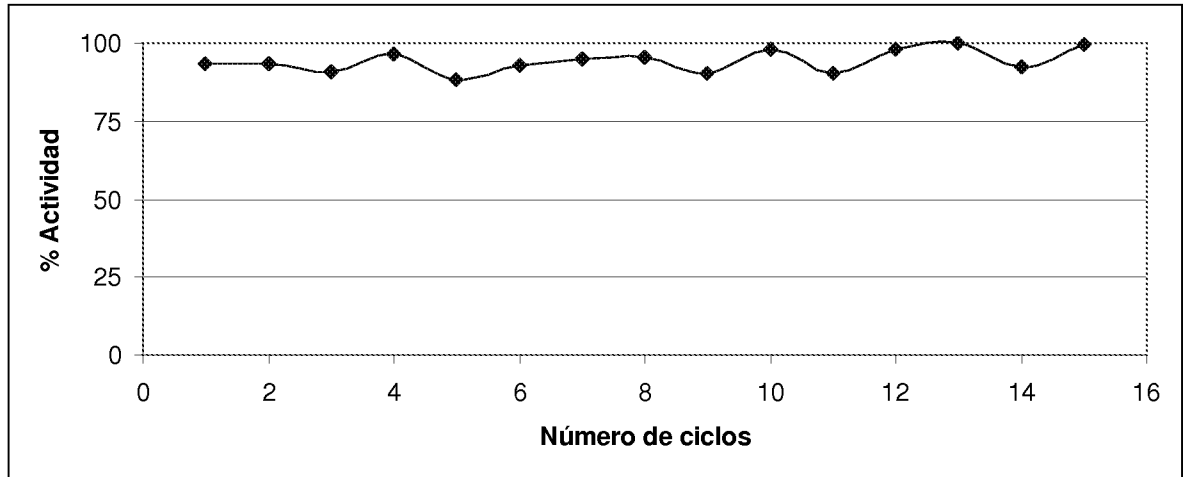
Figura 2

SEM



50 µm

Figura 3





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031392

②② Fecha de presentación de la solicitud: 17.09.2010

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	JING HE et al. Effect of surface hydrophobicity/hydrophilicity of mesoporous supports on the activity of immobilized lipase. JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE, vol. 298, 2006, páginas 780-786. Páginas 780, apartado 1. y página 781 apartados 2.2.1. y 2.2.2.	1-20
A	JING HE et al. Inhibiting the leaching of lipase from mesoporous supports by polymerization of grafted vinyl groups. MICROPOROUS AND MESOPOROUS MATERIALS, vol. 94, 2006, páginas 29-33. Resumen y páginas 29-30.	1-20
A	MASAHIRO YASUDA et al. Enzyme immobilization on amphiphilic polymer particles having grafted polyionic polymer chains. BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL. vol. 48, 2009, páginas 6-12. Página 7.	1-20
A	F. KARTAL et al. Immobilization of porcine pancreatic lipase on glycidyl methacrylate grafted poly vinyl alcohol. JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS B: ENZYMATIC, vol. 57, 2009, páginas 55-61. Páginas 55-56.	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
04.07.2012

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N11/08 (2006.01)**C12Q1/34** (2006.01)**G01N33/573** (2006.01)

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

C12N, C12Q, G01N

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: 04.07.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-20	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-20	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	JING HE et al. Effect of surface hydrophobicity/hydrophilicity of mesoporous supports on the activity of immobilized lipase. JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE, vol. 298, 2006, páginas 780-786. Páginas 780, apartado 1. y página 781 apartados 2.2.1. y 2.2.2.	
D02	JING HE et al. Inhibiting the leaching of lipase from mesoporous supports by polymerization of grafted vinyl groups. MICROPOROUS AND MESOPOROUS MATERIALS, vol. 94, 2006, páginas 29-33. Resumen y páginas 29-30.	
D03	MASAHIRO YASUDA et al. Enzyme immobilization on amphiphilic polymer particles having grafted polyionic polymer chains. BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL. vol. 48, 2009, páginas 6-12. Página 7.	
D04	F. KARTAL et al. Immobilization of porcine pancreatic lipase on glycidyl methacrylate grafted poly vinyl alcohol. JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS B: ENZYMATIC, vol. 57, 2009, páginas 55-61. Páginas 55-56.	

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 redactada, hace referencia a un compuesto, preferiblemente un biocatalizador mixto, que comprende un soporte de composites mixtos de sílice y polímero orgánico y al menos una enzima inmovilizada sobre dicho soporte (reivindicación 1). Las enzimas inmovilizadas son lipasas (reivindicación 2), en una cantidad preferiblemente de 150 mg por gramo de soporte (reivindicación 3). El polímero orgánico es metacrilato (reivindicación 4). Por otro lado, el soporte tiene un tamaño medio de poro preferiblemente de entre 12 y 30 nm (reivindicación 5) y un tamaño de partícula de entre 100 y 200 µm (reivindicación 6). Además, la enzima se encuentra inmovilizada mediante interacciones hidrofóbicas (reivindicación 7). Y la sílice está funcionalizada, preferiblemente con grupos octilo (reivindicación 8). Se reivindica también, un procedimiento para preparar dicho biocatalizador mixto (reivindicaciones 9-16), el uso del biocatalizador mixto en la industria farmacéutica, química fina, cosmética y alimentaria (reivindicación 17) y para catalizar procesos en disolventes o medios orgánicos de reacción (reivindicación 18). Y por último, se reivindica el soporte de composites mixtos de sílice y polímero orgánico para preparar dicho biocatalizador mixto (reivindicación 19) y el procedimiento para preparar dicho soporte (reivindicación 20).

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA ARTS 6 Y 8 DE LA LP

El documento D01 hace referencia al estudio sobre el efecto de soportes mesoporosos con superficies hidrofóbicas/hidrofílicas sobre la actividad de lipasas inmovilizadas en ellos (véase página 780, apartado 1). Para ello se utilizaron soportes de sílice mesoporosos tales como SBA-15, en el que se inmovilizó previamente la lipasa pancreática porcina (PPL) (véase página 781, apartado 2.2.1), y a continuación se añadió MA (3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate) (véase página 781, apartado 2.2.2.).

El documento D02 se refiere a un procedimiento para prevenir la pérdida de enzima lipasa inmovilizada sobre soportes mesoporosos de sílice (tales como SBA-15). Así, se trataron soportes mesoporosos de SBA-15 que presentaban inmovilizada la enzima lipasa pancreática porcina (PPL) con PMA (3- (trimethoxysilyl)-propylmethacrylate) y se comprobó que se producía una menor lixiviación de la enzima. (véase resumen y páginas 29-30).

El documento D03 trata sobre enzimas inmovilizadas en partículas poliméricas anfífilas que poseen cadenas de polímeros poli-iónicos. Se demostró que partículas poliméricas anfífilas funcionalizadas tanto con grupos guanidino hidrofílicos como con grupos acilo hidrofóbicos presentaban una gran cantidad de lipasa inmovilizada que conservaba una gran actividad en solventes orgánicos (véase resumen). Para ello se introdujeron cadenas poliméricas poli-iónicas que contenían grupos amino además de grupos anfífilos. Se sintetizaron partículas poliméricas acrílicas mediante la copolimerización de AMA (allyl methacrylate) y GMA (glycidyl methacrylate) (véase página 7).

El documento D04 describe la inmovilización de lipasa pancreática porcina sobre glicidil metacrilato (GMA) copolimerizado con alcohol de polivinilo (PVA) (véase resumen y páginas 55-56).

Ninguno de los documentos citados, solos o en combinación, revelan el biocatalizador mixto de la presente solicitud de patente. Además, en los documentos citados no existen sugerencias que dirijan al experto en la materia a la invención definida en las reivindicaciones 1-20. Por lo que las reivindicaciones 1-20 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo con los artículos 6 y 8 de la LP.