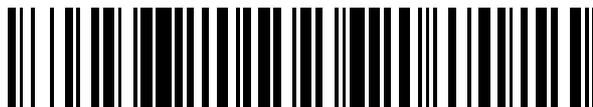


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 582**

21 Número de solicitud: 201531598

51 Int. Cl.:

C12P 7/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

06.11.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

05.02.2016

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.0%)
Edificio EMPRENDIA-Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**MOLDES DIZ, Yolanda;
EIBES GONZÁLEZ, Gemma;
ARCA RAMOS, Adriana;
VÁZQUEZ VÁZQUEZ, Carlos;
FONDADO FONDADO, Alfonso;
MIRA PÉREZ, Jorge;
LEMA RODICIO, Juan Manuel;
FEIJOO COSTA, Gumersindo y
MOREIRA VILAR, María Teresa**

74 Agente/Representante:

PARDO SECO, Fernando Rafael

54 Título: **PROCEDIMIENTO Y SISTEMA PARA REACCIONES DE SÍNTESIS QUÍMICA EN UN REACTOR CON ENZIMA INMOVILIZADA EN NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS Y UNIDAD DE SEPARACIÓN INTERNA**

57 Resumen:

Procedimiento y sistema para reacciones de síntesis química en un reactor con enzima inmovilizada en nanopartículas magnéticas y unidad de separación interna. La presente invención se refiere a un procedimiento y un sistema para aplicaciones de síntesis química utilizando enzimas oxidativas de tipo lacasa o peroxidasa inmovilizadas en nanopartículas magnéticas en un reactor enzimático discontinuo secuencial con separación magnética.

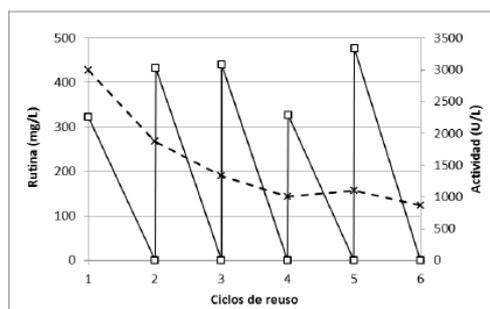


FIGURA 2

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y sistema para reacciones de síntesis química en un reactor con enzima inmovilizada en nanopartículas magnéticas y unidad de separación interna**5 SECTOR TÉCNICO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a un procedimiento y sistema con enzima inmovilizada sobre nanopartículas magnéticas para su aplicación en reacciones de síntesis química, tales como reacciones de acoplamiento oxidativo (tipo cruzado y homólogo), reacciones de oligomerización o polimerización y reacciones de "grafting".

ESTADO DE LA TÉCNICA

10 Las oxidorreductasas son una clase de enzimas que catalizan las reacciones de oxidación-reducción, es decir, catalizan la transferencia de electrones de una molécula (oxidante) a otra (reductor). Esta clase de enzimas ha sido objetivo de numerosos estudios en las últimas décadas, particularmente en el campo de la síntesis química, debido a su alta estabilidad, selectividad por subestructuras fenólicas y condiciones de reacción suaves (Witayakran S. et al., 2009; *Adv Synth Catal* 351:1187-1209).

15 Las enzimas oxidorreductasas se han empleado con éxito en la síntesis de nuevos antibióticos tales como penicilinas, cefalosporinas y derivados del carbacefem (Kudanga T. et al., 2011; *Enzyme Microb Technol* 48:195-208). También se han aplicado en la derivatización de aminoácidos que podrían ser utilizados en la formulación de fármacos o para el desarrollo de nuevos adhesivos y biomateriales (Mikolasch A. et al., 2009; *Appl Microbiol Biotechnol* 82:605-624). Por otro lado, estas enzimas pueden catalizar la producción o transformación de compuestos bioactivos, como por ejemplo, la polimerización de rutina y epicatequina (Desentis-Mendoza R.M. et al., 2006; *Biomacromolecules* 7: 1845-1854, Nagarajan S. et al., 2008; *Molecules* 13: 2704-2716). Otra de las aplicaciones es la síntesis enzimática de compuestos orgánicos como alternativa no tóxica a los actuales procesos químicos, tal como en la preparación enzimática de polifenoles poliméricos, en la polimerización de acrilamida o en la producción de poliestireno (Kunamneni N. et al., 2008; *Recent Pat Biotechnol* 2, 10-24, Nyanhongo G.S. et al., 2010; *Biocatalysis based on heme peroxidases*, pp: 156-159). Entre las oxidorreductasas se encuentran fundamentalmente dos tipos: peroxidasas, tales como, lignina peroxidasa (LiP), peroxidasa versátil (VP), peroxidasa de rábano (HRP) y manganeso peroxidasa (MnP) u oxidasas, tales como lacasa (Lac).

20 Las peroxidasas son hemo-proteínas que requieren la presencia de peróxido de hidrógeno como medio aceptor de electrones para llevar a cabo la oxidación de los sustratos. Presentan potenciales de oxidación de hasta 1,51 V. La enzima LiP (EC 1.11.1.13) se caracteriza por su alto potencial redox que permite la oxidación de compuestos aromáticos fenólicos y no fenólicos como el alcohol veratrílico (Camarero S. et al., 1999; *J Biol Chem* 274: 10324-10330). En el caso de MnP (EC 1.11.1.14), esta enzima oxida Mn^{2+} a Mn^{3+} , el cual actúa como agente difusible oxidando tanto unidades fenólicas como no fenólicas a través de la peroxidación de lípidos (Wariishi H. et al., 1988; *Biochemistry* 27: 5365-5370). La enzima VP (EC 1.11.1.16) presenta características comunes con MnP y LiP, ya que es capaz de oxidar el Mn^{2+} y también compuestos no fenólicos de alto potencial redox como el alcohol veratrílico (Wong D., 2009; *Appl Biochem Biotech* 157: 174-209). Finalmente, HRP (EC 1.11.1.7) permite la oxidación de sustratos como compuestos fenólicos y aminas aromáticas (Ben-Pei W. et al., 2014; *J Mol Catal B-Enzym* 101: 101-107).

30 En varios estudios se ha demostrado la capacidad de las peroxidasas para la síntesis de compuestos orgánicos. Como ejemplos se puede destacar la polimerización de 2,6-dimetilfenol utilizando la enzima HRP (Ikeda R. et al., 1996; *Macromolecules* 29:8702-8705). También se demostró que empleando HRP se conseguía la oligomerización de epicatequina y catequina mediante acoplamiento oxidativo, y que estos productos fueron eficaces en la inhibición del crecimiento de células cancerígenas (Nagarajan S. et al., 2008; *Molecules* 13: 2704-2716).

35 Lacasa (EC 1.10.3.2) es una enzima con actividad fenoloxidasa que contiene átomos de cobre en su centro activo y cataliza la oxidación de una amplia variedad de sustancias orgánicas, en un proceso acoplado a la reducción del oxígeno molecular a agua (Kunamneni A. et al., 2008; *Process Biochem* 43: 169-178). La amplia especificidad de sustrato, el empleo de oxígeno como aceptor de electrones, y la generación de agua como único subproducto de la reacción (Bourbonnais R. et al., 1990; *FEBS* 1: 99-102), confieren a la enzima alta aplicabilidad en diversos procesos biotecnológicos. A pesar de que presenta un potencial redox no superior a 0,8 V, inferior al de las peroxidasas ligninolíticas, la presencia de sustratos de bajo peso molecular, denominados mediadores, permite la oxidación indirecta de un amplio rango de compuestos fenólicos y no fenólicos (Cañas A. et al., 2010; *Biotechnol Adv* 28: 694-705).

40 La capacidad de lacasas como biocatalizador en la síntesis química ha quedado demostrada en un gran número de trabajos, tal como se muestra en los artículos de revisión de Witayakran (Witayakran S. et al., 2009; *Adv*

Synth Catal 351:1187-1209) y Kudanga (Kudanga T. et al., 2011; Enzyme Microb Technol 48:195-208). Como ejemplo, se puede señalar que Anthoni et al. (2010) emplearon lacasa de *Trametes versicolor* para producir oligómeros de esculina y mejorar así sus propiedades antioxidantes (Anthoni J. et al., 2010; Eur Food Res Technol 231:571-579). Mikolasch et al. (2006) emplearon lacasa de *Trametes spec.* para la síntesis de nuevas penicilinas por acoplamiento heteromolecular, obteniéndose compuestos con altas actividades biológicas (Mikolasch A. et al., 2006; Chem. Pharm. Bull. 54: 632-638).

Por razones técnicas y económicas, en la mayoría de los procesos catalizados por enzimas es necesario reutilizar o emplear de manera continua el biocatalizador, por lo que el empleo de enzima libre no resulta viable (Katchalski-Katzir E. et al., 2000; J Mol Catal B-Enzym 10: 157-176). En este contexto, la inmovilización de enzimas puede ser considerada una alternativa.

La inmovilización de enzimas sobre soportes sólidos ofrece numerosas ventajas sobre el uso de enzima libre, ya que la separación de la enzima inmovilizada de la mezcla de reacción mediante métodos físicos, tales como filtración o sedimentación (centrifugación) es simple, y pueden ser utilizadas en repetidas ocasiones.

Entre los soportes, el empleo de nanopartículas magnéticas proporciona una serie de ventajas tales como elevada área superficial, carga potencial de enzima alta, minimización de problemas de difusión y recuperación fácil y rápida del biocatalizador del medio de reacción aplicando un campo magnético externo. De este modo, las enzimas se someten a una tensión mecánica mucho menor comparándolo con la centrifugación y sedimentación.

En varios estudios recientes se ha demostrado que es posible la inmovilización de las enzimas sobre diferentes tipos de nanopartículas magnéticas con resultados satisfactorios. Como ejemplo, se puede destacar que Zimmermann et al. (2011) llevaron a cabo la inmovilización de lacasa *Coriopsis polyzona* sobre nanopartículas magnéticas recubiertas de sílice (Zimmermann Y. et al., 2011; Appl Microbiol Biot 92: 169-178). Kalkan et al. (2012) emplearon nanopartículas magnéticas recubiertas de quitosano para llevar a cabo la inmovilización de lacasa de *Trametes versicolor* (Kalkan N. et al., 2012; J Appl Polym Sci 123: 707-716). También se ha demostrado la inmovilización de HRP sobre nanopartículas magnéticas (Corgié S. et al., 2012; Adv Funct Mater 22: 1940-1951).

Estos resultados pueden considerarse el punto de partida para el desarrollo de reactores enzimáticos magnéticos. Sin embargo, la bibliografía disponible sobre configuraciones de reactores magnéticos es muy limitada. A continuación, se detallan algunas alternativas.

En investigaciones recientes se han empleado reactores enzimáticos magnéticos, como es el caso de Wang et al. (2012) que diseñaron un reactor de lecho fluidizado estabilizado magnéticamente (Wang F. et al., 2012; Bioresource Technol 110: 120-124), o Duan et al. (2014) en el cual el reactor cuenta con un sistema de electroimanes donde tiene lugar la reacción (Duan X. et al., 2014; ChemPhysChem 15: 974-980), ambos para la polimerización de fenol en agua residual. Estos dos reactores presentan la desventaja de que es necesario tenerlos conectados a una fuente de alimentación de corriente eléctrica, con los inconvenientes que esto conlleva (consumo eléctrico, temperaturas elevadas...). Ardao et al. (2013) presentaron también una configuración de reactor en continuo para la transformación de microcontaminantes en el cual el sistema de separación era un imán en la corriente de salida que recoge las nanopartículas y mediante un sistema de válvulas se invierte el flujo devolviendo las nanopartículas al reactor (Ardao I. et al., 2013; Proceedings of the 2nd European Symposium of Water Technology and Management, Belgium).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Teniendo en cuenta las limitaciones de los reactores descritos en el estado de la técnica, el empleo de un sistema de separación magnético interno constituye una alternativa a estos reactores, alternativa que no depende de conexión del electroimán a la corriente eléctrica ni válvulas para invertir el flujo.

En un aspecto la presente invención se refiere a un procedimiento para aplicaciones de síntesis química utilizando enzima inmovilizada en nanopartículas magnéticas en un reactor enzimático con separación magnética.

El procedimiento de síntesis química comprende las etapas de:

- a) acondicionamiento de la/s corriente/s de entrada que contiene el/los sustrato/s;
- b) bombeo de la corriente de entrada hacia una vasija de reacción que contiene la enzima inmovilizada en soportes magnéticos;
- c) reacción del sustrato (o sustratos) con enzima inmovilizada;
- d) control de la actividad enzimática;

- e) retención de la enzima inmovilizada mediante un campo magnético externo;
- f) descarga de los productos de reacción;
- g) separación del campo magnético externo; y
- h) bombeo de la/s corriente/s de entrada a la vasija de reacción.

5 El acondicionamiento del sustrato (o sustratos) comprende la preparación de los reactantes y sus condiciones ambientales con el fin de maximizar la eficacia de la reacción manteniendo la estabilidad de la enzima. Este acondicionamiento puede comprender una o varias de las siguientes etapas: la disolución del sustrato (o sustratos) en medio acuoso; la adición de un disolvente o tensioactivo para incrementar la solubilidad de los sustratos; el ajuste del pH al valor óptimo de cada reacción; la adición de un mediador enzimático para facilitar la
10 reacción.

15 Cuando se utilice como enzima inmovilizada una enzima de tipo peroxidasa, su actividad está comprendida en el rango 50-1000 U/L. En el caso de que la enzima sea LiP su actividad se determina mediante el ensayo descrito por Tien y Kirk (Tien M. y Kirk T.K., 1984; *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 2280-2284); en el caso de que la enzima sea MnP o VP la medida de su actividad se lleva a cabo mediante el ensayo descrito por Taboada-Puig et al. (Taboada-Puig R. et al., 2011; *Biotechnol Prog* 27: 668-676) y la medida de la actividad HRP se realiza de acuerdo al procedimiento descrito por Bindhu et al. (Bindhu L. et al., 2002; *J Appl Polym Sci* 88: 1456-1464). Si se utiliza como enzima inmovilizada una enzima de tipo lacasa, la actividad enzimática está comprendida en el rango 100-3500 U/L, en este caso la medida se realiza de acuerdo al protocolo de medida detallado en la bibliografía (Zimmermann Y. et al., 2011; *Appl Microbiol Biotechnol* 92: 169-178). La temperatura de operación en el reactor debe estar en el rango 10-40°C, preferentemente 25°C y el pH debe estar comprendido entre 3-8; preferentemente pH 4,5 en el caso de que la enzima inmovilizada sea de tipo peroxidasa; y pH preferentemente comprendido en el rango 5-7, en el caso de que la enzima inmovilizada sea de tipo lacasa.
20

El control de la actividad enzimática comprende:

- a) medir la actividad enzimática en la vasija de reacción; y
- 25 b) si la actividad enzimática en la vasija es menor que un valor mínimo, se regeneran los soportes para proceder de nuevo a la inmovilización de enzima fresca.

30 En la vasija de reacción se encuentra la enzima inmovilizada en soporte, en una realización el soporte comprende nanopartículas magnéticas. En una realización particular de la invención los soportes comprenden nanopartículas magnéticas, la regeneración de dichas nanopartículas magnéticas se realiza según el procedimiento descrito por Zhao et al. (Zhao G. et al., 2011; *J Phys chem* 115: 6350-6359) para la posterior inmovilización de las enzimas siguiendo el procedimiento de Zimmermann et al. (Zimmermann Y. et al., 2011; *Appl Microbiol Biotechnol* 92: 169-178).

35 En una realización particular del procedimiento las nanopartículas magnéticas empleadas para la inmovilización de la enzima comprenden nanopartículas magnéticas con un tamaño comprendido en el rango 4-24 nm, y recubiertas con una capa de polietilimina de grosor comprendida en el rango 0,5-2 nm. Las nanopartículas magnéticas comprenden óxido de hierro magnético (magnetita o maghemita) de diámetro en el rango de 3-20 nm y que presentan propiedades superparamagnéticas.

40 En el caso de utilizar una enzima de tipo peroxidasa se adiciona peróxido de hidrógeno al reactor a una velocidad comprendida en el rango 5-100 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$. En el caso de que la enzima utilizada sea una peroxidasa, el sistema además se añaden los cofactores necesarios para completar el ciclo catalítico, cuando la enzima utilizada es LiP se incorpora alcohol veratrílico, a una velocidad comprendida en el rango 0,5-1000 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$; y cuando la enzima utilizada es MnP o VP se añade Mn^{2+} a una velocidad comprendida en el rango 0,5-100 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$.

45 Si la enzima peroxidasa es manganeso peroxidasa (MnP) o peroxidasa versátil (VP) además se añade en continuo ácido orgánico dicarboxílico, tal como ácido malónico u oxálico, a una velocidad de 1-100 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$. En otro aspecto de la invención el/los sustrato/s en contacto con la enzima inmovilizada está durante un tiempo de reacción prefijado, dependiendo de cada reacción particular.

El procedimiento además comprende medir la concentración de oxígeno disuelto en la vasija de reacción cuando la enzima utilizada es de tipo lacasa.

50 En otro aspecto de la invención, tras el periodo de reacción, la enzima inmovilizada es retenida por un campo magnético externo introducido en la vasija de reacción (reactor) y se procede a la descarga de los productos,

tomando una muestra para determinar la concentración de productos obtenidos tras el tratamiento enzimático en el reactor. En el caso de que la concentración no sea la deseada, se incrementa el tiempo de reacción.

En otro aspecto, la invención se refiere a un sistema para aplicación en reacciones de síntesis química empleando enzima inmovilizada (peroxidasa o lacasa) en nanopartículas magnéticas, En un aspecto de la invención el sistema comprende un reactor discontinuo secuencial basado en un reactor con enzima inmovilizada en nanopartículas magnéticas con un sistema de separación magnética que se acopla al reactor en la etapa de recuperación de la enzima. El sistema de síntesis química objeto de la presente invención comprende:

- 5 a) un sistema de acondicionamiento de reactivos;
- b) un primer sistema de bombeo;
- 10 c) una vasija de reacción o reactor que comprende una solución de enzima inmovilizada en soportes magnéticos;
- d) un sistema de agitación;
- e) un sistema de control de actividad enzimática de la solución contenida en la vasija de reacción;
- f) un sistema de separación magnética;
- 15 g) un segundo sistema de bombeo; y
- h) un sistema de medida de productos en la vasija de reacción enzimática y en la salida del reactor.

El sistema de acondicionamiento comprende una vasija donde se disuelve el sustrato (o sustratos) en medio acuoso y se adicionan las sustancias requeridas en la reacción enzimática tales como disolvente, tensioactivo, tampón, y/o mediador.

- 20 El primer sistema de bombeo bombea la corriente de entrada (sustrato) desde el sistema de acondicionamiento hacia la vasija de reacción.

En una realización particular la vasija de reacción o reactor comprende un reactor de tanque agitado. En una realización más particular el reactor de tanque agitado comprende un agitador de 4 palas, recubierto de Teflon para evitar problemas de adsorción de las nanopartículas y de los compuestos objetivo.

- 25 En una realización particular los soportes empleados para la inmovilización de la enzima comprenden nanopartículas magnéticas recubiertas de polietilenimina con un tamaño comprendido en el rango 4-24 nm, y con una capa de polietilenimina con un espesor comprendido en el rango 0,5-2 nm. Las nanopartículas magnéticas comprenden óxido de hierro magnético (magnetita o maghemita) de diámetro comprendido en el rango de 3 a 20 nm y presentan propiedades superparamagnéticas.

- 30 El sistema de control de actividad enzimática comprende:

- a) un sensor de actividad enzimática;
- b) un sistema de regeneración de soportes y posterior inmovilización de enzima.

La temperatura de operación del reactor está comprendida en el rango de 10-40°C, preferentemente 25°C; y el pH debe estar comprendido entre 3-8; preferentemente pH 4,5 en el caso de que la enzima inmovilizada sea de tipo peroxidasa y pH en el rango 6-7 en el caso de que la enzima inmovilizada sea de tipo lacasa.

- 35

En el caso de que la enzima inmovilizada sea de tipo peroxidasa, el sistema de síntesis química además comprende un sistema de adición en continuo de peróxido de hidrógeno, el cual se añade a una velocidad comprendida en el rango 5-100 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$. El sistema además comprende un sistema de adición en continuo de ácido orgánico dicarboxílico cuando la enzima utilizada es manganeso peroxidasa, el cual se añade con una velocidad comprendida en el rango 1-100 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$. En el caso de que la enzima utilizada sea una peroxidasa, el sistema además comprende un sistema de adición de cofactores necesarios para completar el ciclo catalítico, dicho sistema de adición incorpora alcohol veratrílico, cuando la enzima utilizada es LiP, a una velocidad comprendida en el rango 0,5-1000 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$, y Mn^{2+} si la enzima utilizada es una enzima del tipo MnP o VP, a una velocidad comprendida en el rango 0,5-100 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$.

- 40

- 45 En el caso de que la enzima utilizada sea lacasa, la vasija de reacción además comprende un sistema de control de oxígeno disuelto en la mezcla efluente y enzima inmovilizada que comprende un sensor de medida de la concentración de oxígeno disuelto.

5 En una realización particular de la invención el sistema de separación magnética externa comprende una o varias varillas magnéticas formadas por imanes permanentes alineados y montados con polaridad alternada, de manera que los polos del mismo signo de imanes contiguos se encuentren enfrentados. En las proximidades de los polos el campo magnético es no homogéneo y las partículas son atraídas a la región de campo más intenso, que son las más próximas a los polos.

10 En una realización particular se usan imanes toroidales de neodimio-hierro-boro con polarización axial mantenidos juntos por medio de una varilla interior no magnética con topes seguros en los extremos. Las nanopartículas magnéticas se retienen en la pared exterior de fundas cilíndricas no magnéticas y de pared suficientemente estrecha insertadas en la vasija y abiertas al exterior, en las cuales se introducen las varillas magnéticas. Al retirar las varillas, las nanopartículas quedan libres y son arrastradas por el sistema de agitación.

El segundo sistema de bombeo bombea la corriente con los productos fuera del reactor. El sistema de medida toma muestras de la corriente de entrada al reactor y de la corriente de salida para determinar la concentración de sustratos y productos tras el tratamiento enzimático en el reactor.

15 En otro aspecto, la invención se refiere al uso del método y sistema anteriormente descritos para el empleo de enzima inmovilizada en nanopartículas magnéticas en aplicaciones de síntesis química.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las modalidades detalladas en las figuras se ilustran a modo de ejemplo y no a modo de limitación:

20 La **Figura 1** muestra un diagrama esquemático del sistema de reactor enzimático secuencial con varilla magnética y su aplicación en la síntesis química. La corriente de entrada con el sustrato (o sustratos) entra al reactor donde se encuentra la enzima inmovilizada en nanopartículas magnéticas (Etapa I). Se deja reaccionar durante el tiempo de operación necesario en cada caso particular (Etapa II). Tras la etapa de reacción se introduce la varilla magnética y se retiene la enzima inmovilizada en nanopartículas magnéticas sobre la funda de la varilla magnética (Etapa III). La corriente de salida del reactor se bombea obteniéndose el producto (o productos) deseados (Etapa IV). Por último, se retira la varilla magnética y se empieza un nuevo ciclo adicionando una nueva corriente de entrada con el sustrato (o sustratos).

25 La **Figura 2** muestra los Ciclos de reuso de lacasa inmovilizada en nanopartículas magnéticas en el sistema de reactor enzimático secuencial con varilla magnética. En la figura se muestra la transformación completa del sustrato, en este caso el flavonoide rutina, en cada uno de los cinco ciclos de reuso. También se muestra el perfil de la actividad enzimática del biocatalizador inmovilizado a lo largo de la operación secuencial.

30 La **Figura 3** muestra el espectro MALDI-TOF en el modo reflector de los productos de oligomerización de rutina tras el primer ciclo de reacción enzimática. Se señala con flechas los picos correspondientes al dímero y trímero de rutina ($[M+Na]^+$).

EJEMPLO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

35 El procedimiento anteriormente descrito se aplicó para la producción de oligómeros del flavonoide rutina mediante lacasa inmovilizada en nanopartículas magnéticas en un reactor discontinuo secuencial (SBR). El volumen útil del reactor fue de 10 mL con una varilla magnética acoplada con el objetivo de retener la enzima, y así poder reutilizarla de acuerdo al esquema recogido en la Figura 1. La concentración inicial de enzima fue de 3000 U/L, la concentración de rutina en el medio de reacción fue de 0,5 g/L, con un 30% de etanol y tampón acetato (pH 5). Las condiciones de operación se detallan a continuación: temperatura, 30°C; agitación, 150 rpm; 40 ciclos de 24 h (excepto el ciclo 5 que fue de 66 h).

45 La conversión de rutina se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La actividad de enzima se determinó espectrofotométricamente. Los resultados muestran que al final de cada ciclo la transformación del sustrato fue total (Figura 2). La actividad enzimática sufrió una inactivación del 65% en los tres primeros ciclos, tras la cual se estabilizó en valores de actividad en torno a 1000 U/L. Mediante análisis MALDI-TOF en el modo reflector se confirmó la presencia de dímeros y trímeros ($[M+Na]^+$) como productos de transformación de la rutina (Figura 3).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de síntesis química utilizando enzima inmovilizada caracterizado porque comprende las etapas:
 - a. acondicionamiento de la corriente de entrada que contiene el/los sustrato/s;
 - b. bombeo de la corriente de entrada hacia una vasija de reacción que contiene la enzima con soportes magnéticos que inmovilizan la enzima;
 - c. reacción del sustrato con la enzima inmovilizada;
 - d. control de la actividad enzimática;
 - e. retención de la enzima inmovilizada aplicando un campo magnético externo;
 - f. descarga de los productos de la vasija de reacción;
 - g. separación del campo magnético externo; y
 - h. bombeo de la corriente de entrada a la vasija de reacción
2. El procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado porque el acondicionamiento comprende la disolución del sustrato o sustratos en medio acuoso y la adición de los componentes requeridos para completar la reacción enzimática según cada aplicación.
3. El procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado porque la enzima inmovilizada se selecciona entre peroxidasa o lacasa.
4. El procedimiento, según la reivindicación 3, caracterizado porque la actividad de la enzima peroxidasa inmovilizada se encuentre comprendida en el rango 50-1000 U L⁻¹.
5. El procedimiento, según la reivindicación 3, caracterizado por que la actividad de la enzima lacasa inmovilizada se encuentra comprendida en el rango 100-3500 U L⁻¹.
6. El procedimiento, según las reivindicaciones 1 y 3 a 5, caracterizado porque la temperatura de operación de la vasija está comprendida en el rango de 10 a 40°C.
7. El procedimiento, según las reivindicaciones 1 y 3 a 5, caracterizado porque el pH de la mezcla sustrato y enzima inmovilizada en la vasija de reacción está comprendida en el rango 3 a 8.
8. El procedimiento, según las reivindicaciones 1 y 3 a 7, caracterizado porque el control de la actividad enzimática comprende:
 - a. medir la actividad enzimática en la vasija de reacción;
 - b. si la actividad enzimática en la vasija es menor que un valor mínimo regenerar los soportes y volver a inmovilizar enzima para añadir a la vasija de reacción;
9. El procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 8, caracterizado por que si la enzima utilizada es una enzima del tipo peroxidasa se añade peróxido de hidrógeno en continuo a la vasija de reacción.
10. El procedimiento, según la reivindicación 9, caracterizado porque el peróxido de hidrógeno se añade a una velocidad comprendida entre 5 y 100 µmol/L·min.
11. El procedimiento, según las reivindicaciones 1 y 3 a 10, caracterizado porque si la enzima utilizada es Manganese Peroxidasa (MnP) o Peroxidasa Versátil (VP) se añade un ácido orgánico dicarboxílico en continuo de forma adicional.
12. El procedimiento, según la reivindicación 11, caracterizado porque el ácido orgánico dicarboxílico se añade con una velocidad comprendida entre 1 y 100 µmol/L·min.
13. El procedimiento, según las reivindicaciones 1 y 3 a 10, caracterizado porque además se añade a la vasija de reacción el cofactor necesario para completar el ciclo catalítico de la peroxidasa.
14. El procedimiento, según la reivindicación 13, caracterizado porque el cofactor es alcohol veratrílico en el caso de que la enzima utilizada sea una peroxidasa del tipo Lignina Peroxidasa (LiP).
15. El procedimiento, según la reivindicación 14, caracterizado porque el alcohol veratrílico se introduce a una velocidad comprendida en el rango 0,5-1000 µmol/L·min.

16. El procedimiento, según la reivindicación 13, caracterizado porque el cofactor comprende el ión Mn^{2+} en el caso de que la enzima utilizada sea peroxidasa del tipo MnP o del tipo VP.
- 5 17. El procedimiento, según la reivindicación 16, caracterizado porque el ion Mn^{2+} se introduce a una velocidad comprendida en el rango 0,5-100 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$.
18. El procedimiento, según las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque además comprende medir la concentración de oxígeno disuelto en la vasija de reacción cuando la enzima utilizada es de tipo lacasa.
- 10 19. El procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque se mide la concentración de sustrato y productos en la corriente de entrada y de salida del reactor.
20. El procedimiento según la reivindicación 19, caracterizado porque si la concentración de productos en la corriente de salida no es la deseada, se incrementa el tiempo de reacción del efluente con la enzima inmovilizada y dicha corriente de salida se recircula a la entrada para volver a ser tratada.
- 15 21. El procedimiento, según la reivindicación 1 y 8, caracterizado porque los soportes comprenden nanopartículas magnéticas recubiertas de polietilenimina.
- 20 22. El procedimiento, según la reivindicación 21, caracterizado porque el tamaño de las nanopartículas recubiertas de polietilenimina está comprendido en el rango 4-24 nm, estando la capa de polietilenimina comprendida en el rango 0,5 – 2 nm.
- 25 23. El procedimiento, según las reivindicaciones 21 y 22, caracterizado porque las nanopartículas magnéticas comprenden óxido de hierro magnético que se selecciona de entre magnetita o maghemita, de diámetro 3-20 nm y que presentan propiedades superparamagnéticas.
- 30 24. Un sistema para el empleo de enzima inmovilizada en nanopartículas magnéticas, en diversas aplicaciones, que comprende un reactor discontinuo secuencial:
- 35 a. un sistema de acondicionamiento;
- b. un primer sistema de bombeo;
- c. una vasija de reacción o reactor que comprende una solución de enzima en un soporte magnético que inmoviliza dicha enzima;
- 40 d. un sistema de agitación;
- e. un sistema de control de actividad enzimática de la solución contenida en la vasija de reacción;
- f. un sistema de separación magnética externo;
- g. un segundo sistema de bombeo;
- h. un sistema de medida de productos en la vasija de reacción enzimática y en la salida del reactor.
- 45 25. El sistema, según la reivindicación 24, caracterizado porque el sistema de acondicionamiento comprende una vasija donde se disuelve el sustrato (o sustratos) y se adicionan los componentes necesarios para completar la reacción enzimática.
- 50 26. El sistema, según la reivindicación 24, caracterizado porque el primer sistema de bombeo bombea el efluente desde el sistema de pretratamiento hacia la vasija de reacción.
- 55 27. El sistema, según la reivindicación 24, caracterizado por que la vasija de reacción comprende un reactor de tanque agitado.
28. El sistema, según reivindicación 24, caracterizado por que el sistema de agitación comprende un agitador de 4 palas, recubierto de Teflón para evitar problemas de adsorción de las nanopartículas y de los compuestos.
- 60 29. El sistema, según la reivindicación 24, caracterizado porque la enzima inmovilizada se selecciona de entre peroxidasa y lacasa.
30. El sistema, según la reivindicación 24, caracterizado porque el sistema de control de actividad enzimática comprende:
- a. un sensor de actividad enzimática; y
- b. un sistema de regeneración de soportes y posterior inmovilización de enzima

- 5 31. El sistema, según las reivindicaciones 24 y 27 a 30, caracterizado porque la temperatura de operación de la vasija está comprendida en el rango de 10 a 40°C.
- 10 32. El sistema, según las reivindicaciones 24 y 27 a 30, caracterizado porque el pH de la mezcla efluente y enzima inmovilizada en la vasija de reacción está comprendida en el rango 3 a 8.
- 15 33. El sistema, según cualquiera de las reivindicaciones 24 y 27 a 32, caracterizado por que si la enzima utilizada es una enzima del tipo peroxidasa además comprende un sistema de adición de peróxido de hidrógeno en continuo en la vasija de reacción.
- 20 34. El sistema, según la reivindicación 33, caracterizado porque el sistema de adición de peróxido de hidrógeno añade peróxido de hidrógeno a una velocidad comprendida entre 5 y 100 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$.
- 25 35. El sistema, según la reivindicación 33, caracterizado porque la vasija de reacción comprende además un sistema de adición en continuo de ácido orgánico dicarboxílico cuando la enzima utilizada es MnP o VP.
- 30 36. El sistema, según la reivindicación 35, caracterizado porque el sistema de adición de ácido orgánico dicarboxílico añade ácido dicarboxílico con una velocidad comprendida en el rango 1 y 100 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$.
- 35 37. El sistema, según la reivindicación 24, caracterizado porque la vasija de reacción además comprende un sistema de adición del cofactor necesario para completar el ciclo catalítico de la peroxidasa.
- 40 38. El sistema, según la reivindicación 37, caracterizado por que el cofactor comprende alcohol veratrílico si la enzima utilizada es una peroxidasa del tipo LiP.
- 45 39. El sistema, según la reivindicación 38, caracterizado porque el sistema de adición del cofactor añade alcohol veratrílico a una velocidad comprendida en el rango 0,5-1000 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$.
- 50 40. El sistema, según la reivindicación 37, caracterizado porque el cofactor comprende Mn^{2+} si la enzima utilizada es una peroxidasa del tipo MnP o del tipo VP.
- 55 41. El sistema, según la reivindicación 40, caracterizado porque el sistema de adición del cofactor añade Mn^{2+} a una velocidad comprendida en el rango 0,5-100 $\mu\text{mol/L}\cdot\text{min}$.
- 60 42. El sistema según las reivindicaciones 24 a 32, caracterizado porque la vasija de reacción comprende además un sistema de control de oxígeno disuelto en la mezcla de reacción en el caso de que la enzima utilizada sea lacasa.
43. El sistema, según la reivindicación 24, caracterizado porque el sistema de separación magnética externa comprende una o varias varillas magnéticas formadas por imanes permanentes alineados y montados con polaridades alternadas, que se introducen durante la fase de retención en fundas no magnéticas colocadas en la vasija de reacción.
44. El sistema, según la reivindicación 24, caracterizado porque el segundo sistema de bombeo bombea los productos tras el tratamiento enzimático en el reactor.
45. El sistema, según la reivindicación 24, caracterizado porque los soportes comprenden nanopartículas magnéticas recubiertas de polietilenimina.
46. El sistema, según la reivindicación 45, caracterizado porque el tamaño de las nanopartículas recubiertas de polietilenimina está comprendido en el rango 4-24 nm, estando la capa de polietilenimina comprendida en el rango 0,5 – 2 nm de espesor.
47. El sistema, según las reivindicaciones 45 y 46 caracterizado porque las nanopartículas magnéticas comprenden óxido de hierro magnético que se selecciona de entre magnetita o maghemita, de diámetro 3-20 nm y que presentan propiedades superparamagnéticas.
48. Uso del método, según las reivindicaciones 1 a 23, y del sistema, según reivindicaciones, 24 a 47, aplicaciones de síntesis química.

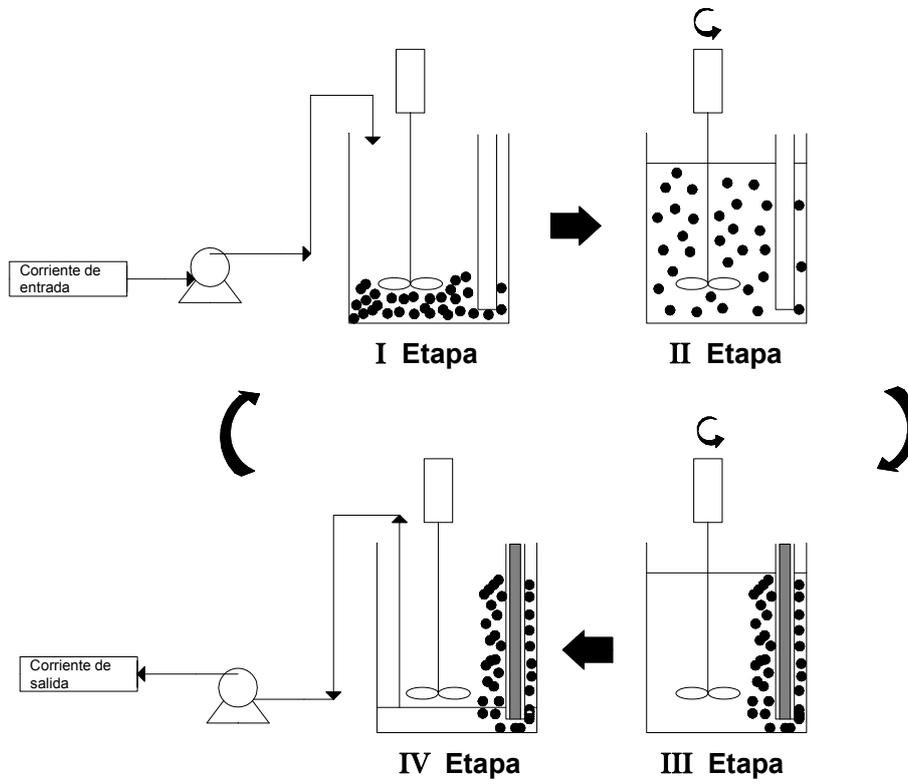


FIGURA 1

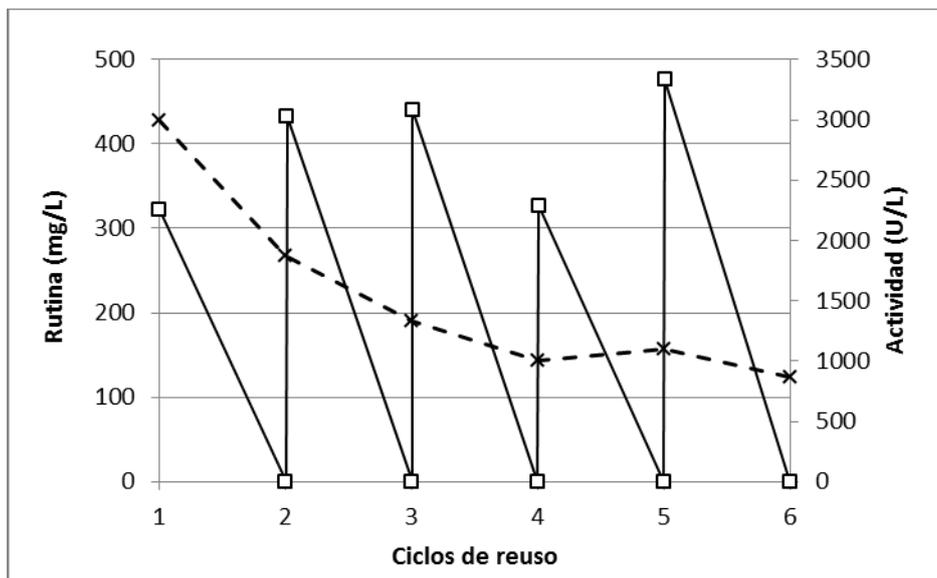


FIGURA 2

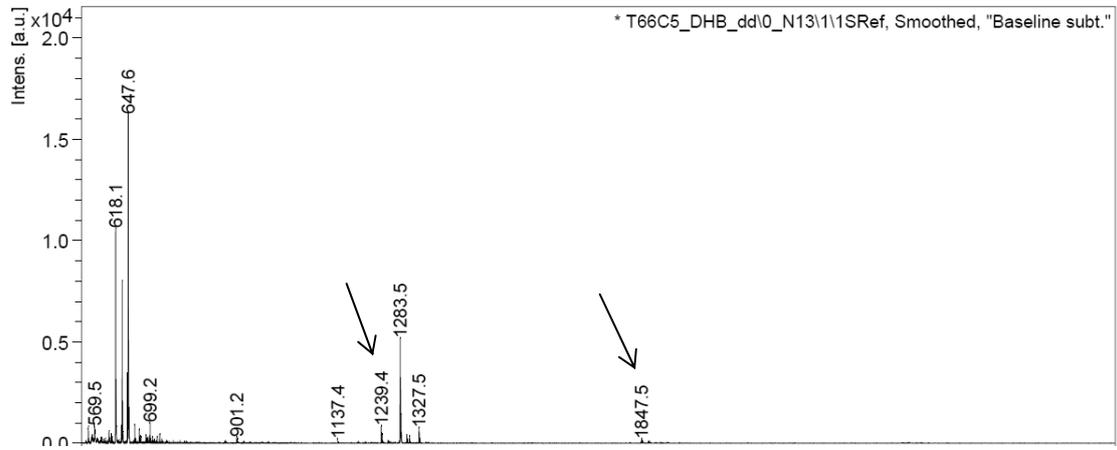


FIGURA 3



②① N.º solicitud: 201531598

②② Fecha de presentación de la solicitud: 06.11.2015

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12P7/00** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	JIAN-FU LIU et al. "Reversible immobilization of <i>K. fragilis</i> beta-galactosidase onto magnetic polyethylenimine-grafted nanospheres for synthesis of galacto-oligosaccharide." JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS. B, ENZYMATIC, 20120602 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 02/06/2012 VOL: 82 Pags: 64 - 70 ISSN 1381-1177 Doi: doi:10.1016/j.molcatb.2012.06.001; todo el documento.	1-48
A	BAYRAMOGLU G et al. "Preparation of nanofibrous polymer grafted magnetic poly(GMA-MMA)-g-MAA beads for immobilization of trypsin via adsorption" BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL, 20080601 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01/06/2008 VOL: 40 No: 2 Pags: 262 - 274 ISSN 1369-703X Doi: doi:10.1016/j.bej.2007.12.013 Chen Wilfred; Bentley William E; todo el documento.	1-48
A	YAVUZ C T et al. "Magnetic separations: From steel plants to biotechnology." CHEMICAL ENGINEERING SCIENCE, 20090515 OXFORD, GB 15/05/2009 VOL: 64 No: 10 Pags: 2510 - 2521 ISSN 0009-2509 Doi: doi:10.1016/j.ces.2008.11.018; todo el documento.	1-48

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
27.01.2016

Examinador
M. d. García Coca

Página
1/4

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

C12P

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, BIOSIS, EMBASE/Elsevier, MEDLINE/NLM, Compendex/EI, XPESP y Bases de Datos de Texto Completo TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.01.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-48	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-48	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	JIAN-FU LIU et al. "Reversible immobilization of <i>K. fragilis</i> beta-galactosidase onto magnetic polyethylenimine-grafted nanospheres for synthesis of galacto-oligosaccharide" JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS. B, ENZYMATICA, 20120602 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 02/06/2012 VOL: 82 Pags: 64 - 70 ISSN 1381-1177 Doi: doi:10.1016/j.molcatb.2012.06.001.	02.06.2012
D02	BAYRAMOGLU G et al. "Preparation of nanofibrous polymer grafted magnetic poly(GMA-MMA)-g-MAA beads for immobilization of trypsin via adsorption" BIOCHEMICAL ENGINEERING JOURNAL, 20080601 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL 01/06/2008 VOL: 40 No: 2 Pags: 262 - 274 ISSN 1369-703X Doi: doi:10.1016/j.bej.2007.12.013 Chen Wilfred; Bentley William E.	01.06.2008
D03	YAVUZ C T et al. "Magnetic separations: From steel plants to biotechnology." CHEMICAL ENGINEERING SCIENCE, 20090515 OXFORD, GB 15/05/2009 VOL: 64 No: 10 Pags: 2510 - 2521 ISSN 0009-2509 Doi: doi:10.1016/j.ces.2008.11.018.	15.05.2009

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

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-48, es un procedimiento de síntesis química utilizando una enzima inmovilizada en soportes magnéticos (reiv. 1-23), el sistema que comprende un reactor discontinuo secuencial para la realización del procedimiento de la invención (reiv. 24-47) y el uso tanto del procedimiento como del sistema para aplicaciones de síntesis química (reiv. 48).

Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes) y Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).

El documento D01 divulga soportes magnéticos para la inmovilización de enzimas, como la beta-galactosidasa de *K. fragilis*, para la síntesis de galacto-oligosacáridos (GOS). En este documento se describe la actividad de la enzima inmovilizada en soportes magnéticos (nanopartículas de magnetita cubiertas de polietilenoimina) dentro de un reactor enzimático discontinuo, donde las condiciones de la reacción son pH6.5 con una temperatura de 30°C. Para comprobar la actividad de la enzima, se realizaron 15 ciclos de reacción consecutivos reutilizando dicha enzima inmovilizada. Para la reutilización de la enzima, se aplica un campo magnético externo para la separación de la enzima inmovilizada y posteriormente se lava antes de quedar lista para el siguiente ciclo de reacción.

El documento D02 divulga la inmovilización de tripsina en pequeñas esferas magnéticas de magnetita (de 75 a 150 µm). La tripsina inmovilizada se introduce en el medio de reacción una vez que el sustrato se ha preincubado. Una vez terminada la reacción, la suspensión se centrifuga y se recoge el sobrenadante que contiene el producto de la reacción. Los soportes magnéticos pueden ser separados mediante un imán permanente convencional.

El documento D03 divulga distintos tipos de materiales magnéticos y distintos métodos de separación magnética utilizados en distintas industrias.

Aunque en los documentos citados del estado de la técnica se indica que, para separar la enzima inmovilizada en los soportes magnéticos de los productos de reacción, se emplean campos magnéticos externos, en ninguno de los documentos se describe un sistema de retención del enzima como el de la invención, que permite extraer únicamente los productos de la reacción sin tener que extraer también la enzima inmovilizada para su posterior separación.

Por lo tanto, ninguno de los documentos del estado de la técnica anterior a la solicitud, tomados solos o en combinación revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-48. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en las reivindicaciones 1-48. Así, la invención contenida en las reivindicaciones 1-48 es con referencia a los documentos D01-D03 nueva y se considera que implica actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).