

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 695 327**

21 Número de solicitud: 201730855

51 Int. Cl.:

**C12N 11/14** (2006.01)

**C12P 7/64** (2006.01)

**C12N 9/18** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**28.06.2017**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**03.01.2019**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)  
C/ Serrano, nº 117  
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**PRIETO ORZANCO, Alicia M<sup>a</sup>;  
MOLINA GUTIÉRREZ, María;  
MARTÍNEZ FERRER, Ángel T. y  
MARTÍNEZ HERNÁNDEZ, M<sup>a</sup> Jesús**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **SÍNTESIS DE BIODIESEL CATALIZADA POR UN CRUDO ENZIMÁTICO INMOVILIZADO  
SOBRE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS**

57 Resumen:

Síntesis de biodiesel catalizada por un crudo enzimático inmovilizado sobre partículas magnéticas. La presente invención se refiere a un procedimiento para la síntesis enzimática de ésteres de alquilo de ácidos grasos de cadena larga en presencia de un alcohol y de una preparación enzimática que comprende una esteroil esterasa/lipasa inmovilizada covalentemente sobre partículas magnéticas funcionalizadas en su superficie. La inmovilización de la lipasa versátil mediante el procedimiento descrito es capaz de incrementar el rendimiento del proceso de síntesis de ésteres de alquilo, así como de permitir una recuperación del catalizador para futuras reacciones, sencilla y eficiente, sin que la actividad y velocidad de la esteroil esterasa/lipasa se vea disminuida notablemente a lo largo de al menos 10 ciclos de reacción consecutivos.

ES 2 695 327 A1

## DESCRIPCIÓN

### SÍNTESIS DE BIODIESEL CATALIZADA POR UN CRUDO ENZIMÁTICO INMOVILIZADO SOBRE PARTÍCULAS MAGNÉTICAS

5

La presente invención se refiere a un procedimiento para la síntesis enzimática de ésteres metílicos de ácidos grasos de cadena larga, para su uso, preferentemente como biocombustible, a partir de un alcohol de cadena corta, preferentemente metanol como sustrato, y donde la enzima, preferentemente una glicoproteína, se encuentra inmovilizada mediante la unión covalente de sus cadenas glucídicas a partículas magnéticas amino-funcionalizadas.

10

#### ESTADO DE LA TÉCNICA

15

El biodiesel es un biocombustible compuesto por mezclas de ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga derivados de fuentes renovables. La síntesis industrial de estos compuestos se realiza mediante esterificación o transesterificación de los ácidos grasos, mono-, di-, y triglicéridos presentes en aceites vegetales o grasas, empleando generalmente residuos lipídicos para su reciclado, como aceites de fritura o aceites no comestibles. La reacción entre los lípidos y un alcohol de cadena corta (C1 a C6) puede estar mediada por catalizadores químicos (bases, ácidos, catalizadores heterogéneos) o por enzimas.

20

25

La síntesis de biodiesel mediante catálisis química es rápida y muy productiva, además de ser los catalizadores muy baratos, aunque no todo son ventajas en este tipo de reacciones. Las temperaturas de reacción suelen ser altas lo que implica un coste energético muy elevado, los catalizadores se recuperan con dificultad, la separación de los productos es más complicada y el glicerol que se genera como subproducto del proceso químico tiene difícil aprovechamiento porque su refinado resulta muy costoso. Este subproducto puede utilizarse puro en los sectores alimentario, farmacéutico y cosmético, pero se sigue investigando en darle usos alternativos a los mencionados. Por otro lado, es interesante señalar que los catalizadores químicos son en la mayoría de las ocasiones ácidos o bases, por lo que su manejo y almacenamiento debe realizarse con cautela, y los efluentes o desechos del proceso son contaminantes y precisan un tratamiento previo a su eliminación.

30

35

En cambio, aunque la síntesis de biodiesel mediante catálisis enzimática es considerablemente más lenta que la catálisis química y el precio de las enzimas utilizadas como catalizadores es elevado, las ventajas de la síntesis de biodiesel mediante dicho procedimiento son muchas. Entre las más importantes ventajas, destacan que las condiciones en las que se lleva a cabo la catálisis enzimática son más suaves, las enzimas son más específicas que los catalizadores químicos, la presencia de ácidos grasos libres no interfiere en la catálisis, sino que éstos también son esterificados, y la mezcla de reacción es mucho más limpia, lo que facilita la recuperación de los productos y no genera residuos tóxicos.

Hasta la fecha, los aspectos principales que mantienen la síntesis enzimática de biodiesel lejos de su aplicación industrial son principalmente dos: (1) el coste del catalizador y (2) la inhibición de muchos catalizadores por metanol. Respecto al coste derivado del empleo de catalizadores enzimáticos, éste puede reducirse mediante el reciclado de los mismos, y esto es posible cuando el catalizador está inmovilizado y puede llevar a cabo ciclos sucesivos de reacción sin pérdidas relevantes de actividad. Sin embargo, el problema que genera el uso de metanol como sustrato de la reacción enzimática es más difícil de resolver, ya que este alcohol produce la desestabilización y/o inactivación de la mayoría de las enzimas conocidas, incluyendo las hidrolasas de ésteres carboxílicos (EC 3.1.1), grupo en el que se encuentran las enzimas que catalizan esta reacción. Por dicho motivo, en el estado de la técnica se describe la síntesis de biodiesel mediante catálisis enzimática utilizando como sustratos preferentemente etanol, propanol o butanol cuando el biocatalizador no es estable a metanol. Sin embargo, aunque la toxicidad del metanol es superior a la del resto de los sustratos utilizados, dicho alcohol es el más utilizado en la industria debido a otras ventajas tales como su bajo coste, su bajo punto de ebullición y que, además, no forma mezclas azeótropas con el agua, facilitando así su posterior reciclado. Otra de las ventajas de utilizar el metanol como sustrato es que sus ésteres metílicos son menos viscosos que los ésteres de alcoholes de mayor longitud de cadena, y además, tienen mejores propiedades como biocombustible.

El interés de este tipo de reacciones enzimáticas para la síntesis de biocombustibles se ha incrementado en los últimos años. Es conocido el uso de una o varias lipasas microbianas comerciales inmovilizadas de forma no covalente sobre soportes porosos hidrofóbicos y macrorreticulares empleando etanol, metanol u otros dadores de alcohol como sustratos de la síntesis de biodiesel, así como una solución alcalina para

mantener la estabilidad y efectividad de las enzimas (EP2542685 B1). Uno de los principales problemas que presenta la inmovilización de enzimas mediante, por ejemplo, el método CLEAs (*Cross-Linked Enzyme Aggregates*), en presencia o no de soporte, es que puede producir alteraciones y modificaciones en la estructura de la proteína, comprometiendo su actividad o dificultando el acceso de los sustratos al centro activo o la evacuación de los productos de reacción, lo que conlleva una baja eficacia en la síntesis de biodiesel.

Otros métodos utilizados en el estado de la técnica describen el uso de nanopartículas magnéticas funcionalizadas en superficie, sobre las que se inmoviliza mediante interacciones hidrofóbicas la enzima utilizada para la síntesis de biodiesel (El Batal *et al.* *Bioengineering* 2016, 3:14). En este caso, al no existir una unión covalente entre la enzima y el soporte, se observa una pérdida de actividad del 66% al cabo de pocos ciclos de síntesis, debido principalmente al lixiviado de la propia enzima.

Por otro lado, también es conocido que la síntesis enzimática de biodiesel con una lipasa comercial inmovilizada sobre un soporte microporoso, mantiene la actividad durante 10 ciclos de síntesis de 24 h. Sin embargo, esta reacción tiene lugar a 50 °C o 65 °C, según el tipo de aceite utilizado como sustrato, con agitación de 250 rpm y un exceso molar de metanol de 6:1, lo que implicaría la retirada del metanol excedente y la peor recuperación del glicerol producido (Dizge *et al.* *Bioresource Technology* 2009, 100:1983-1991; Dizge *et al.* *Biochemical Engineering Journal* 2009, 44:220-225). Por otra parte, varios grupos de investigación (Cruz-Izquierdo *et al.* *PLoS ONE* 2014, 9:e115202; López *et al.* *Frontiers in Chemistry* 2014, 2:72) inmovilizaron la enzima comercial Cal B en forma de CLEAs y mCLEAs (sobre un soporte magnético funcionalizado con grupos amino) para la producción de biodiesel. En estos casos, los autores sintetizaron ésteres etílicos de ácidos grasos vegetales utilizando grandes excesos molares de alcohol, alcanzando conversiones máximas en 24 h del 90% con una proporción de etanol:aceite 30:1 y del 82% empleando propanol (proporción 6:1). Como ya se ha comentado, estos ésteres de alcoholes de cadena más larga presentan desventajas frente a los ésteres metílicos de cara a la producción de biodiesel y los excesos molares de alcohol empleados requerirían su reciclado, aumentando los costes del proceso. Otros procedimientos de inmovilización covalente se basan también en el uso de nanopartículas magnéticas, a las que se une la lipasa comercial Lipozyme-TL empleando glutaraldehído (Xie *et al.* *Energy & Fuels* 2009, 23:1347-1353) o una carbodiimida (Xie *et al.* *Biomass and Bioenergy* 2010, 34:890-

896) para la síntesis de FAMEs (ésteres metílicos de ácidos grasos, del inglés *Fatty Acid Methyl Esters*), alcanzando una conversión en 24 h de entre el 75% (a 50 °C) y el 94% (a 45 °C). Aunque estos rendimientos no son malos, la reciclabilidad de las enzimas está lejos de ser óptima, ya que no admiten más de 3 o 4 ciclos catalíticos consecutivos. Estos mismos autores, inmovilizaron la lipasa comercial de *Candida rugosa* sobre microesferas magnéticas de quitosano activadas con glutaraldehído. Mediante dicho procedimiento, los autores sintetizaron FAMEs a partir de aceite de soja, con un rendimiento del 87% en reacciones de 30 h a 35 °C. El máximo número de reciclados sin una pérdida excesiva de actividad fue de cuatro (Xie *et al.* Biomass and Bioenergy 2012, 36:373-380).

En vista de lo expuesto en los párrafos anteriores, existe en el estado de la técnica la necesidad de proporcionar catalizadores y métodos alternativos de síntesis enzimática de biodiesel capaces de incrementar el rendimiento del proceso, así como de permitir una recuperación sencilla y eficiente de la enzima para futuras reacciones, sin que la actividad y velocidad de la misma se vea disminuida a lo largo de los ciclos de reacción consecutivos a los que se puede someter a dicha enzima.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una glicoproteína inmovilizada covalentemente mediante la formación de una amina secundaria sobre partículas magnéticas funcionalizadas, que preferiblemente se lleva a cabo mediante la oxidación de las cadenas glucídicas de las glicoproteínas. Las glicoproteínas preferidas inmovilizadas covalentemente sobre partículas magnéticas según la presente invención, son glicoproteínas del grupo de las hidrolasas de ésteres carboxílicos (EC 3.1.1) capaces de sintetizar biodiesel, preferentemente con actividad triacilglicerol lipasa (EC 3.1.1.3), conocidas generalmente como lipasas. Dentro del grupo de enzimas denominadas generalmente lipasas, existe un grupo conocido como "lipasas estrictas" que son enzimas que solo actúan sobre glicéridos, y otro grupo conocido como "lipasas versátiles" que además de actuar sobre glicéridos, también actúan frente a ésteres diferentes a los glicéridos (Barriuso *et al.* Biotechnology Advances 2016, 34:874-885). Del mismo modo, algunas carboxil esterases (EC 3.1.1.1) y esterol esterases (EC 3.1.1.13) tienen una amplia especificidad de sustrato y presentan también actividad lipasa (Whiteley *et al.* Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 2013, 97:156-168; Vaquero *et al.* Applied Microbiology and Biotechnology 2016, 100:2047-2061),

5 pudiendo catalizar la síntesis de biodiesel gracias a su actividad frente a glicéridos. En el caso particular de las esterasas con actividad lipasa, se ha propuesto recientemente que pasen a denominarse “lipasas versátiles” ya que algunas de ellas incluso tienen más actividad sobre glicéridos que sobre ésteres de esteroles (Barriuso *et al.* *Biotechnology Advances* 2016, 34:874-885).

10 Según se demuestra en los ejemplos incluidos en el presente documento, las glicoproteínas, preferentemente glicoproteínas con actividad lipasa, inmovilizadas covalentemente mediante la formación de una amina secundaria sobre partículas magnéticas funcionalizadas, según se describe aquí, muestran un incremento en el rendimiento del proceso de síntesis de biodiesel y permiten la recuperación de la enzima unida covalentemente a las partículas magnéticas de forma sencilla y eficiente, simplemente mediante la aplicación de un campo magnético.

15 Otra de las ventajas mostradas en los ejemplos incluidos en el presente documento para las glicoproteínas, preferentemente glicoproteínas con actividad lipasa, inmovilizadas covalentemente sobre partículas magnéticas según se describe en el presente documento, es que la actividad de dichas enzimas en la síntesis de biodiesel no disminuye a lo largo del tiempo, durante 5 ciclos de reacción consecutivos, y  
20 mantiene una elevada actividad durante al menos 10 ciclos. Adicionalmente, el proceso de obtención del biodiesel catalizado por dichas enzimas unidas covalentemente a las partículas magnéticas no requiere la adición de cosolventes, aunque pueden utilizarse si se desea.

25 Así en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una glicoproteína inmovilizada covalentemente mediante la formación de una amina secundaria sobre partículas magnéticas. En una realización preferida, la glicoproteína es preferentemente cualquier enzima con actividad lipasa, más preferentemente es una lipasa, tanto estricta como versátil, y/o una esterasa de esteroles.

30

Las glicoproteínas son proteínas que, de forma natural, contienen una o más cadenas glucídicas que se unen covalentemente a ciertas asparaginas, serinas y treoninas durante la biosíntesis proteica. En el caso de su unión a asparagina, el grupo amino de la cadena lateral se asocia al carbohidrato mediante enlace *N*-glicosídico, mientras  
35 que con serina y treonina se establece un enlace *O*-glicosídico al condensarse el hidroxilo de sus cadenas laterales con otro del monosacárido. La porción glucídica de

las glicoproteínas es muy variable, pudiendo encontrarse desde monosacáridos hasta largas y complejas cadenas de diferente composición, estructura, y grado de ramificación. En esta invención se describen preferentemente glicoproteínas con actividad lipasa, inmovilizadas covalentemente mediante la formación de una amina secundaria sobre partículas magnéticas, así como su uso específico según se describe en la presente invención. Las lipasas, sobre todo aquéllas producidas por microorganismos, son las principales enzimas empleadas con fines biotecnológicos en la producción de biodiesel. Algunas enzimas producidas por hongos tienen una amplia versatilidad de sustrato y combinan la actividad lipasa con una importante actividad esterol esterasa, que tal y como se ha mencionado anteriormente se denominan lipasas versátiles, por lo que dichas enzimas, pese a encontrarse descritas como esterol esterases, también son capaces de sintetizar biodiesel en las condiciones adecuadas.

En una realización más preferida la glicoproteína, preferentemente una glicoproteína con actividad lipasa, más preferentemente la esterol esterasa/lipasa inmovilizada covalentemente sobre las partículas magnéticas según la presente invención es una lipasa versátil, según se ha definido anteriormente, sintetizada de forma natural por el hongo filamentoso dimórfico *Ophiostoma piceae*. Dicha esterol esterasa/lipasa o lipasa versátil nativa es una glicoproteína de masa molecular 66 kDa que comprende un 8% de glicosilación (Calero-Rueda *et al.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics 2002, 1599:28-35).

En la presente invención, el término "gen esterol esterasa" se refiere a una secuencia nucleotídica que codifica la esterol esterasa/lipasa o lipasa versátil de *O. piceae* y se identifica por la SEQ. ID NO: 1.

A efectos de la presente invención, los términos, glicoproteína con actividad lipasa, esterol esterasa/lipasa y lipasa versátil, se utilizan indistintamente a lo largo del presente documento y se refieren al grupo de proteínas que presentan actividad lipasa, pudiendo ser lipasas estrictas y/o lipasas versátiles. La forma nativa de la esterol esterasa/lipasa o lipasa versátil de la presente invención comprende la secuencia aminoacídica completa de la proteína codificada por el gen esterol esterasa de *O. piceae*, incluyendo el péptido señal (SEQ. ID NO: 2). La forma madura de dicha enzima comprende la secuencia aminoacídica codificada por el gen esterol esterasa, sin incluir el péptido señal y se identifica con la SEQ ID NO: 3. En adelante se hablará

de enzima nativa como la forma madura, sin péptido señal, para diferenciarla de las formas recombinantes.

5 En la presente invención las expresiones "expresión heteróloga" y "gen heterólogo" se refieren a la introducción de un gen extraño (heterólogo) en un organismo con el fin de modificar su material genético y los productos de expresión. A efectos de la presente invención, dicho organismo es una levadura metilotrófica, preferentemente *Pichia pastoris*.

10 En una realización particular, la secuencia aminoacídica madura codificada por el gen esterol esterasa, se expresa en la levadura *P. pastoris*, empleando como péptido señal el pre-propéptido del factor  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae*, según se describe en el documento Barba-Cedillo *et al.* (Microbial Cell Factories 2012, 11:73) dando lugar a la esterol esterasa/lipasa o lipasa versátil recombinante descrita en la presente  
15 invención. Esta lipasa versátil recombinante presenta modificaciones en su secuencia aminoacídica, que comprende entre 6-8 aminoácidos nuevos en el extremo N-terminal, añadidos sobre la secuencia aminoacídica de la proteína nativa madura. En una realización más preferida, la lipasa versátil recombinante procedente de *O. piceae* y expresada en la levadura *P. pastoris* (OPeR), comprende la secuencia SEQ ID NO: 4  
20 o SEQ ID NO: 5.

En la presente invención, los términos "lipasa versátil", "esterol esterasa/lipasa" se utilizan indistintamente a lo largo del presente documento y se refieren a una  
25 secuencia aminoacídica de la enzima con actividad esterol esterasa y lipasa codificada por el gen esterol esterasa de *Ophiostoma piceae*. Dicha enzima es extracelular y puede ser nativa cuando se expresa en el organismo original (aunque al ser extracelular haya perdido el péptido señal y se hable de proteína madura) o recombinante si la secuencia completa de la proteína o la secuencia de la proteína madura se expresa en otro organismo.

30

En otra realización preferida, la lipasa versátil de la presente invención se selecciona de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5. En una realización más preferida, la enzima lipasa versátil se selecciona de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

35



- A efectos de la presente invención, además de las lipasas versátiles de SEQ ID NOs: 3, 4 y 5, cualquier experto en la materia puede utilizar cualquier glicoproteína nativa o recombinante de cualquier origen biológico con actividad lipasa conocida, tales como las lipasas nativas o recombinantes producidas por otros hongos distintos a *O. piceae*,  
 5 por ej.: *Candida* sp., *Candida rugosa*, *Melanocarpus albomyces*, *Candida antarctica* (Cal A, Cal B), *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizopus oryzae*, *Mucor miehei*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Nectria haematococca*, o *Plicaturiopsis crispa*.
- 10 En una realización más preferida, la glicoproteína, preferentemente la lipasa versátil, inmovilizada sobre partículas magnéticas según se describe en la presente invención, es preferentemente la lipasa versátil que comprende la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5, inmovilizada sobre la partícula magnética Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.
- 15 A efectos de la presente invención se entiende por partícula magnética o partícula con propiedades magnéticas a aquella partícula que, siendo o no siendo intrínsecamente magnética, se ve atraída hacia un campo o fuerza magnética cuando se la expone a este. Preferentemente, las partículas tienen propiedades magnéticas del tipo superparamagnéticas o ferromagnéticas. En una realización preferida, la partícula  
 20 magnética es partícula de metal, óxido de metal, mezcla de óxidos metálicos, aleaciones metálicas o mezcla de ellas que tengan propiedades magnéticas. Son preferidas las partículas magnéticas que se seleccionan de la lista que consiste en: óxidos de hierro, metales, materiales ferromagnéticos y aleaciones. Mas preferentemente, las partículas magnéticas preferidas se seleccionan de la lista que  
 25 consiste en: magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), maghemita, (γFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>); partículas magnéticas a base de metales, tales como hierro, cobalto y níquel, partículas magnéticas a base de materiales ferromagnéticos de tipo espinela tales como, MgFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> y CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>; y partículas magnéticas a base de aleaciones tales como CoPt<sub>3</sub> y FePt. El núcleo magnético de la nanopartícula puede estar protegido por una cubierta  
 30 inorgánica (por ejemplo de sílice, carbono o metales preciosos), orgánica (por ejemplo de surfactantes o polímeros), o de óxidos. La presencia de esta cubierta facilita su funcionalización. En la presente invención se prefieren partículas magnéticas de óxido de hierro, especialmente partículas de magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) o maghemita (γFe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Preferentemente, en la invención se emplean partículas magnéticas de tamaños  
 35 comprendidos entre 0,001-100 μm. En otra realización preferida, las partículas

magnéticas son preferentemente micropartículas magnéticas o nanopartículas magnéticas, preferentemente nanopartículas magnéticas de entre 1-130 nm y más preferentemente entre 10-30 nm.

5 Una realización particularmente preferida de la presente invención se refiere a cualquiera de las glicoproteínas, más preferentemente a las glicoproteínas de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 5, inmovilizada covalentemente según se describe en la presente invención, sobre la partícula magnética  $Fe_3O_4$ .

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para la obtención de las partículas magnéticas descritas anteriormente. Cualquiera de los métodos conocidos por un experto en el campo técnico de las partículas magnéticas puede utilizarse en la presente invención. Así, métodos conocidos para la síntesis de partículas magnéticas se seleccionan de la lista que consiste en: co-precipitación, micro-emulsión,  
15 descomposición térmica, ruta solvo-térmica, ruta sono-química, proceso asistido por microondas, proceso Laux, tratamiento de minerales de óxido de hierro, pirólisis láser, deposición de vapor, descarga en arco, síntesis en fase gaseosa, síntesis en fase sólida, reducción química u otros. Preferentemente, el proceso para dar lugar a la partícula magnética de la invención, es la co-precipitación.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de síntesis de la glicoproteína inmovilizada covalentemente mediante la formación de una amina secundaria sobre partículas magnéticas según se ha descrito previamente en el presente documento, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

- 25 a) generar grupos aldehído en las cadenas glucídicas de la glicoproteína,  
b) funcionalizar las partículas magnéticas, preferentemente con grupos amino en su superficie,  
c) incubar la glicoproteína de la etapa a) con un agente reductor, preferentemente suave y con la partícula magnética amino funcionalizada de la etapa b), y  
30 d) estabilizar la unión de la glicoproteína inmovilizada sobre las partículas magnéticas obtenidas en la etapa c).

En una realización preferida, el procedimiento de síntesis de la glicoproteína inmovilizada covalentemente sobre las partículas magnéticas mediante la formación  
35 de una amina secundaria, se caracteriza por que la generación de grupos aldehído en

las cadenas glucídicas de la glicoproteína de la etapa a) se lleva a cabo mediante un proceso de oxidación, preferentemente en presencia de un agente oxidante.

5 A efectos de la presente invención, se entiende por agente oxidante cualquier compuesto conocido en la técnica capaz de oxidar a otro en contacto con él. Preferiblemente el agente oxidante se selecciona entre aquéllos capaces de generar grupos aldehído en cadenas glucídicas. En otra realización más preferida aún, el agente oxidante capaz de generar grupos aldehído en cadenas glucídicas se selecciona de la lista que consiste en: enzimas, que se seleccionan de la lista que  
10 consiste en oxidorreductasas, aldosa oxidasas, alcohol deshidrogenasas y oxidasas, y agentes químicos oxidantes. En la presente invención los agentes químicos oxidantes se seleccionan de entre 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy radical (TEMPO), periodinato Dess-Martin, tetraacetato de plomo  $Pb-(O_2CCH_3)_4$ , bismutato sódico ( $NaBiO_3$ ), ácido periódico o periodatos. Son particularmente preferidos los periodatos y  
15 más preferentemente el periodato sódico ( $NaIO_4$ ) y potásico ( $KIO_4$ ).

De acuerdo con una realización preferida, el agente químico oxidante se aplica en forma líquida, generalmente disuelto en solvente acuoso, lo cual facilita y potencia su acción oxidativa. Según una realización preferida, la concentración de la solución del  
20 agente oxidante está comprendida entre 5 a 50 mM, más preferentemente 10 mM.

En otra realización preferida del procedimiento de síntesis de la glicoproteína inmovilizada sobre partículas magnéticas de la invención se caracteriza por que la funcionalización de la etapa b) se lleva a cabo mediante la unión de grupos amino a  
25 su superficie, preferentemente mediante cualquiera de los procedimientos seleccionados de la lista que consiste en: silanización, recubrimiento con sustancias orgánicas tales como por ejemplo polímeros, surfactantes, etc, o con sustancias inorgánicas tales como carbono, metales preciosos u óxidos, entre otros.

30 En otra realización preferida, la funcionalización de la etapa b) es preferiblemente la unión de grupos amino mediante silanización de la superficie de la partícula magnética.

A efectos de la presente invención, las partículas magnéticas se recubren de una capa  
35 de silicio mediante un procedimiento denominado silanización, y se funcionalizan con grupos amino en su superficie. Los grupos amino pueden estar unidos directamente o

mediante un espaciador al grupo silano. A efectos de la presente invención, el término espaciador se refiere a un grupo capaz de unir el grupo sililo con el grupo amino terminal. Preferentemente, el espaciador es un grupo alquilo, más preferentemente un grupo alquilo C1-C10. A efectos de la presente invención el término “alquilo C1-C10” se refiere en la presente invención a cadenas alifáticas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 10 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, tert-butilo, sec-butilo, n-pentilo, etc. Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 8 átomos de carbono y más preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono. Más preferiblemente, las partículas magnéticas de la invención se silanizan y funcionalizan mediante grupos alquil-amino.

La silanización, así como cualquiera de los otros métodos descritos anteriormente, y la funcionalización se pueden realizar en una única etapa, utilizando un único reactivo que cumpla las dos funciones, o bien empleando dos reactivos, siendo uno de ellos un agente exclusivamente silanizante para lograr una cubierta de un grupo que comprende silicio más gruesa sobre la nanopartícula, donde dicho agente es preferentemente el tetraetoxisilano (TEOS), y otro agente silanizante que además comprende el grupo funcional deseado para funcionalizar la partícula magnética.

En una realización más preferida, la silanización y la funcionalización tienen lugar con un solo reactivo y en una única etapa. A efectos de la presente invención, los agentes silanizantes capaces de incorporar grupos amino funcionales en la superficie de la partícula magnética se seleccionan de la lista que consiste en (3-aminopropil)triétoxisilano (APTES), (3-aminopropil)trimetoxisilano, 3[2-(2-aminoetilamino)etilamino] propiltrimetoxisilano, 3-(2-aminoetilamino)-propildimetoximetilsilano, [3-(2-aminoetilamino)propil] trimetoxisilano, 3-aminopropildimetilmetoxisilano, 3-aminopropil(dietoxi)metilsilano. En una realización preferida, la silanización y funcionalización de la partícula magnética se lleva a cabo con 3-aminopropil triétoxisilano (APTES).

En otra realización preferida, la concentración de 3-aminopropil triétoxisilano está comprendida entre 5 a 150 mM, más preferentemente de entre 100 a 130 mM. En otra realización preferida, una vez finalizado el proceso, la concentración de grupos amino accesibles en la superficie de la partícula magnética está comprendida entre 5 a 100  $\mu$ moles/g partícula magnética, más preferentemente entre 5 a 40  $\mu$ moles/g partícula magnética.

En otra realización preferida, las partículas magnéticas de la invención, previamente silanizadas o recubiertas de materiales poliméricos tales como por ejemplo el amino-polivinil alcohol pueden incorporar grupos hidrazida sobre su superficie.

5

En otra realización preferida del procedimiento de obtención de la glicoproteína inmovilizada covalentemente según se describe en la presente invención, éste se caracteriza por que la glicoproteína que comprende grupos aldehído en su sus cadenas glucídicas, preferentemente obtenidos mediante oxidación, según se indica en la etapa a), se mantiene en incubación con la partícula magnética amino funcionalizada de la etapa b) en presencia de un agente reductor, durante un tiempo de entre 1 a 20 h, más preferentemente durante al menos 2 h, y a una temperatura de entre 4 a 37 °C, más preferentemente a 28 °C, con una concentración de proteína de entre 0,01 a 1 mg de proteína por mg de nanopartículas, más preferentemente de entre 0,02 a 0,04 mg de proteína por mg de nanopartículas.

10

15

A efectos de la presente invención se entiende por agente reductor o donador de protones, a cualquier compuesto capaz de ceder electrones a un agente oxidante. Preferiblemente el agente reductor es un agente reductor suave, y más preferentemente se selecciona de la lista que consiste en hidruros metálicos como borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ), hidruro de litio, hidruro de litio y aluminio, cianoborohidruro de sodio, cianoborohidruro de litio, boranos como el trimetil amino borano (TMAB) o el  $\alpha$ -picolino borano, triacetoxiborohidruro sódico, o borohidruro de sodio modificado con sales metálicas polivalentes o activado por ácidos. En una realización más preferida, el agente reductor es el TMAB. De acuerdo con una realización preferida, el agente reductor utilizado se aplica en forma líquida, lo cual facilita y potencia la acción reductora del mismo. Según una realización preferida, la concentración de la solución del agente reductor está comprendida entre 100 y 300 mM, más preferentemente 150 mM.

20

25

30

En otra realización preferida del procedimiento de obtención de la glicoproteína inmovilizada covalentemente según se describe en la presente invención, éste se caracteriza por que la estabilización de la etapa d) se produce mediante aminación reductiva para dar lugar a una amina secundaria estable. Según una realización preferida, la concentración de la solución del agente reductor utilizado en esta etapa está comprendida entre 0,5 a 5 mg/mL, más preferentemente 1 mg/mL.

35

A efectos de la presente invención, la inmovilización covalente entre la partícula magnética amino funcionalizada en su superficie con la glicoproteína, preferentemente con la enzima con actividad lipasa, preferentemente con la lipasa versátil descrita en  
5 la invención, se produce mediante la formación de una amina secundaria tal y como se ha comentado previamente. Dicho tipo de inmovilización se lleva a cabo específicamente a través de las cadenas glucídicas oxidadas de la enzima con actividad lipasa, preferentemente con la lipasa versátil sobre la superficie de la  
10 partícula magnética amino funcionalizada, preferentemente amino-alquil funcionalizada, mediante la reacción de los aldehídos previamente generados vía oxidación en las cadenas glucídicas de la esterasa/lipasa, formando una imina (base de Schiff) con los grupos amino de las partículas magnéticas, y donde dicha imina se estabiliza mediante aminación reductiva para dar lugar a una amina secundaria estable. Dicho procedimiento de inmovilización covalente entre los grupos  
15 amino de la partícula magnética funcionalizada y los azúcares oxidados de la glicoproteína, mantiene la integridad estructural de la enzima, cuya secuencia proteica no interviene en la interacción con la partícula magnética. Además, la inmovilización a través de las cadenas glucídicas de la enzima aporta una unión al soporte por múltiples puntos haciéndola muy estable, mientras que permite que se mantenga un  
20 cierto grado de flexibilidad en la preparación, lo que facilita el acceso de los sustratos al centro activo y la evacuación de los productos sintetizados. Adicionalmente, la inmovilización covalente de la enzima con actividad lipasa, preferentemente de la lipasa versátil de la invención mediante la formación de una amina secundaria con la partícula magnética amino-funcionalizada incrementa la estabilidad y eficiencia de  
25 dicho catalizador, específicamente en su uso para la síntesis de biodiesel, así como la reciclabilidad de la enzima inmovilizada.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de síntesis de ésteres de alquilo que comprende la transesterificación y/o esterificación de una  
30 fuente de ácidos grasos con un alcohol, en presencia de una preparación enzimática o crudo que comprende un catalizador (enzima), preferentemente una glicoproteína con actividad lipasa, inmovilizada covalentemente mediante la formación de una amina secundaria sobre partículas magnéticas, según se describe en la presente invención.

35 La preparación enzimática que comprende un catalizador o enzima con actividad lipasa inmovilizada covalentemente mediante un grupo amino secundario sobre

partículas magnéticas según se describe en la presente invención, mantiene su actividad en una mezcla de alcohol de cadena corta, preferentemente metanol, y de glicéridos, preferentemente de ácidos grasos de cadena larga, con o sin ácidos grasos libres, sin necesidad de cosolventes. Las reacciones de transesterificación y/o esterificación catalizadas por la glicoproteína con actividad lipasa, preferentemente la lipasa versátil procedente del hongo *O. piceae*, no necesitan ningún tipo de aditivo o cosolvente para llevar a cabo la transesterificación de mono- di- y triglicéridos dando lugar a ésteres metílicos y glicerol y la esterificación de los ácidos grasos libres que los acompañan para producir los correspondientes ésteres metílicos y agua como productos.

Así, el procedimiento de síntesis de ésteres de alquilo que comprende la transesterificación y/o esterificación de una fuente de ácidos grasos con un alcohol, en presencia de una preparación que comprende una glicoproteína, preferentemente una glicoproteína con actividad lipasa, inmovilizada covalentemente mediante la formación de una amina secundaria sobre partículas magnéticas según se describe en la presente invención, ha producido los mejores rendimientos en comparación con otros procedimientos de inmovilización enzimática de dicha enzima e incluso otras enzimas comerciales con actividad lipasa. Además, tal y como se observa en los ejemplos incluidos en la presente invención, la enzima o catalizador se recupera de forma sencilla y eficiente, simplemente mediante la aplicación de un campo magnético. Adicionalmente, se ha puesto también de manifiesto que la actividad de la enzima de la presente invención no disminuye significativamente a lo largo del tiempo, y que tras al menos 10 ciclos de reacción consecutivos mantiene más del 70% de dicha actividad. La enzima inmovilizada también cataliza esta reacción en presencia de cosolventes como hexano, tolueno o isooctano, más preferentemente en isooctano, aunque en estas condiciones la reacción transcurre más lentamente.

Los términos "esterificación" y "transesterificación" tal y como se usan en la presente invención, se refieren respectivamente a la reacción que se produce entre un ácido graso y un alcohol, o un mono, di o triglicérido de ácidos grasos y un alcohol. Los sustratos empleados pueden comprender mezclas de ácidos grasos y glicéridos, por lo que al mezclarse con un alcohol tendrían lugar ambos tipos de reacciones. En los dos casos se sintetizan ésteres de ácidos grasos, pero en la esterificación se libera agua como subproducto mientras que en la transesterificación se libera glicerol. La transesterificación puede ser catalizada por bases, ácidos o enzimas. A efectos de la

presente invención, el procedimiento de transesterificación se lleva a cabo en presencia de enzimas, preferentemente glicoproteínas con actividad lipasa como por ejemplo las lipasas estrictas, versátiles, o esterolesas con actividad lipasa, o de microorganismos que las producen. En una forma de realización, los ésteres de alquilo se obtienen a partir de la preparación lipídica de acuerdo a la invención mediante la transesterificación o esterificación de los glicéridos o ácidos grasos que forman parte de la preparación lipídica.

El término "biodiesel" según se usa en la presente invención, se refiere a una composición química compuesta fundamentalmente por ésteres monoalquílicos o alquílicos de ácidos grasos de cadena larga. Los ésteres que forman parte del biodiesel son ésteres metilo, etilo, propilo o butilo y los ácidos grasos proceden de la composición lipídica de acuerdo a la presente invención. En formas preferidas de realización, el biodiesel de acuerdo a la presente invención comprende uno o varios de los siguiente ésteres alquílicos de ácidos grasos: ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME o *fatty acid methyl ester*), ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE o *fatty acid ethyl esters*), ésteres propílicos de ácidos grasos (FAPE o *fatty acid propyl esters*), ésteres butílicos de ácidos grasos (FABE o *fatty acid butyl esters*). En una forma preferida de la invención, el biodiesel es un combustible que está compuesto en su totalidad por ésteres de origen biológico que no contienen diésel procedente del petróleo y que comprende monoalquil ésteres de ácidos grasos de cadena larga. Este tipo de biodiesel se conoce como B100 e indica que el 100% del combustible es biodiesel.

A efectos de la presente invención se consideran ácidos grasos de cadena larga los que contienen un número de átomos de carbono comprendido entre 14 y 22. Los ácidos grasos de cadena larga se seleccionan de la lista que consiste en: ácido mirístico o tetradecanoico (14:0), ácido miristoleico o cis-9-tetradecenoico (14:1), ácido pentadecílico o pentadecanoico (15:0), ácido pentadecenoico (15:1), ácido palmítico o hexadecanoico (16:0), ácido palmitoleico o hexadecenoico (16:1), ácido hexadecadienoico (16:2), ácido hexadecatrienoico (16:3), ácido margárico o heptadecanoico (17:0), ácido heptadecenoico (17:1), ácido esteárico u octadecanoico (18:0), ácido oleico u octadecenoico (18:1), ácido linoleico u octadecadienoico (18:2), ácido linoleico u octadecatrienoico (18:3), ácido estearidónico u octadecatetraico (18:4), ácido araquídico o eicosanoico (20:0), ácido eicosenoico (20:1), ácido eicosadienoico (20:2), ácido eicosatrienoico (20:3), ácido araquidónico o



eicosatetraenoico (20:4), ácido eicosapentaenoico (20:5), ácido behénico o docosanoico (22:0), ácido docosenoico (22:1), ácido docosatetraenoico (22:4), ácido docosapentaenoico (22:5) y ácido docosahexaenoico (22:6). Aunque en general un biodiesel concreto contiene una especie molecular predominante, las materias primas  
5 empleadas para su producción suelen ser mezclas que contienen también ácidos grasos de cadena corta, media o muy larga, que se transforman igualmente en ésteres monoalquílicos durante el proceso y forman parte de la mezcla final de biodiesel. El documento de Hoekman *et al.* (Renewable and Sustainable Energy Reviews 2012, 16:143-169), recoge un listado de los ácidos grasos más  
10 frecuentemente encontrados en el biodiesel y la descripción del perfil de ácidos grasos del biodiesel (ésteres metílicos) obtenido a partir de diferentes aceites y grasas.

En todas las realizaciones y aspectos de la invención, el alcohol puede ser un alcohol de cadena corta, por ejemplo, alcohol de alquilo C1-C6, más específicamente alcohol  
15 de alquilo C1-C4, particularmente metanol o etanol, más preferiblemente metanol. Cuando dicho alcohol es metanol, dichos ésteres de ácidos grasos resultantes son ésteres de metilo de ácidos grasos (FAME - Biodiesel). Cuando dicho alcohol es etanol, dichos ésteres de ácidos grasos resultantes son ésteres de etílicos de ácidos grasos. Cuando dicho alcohol es propanol, dichos ésteres de ácidos grasos  
20 resultantes son ésteres de propilo de ácidos grasos. Cuando dicho alcohol es butanol, dichos ésteres de ácidos grasos resultantes son ésteres de butilo de ácidos grasos. El alcohol también puede ser un alcohol graso de cadena media (C6-C10) o alcoholes grasos de cadena larga (C12-C22). El dador de alcohol puede ser un éster de monoalquilo o un carbonato de dialquilo, tal como carbonato de dimetilo o carbonato  
25 de dietilo.

En una realización preferida, el procedimiento de síntesis de ésteres de alquilo descrito en la presente invención se caracteriza porque la preparación o crudo enzimático comprende la lipasa versátil recombinante (OPEr) de la presente  
30 invención, preferentemente la OPEr que comprende las secuencias SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5, a una concentración de proteínas entre 1 a 20 mg/mL, preferentemente entre 2 a 10 mg/mL, más preferentemente entre 3 a 4 mg/mL, donde dicha concentración de proteínas comprende entre 100 y 450 unidades de actividad lipasa versátil (OPEr) por mililitro medida frente a *p*-nitrofenil butirato, más  
35 preferentemente entre 150-300 unidades de actividad por mililitro.

A efectos de la presente invención los términos preparación enzimática o crudo, utilizados indistintamente a lo largo del presente documento, se refieren al líquido y/o sobrenadante obtenido del cultivo del microorganismo empleado para la producción de la enzima lipasa versátil nativa (OPE), donde dicho líquido y/o sobrenadante comprende las secuencias SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, o recombinante (OPeR) que comprende las secuencias SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.

En otra realización preferida, la preparación enzimática de la invención o crudo que comprende la lipasa versátil nativa (OPE) que comprende las secuencias SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, y/o recombinante (OPeR) que comprende las secuencias SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5, puede concentrarse, preferentemente mediante ultrafiltración a través de membranas de entre 3 y 50 kDa de poro, más preferiblemente de entre 10 y 50 kDa. Cualquier método conocido por un experto en la materia puede ser utilizado para concentrar el crudo utilizado en el presente procedimiento de la invención. En otra realización preferida, la preparación enzimática de la invención también puede ser una preparación enzimática o crudo purificado. Cualquier método conocido en la técnica para la purificación enzimática puede ser utilizado en la presente invención.

En otra realización preferida, el procedimiento de síntesis de ésteres de alquilo descrito en la presente invención se caracteriza porque la reacción de transesterificación y/o esterificación transcurre a una temperatura de entre 20 y 60 °C, preferentemente entre 25 y 50 °C, más preferentemente de entre 25 y 35 °C. El hecho de que este catalizador, tanto libre como inmovilizado, lleve a cabo una síntesis eficiente de FAMES a temperaturas inferiores a las descritas en otros procedimientos, generalmente entre 35-60 °C, según se describe en el documento de Gumba *et al.* (Biofuel Research Journal 2016, 3:431-447), representa una considerable reducción del coste energético asociado al proceso de síntesis de biodiesel.

En otra realización preferida, el procedimiento de síntesis de ésteres de alquilo descrito en la presente invención se caracteriza porque la reacción se lleva a cabo a un pH de entre 2 a 10, preferentemente a un pH ácido de 2 a 5.

En otra realización preferida, el procedimiento de síntesis de ésteres de alquilo descrito en la presente invención se caracteriza porque la reacción puede tener lugar en un medio con hasta 30% de agua, preferentemente con menos del 10% y más preferentemente en ausencia de agua. El hecho de que la lipasa versátil inmovilizada

según se describe en la presente invención catalice la síntesis de biodiesel tanto en ausencia como en presencia de cierta cantidad de agua hace esta enzima particularmente interesante, ya que por una parte no requiere la adición de agua para su actividad, y por otra parte es tolerante a la presencia de agua en la materia prima  
5 empleada como sustrato y al agua producida por la esterificación de los ácidos grasos libres que pudiera contener dicho sustrato. Otros procedimientos descritos en el estado de la técnica no son compatibles con la presencia de agua en la mezcla de reacción y requieren el empleo de sistemas de eliminación del agua (Mehrasbi *et al.* Renewable Energy 2017, 101:593-602).

10

En otra realización preferida, el procedimiento de síntesis de ésteres de alquilo descrito en la presente invención se caracteriza porque la reacción se lleva a cabo en presencia o ausencia de un cosolvente. A efectos de la presente invención los cosolventes preferidos se seleccionan de la lista que consiste en hexano, tolueno e  
15 isooctano. En una realización aún más preferida, la reacción se lleva a cabo sin añadir ningún cosolvente.

20

A efectos de la presente invención, la fuente de ácidos grasos usada en el proceso de la invención puede comprender al menos uno de entre cualquiera de los siguientes:  
aceite vegetal, preferentemente aceite de semillas de soja, aceite de canola, aceite de algas, aceite de colza, aceite de oliva, aceite de ricino, aceite de palma, aceite de girasol, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de *Jatropha*, aceite de *Camelina*, aceite de maíz crudo; grasa animal, preferentemente, aceite de pescado; grasa derivada de animales; aceite usado; grasa quemada; triglicéridos de  
25 aceite derivados de fuentes vegetales no comestibles; glicéridos parciales y ácidos grasos libres derivados de esos aceites; o cualquier mezcla de al menos dos de los mismos, en cualquier relación deseada. En otra realización más preferida del procedimiento de la presente invención, la fuente de ácidos grasos comprende ácidos grasos libres, mono-, di- o triglicéridos, sus mezclas en cualquier relación, ésteres de  
30 ácidos grasos y amidas, en ausencia o presencia de otros derivados de ácidos grasos secundarios tales como fosfolípidos y ésteres de esteroles, dicha fuente de ácidos grasos está sin refinar, refinada, blanqueada, desodorizada o cualquiera de sus combinaciones.

35

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o

pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

5

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Fig. 1.** Comparación de la estabilidad a temperatura (A) y pH (B) de OPEr libre e inmovilizada covalentemente a través de sus cadenas glucídicas sobre partículas magnéticas amino funcionalizadas (AMNP-CH-OPEr).

10

**Fig. 2.** Comparación de la eficiencia en síntesis de biodiesel y la estabilidad operacional de las lipasas Cal A (barra blanca), Cal B (barra gris claro) y OPEr (barra gris oscuro), inmovilizadas covalentemente sobre nanopartículas magnéticas amino-funcionalizadas a través de sus cadenas glucídicas (AMNP-CH), y de la preparación comercial de Cal B inmovilizada por adsorción Novozym 435 (N 435) (barra negra). La reacción se produjo a partir de aceite doméstico reciclado y metanol (relación molar 1:4) a 28 °C y con agitación orbital de 100 rpm. C1, C2, C3, C4 y C5 hace referencia a cada uno de los ciclos de reacción llevados a cabo por las mismas enzimas ensayadas en las mismas condiciones cada ciclo.

15

**Fig. 3.** Comparación de la eficiencia y estabilidad operacional de OPEr inmovilizada covalentemente mediante AMNP-CH (barra gris oscura) y mediante interacción hidrofóbica sobre partículas comerciales SiMag-Octyl (barra gris clara). Se ha asignado el 100% al valor obtenido para el primer ciclo de reacción con AMNP-CH-OPEr. C1, C2, C3, C4 y C5 hace referencia a cada uno de los ciclos de reacción llevados a cabo por las mismas enzimas ensayadas en las mismas condiciones cada ciclo.

20

25

**Fig. 4.** Cromatogramas comparando la síntesis de oleato de metilo a partir de trioleína y metanol (relación molar 1:4) en reacciones de 72 h sin cosolvente, a 28 °C y 200 rpm. Las reacciones fueron catalizadas por: a) Novozym 435, b) OPE inmovilizada sobre Sepabeads, y c) OPE inmovilizada sobre Eupergit.

30

## EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

35

## Materiales y métodos

Las partículas de magnetita desnuda (MNPs) utilizadas en los ejemplos incluidos en la presente descripción tienen un tamaño de entre 20-30 nm y proceden de Iolitec GmbH (Heilbronn, Alemania). Dichas partículas magnéticas se amino-funcionalizaron en el laboratorio con 3-aminopropil trietoxisilano (APTES, Sigma). Para los ensayos comparativos se adquirieron nanopartículas de magnetita comerciales ya funcionalizadas y listas para la inmovilización de la enzima lipasa versátil utilizada en la invención. Dichas nanopartículas de magnetita comerciales son: SiMAG-Amine que presenta grupos amino (estas nanopartículas son el análogo comercial de las utilizadas en la presente invención) y SiMAG-Octyl-C8 que comprenden grupos octilo, ambas de Chemicell. Las nanopartículas SiMAG-Octyl-C8 se utilizan para comparar el procedimiento de inmovilización descrito en la presente invención con otro procedimiento no covalente, aunque sí apto para la inmovilización de proteínas hidrofóbicas sobre partículas magnéticas.

La enzima con actividad lipasa versátil utilizada es la lipasa versátil presente en cualquier crudo producido por cualquier microorganismo que comprenda el gen de la estero esterasa del hongo *Ophiostoma piceae* (OPE). Para los diferentes ensayos comparativos también se utilizaron las lipasas comerciales Cal A (NS 40020) y Cal B (Lipozyme L) ambas de Novozymes. Dichas enzimas comerciales de Novozymes, al ser también glicoproteínas, se inmovilizaron mediante el procedimiento descrito en la invención, es decir, se inmovilizaron covalentemente sobre partículas magnéticas amino-funcionalizadas en su superficie, para así comparar la validez de dicho método de inmovilización y su efecto sobre la eficiencia y reciclabilidad de lipasas comerciales, muchas de ellas con propiedades catalíticas mejoradas, cuando son inmovilizadas mediante dicho procedimiento. También se comparó la actividad en la síntesis de biodiesel de la enzima Novozym 435 (Novozymes), la forma comercial de la enzima Cal B inmovilizada por adsorción sobre Lewatit VP OC 1600, una resina acrílica macroporosa.

La medida de la actividad lipasa en las preparaciones enzimáticas o crudos que comprenden la enzima libre y en los sobrenadantes tras la inmovilización (actividad residual) se valoró espectrofotométricamente ( $A_{410\text{ nm}}$ ) mediante la liberación de *p*-nitrofenol a partir de palmitato de *p*-nitrofenilo (*p*-NPP) y/o butirato de *p*-nitrofenilo (*p*-

NPB), según se describe en Gutiérrez-Fernández *et al.* (Journal of Structural Biology 2014, 187:215-222). El *p*-NPP es un sustrato típico para evaluar la actividad lipasa, ya que es un aril-éster de ácido graso de cadena larga, mientras que el *p*-NPB es el sustrato más apropiado para la medida de actividad esteroles esterasa al ser un aril-éster de un ácido graso de cadena corta. La actividad lipasa de las enzimas OPEr y Cal A pudo ser determinada utilizando *p*-NPP como sustrato, sin embargo la enzima Cal B se inactivó en las condiciones de reacción ensayadas. Para lograr una suspensión homogénea del sustrato *p*-NPP, que es insoluble en agua, es preciso añadir un detergente en el medio de reacción y probablemente la enzima Cal B resulta inactivada debido a la acción de dicho detergente. Por esta razón, se determinó también la actividad de las tres enzimas frente a *p*-NPB, ya que este sustrato es soluble y no es necesario añadir detergente. En el caso de las enzimas Cal A y OPEr, sus actividades lipasa y esteroles esterasa resultaron ser similares en las condiciones del ensayo.

**Ejemplo 1. Inmovilización de lipasas, a través de sus propias cadenas glucídicas, sobre nanopartículas de magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) amino-funcionalizadas (AMNP-CH).**

Para que una enzima pueda ser inmovilizada a través de sus propias cadenas glucídicas es necesario que dicha enzima sea de naturaleza glicoproteica, ya que este tipo de inmovilización covalente de dicho tipo de enzimas sobre partículas magnéticas amino-funcionalizadas en su superficie se basa en la generación de grupos aldehído a partir de las cadenas glucídicas de la enzima a inmovilizar, que reaccionan con los grupos amino presentes en la superficie de las partículas magnéticas amino-funcionalizadas. Las cadenas glucídicas de la proteína son superficiales y la inmovilización de la enzima por dichas cadenas no modifica la estructura de la proteína ni afecta a la accesibilidad de los sustratos al centro activo de la misma. Entre las enzimas con actividad lipasa inmovilizadas según el procedimiento de la presente invención están OPEr, Cal A y Cal B, todas ellas de naturaleza glicoproteica. Para llevar a cabo la inmovilización de dichas enzimas mediante el procedimiento descrito en la presente invención se realiza un tratamiento de la enzima con NaIO<sub>4</sub>, que produce la rotura del enlace carbono-carbono (C-C) de los monosacáridos cuando dos carbonos adyacentes presentan grupos hidroxilo vecinales (dioles vecinales), oxidando dichos alcoholes a aldehídos. Una vez oxidadas, las enzimas OPEr, Cal A y Cal B se inmovilizan covalentemente sobre las MNPs amino-funcionalizadas (AMNPs)

al reaccionar los grupos amino de dichas AMNPs con los aldehídos generados en la glicoproteína vía oxidación, formando una imina (base de Schiff) que se estabiliza mediante aminación reductiva para dar lugar a una amina secundaria estable.

5 1.1. Preparación de nanopartículas de magnetita ( $Fe_3O_4$ ) funcionalizadas con grupos amino (AMNPs).

Las nanopartículas de  $Fe_3O_4$  (Iolitec GmbH) fueron silanizadas y funcionalizadas con 3-aminopropil trietoxisilano (APTES, Sigma), compuesto que incorpora grupos amino reactivos en la superficie de la nanopartícula. Basándonos en el método descrito por Chen *et al.* (International Journal of Molecular Sciences 2013, 14:4613-4628), se mezcla 1 g de las nanopartículas magnéticas, específicamente de las nanopartículas  $Fe_3O_4$ , con 9,7 mL de etanol en un baño de ultrasonidos durante 20 min. Se añaden 300  $\mu$ L de APTES, sonicando durante 10 min. Se agita en un mezclador a 80 rpm y 28 °C durante 16 h. Una vez transcurrido este tiempo se separan las nanopartículas con ayuda de un imán y se retira el líquido de reacción, lavando las MNPs funcionalizadas con los grupos amino en la superficie de las mismas con 300 mL de etanol al 50% en agua tres veces, sonicando entre lavados. Finalmente, las MNPs amino-funcionalizadas se secan en una estufa de aireación a 65 °C. Se valora la densidad de grupos amino accesibles en las partículas mediante el procedimiento descrito por del Campo *et al.* (Journal of Magnetism and Magnetic Materials 2005, 293:33-40), poniendo de manifiesto que presentan grupos amino accesibles en superficie en el rango de 5-15  $\mu$ moles/g soporte, algo inferior al descrito para preparaciones comerciales.

25

1.2. Oxidación de las cadenas glucídicas de las esteroles/lipasas.

Para que las lipasas se unan covalentemente a las partículas magnéticas amino-funcionalizadas en su superficie según se describe en la presente invención, es necesario oxidar las cadenas glucídicas de dichas enzimas. En los ejemplos mostrados en la presente invención, las lipasas se someten a dicho pre-tratamiento de oxidación, para que las diferencias mostradas en los ensayos comparativos de la síntesis de biodiesel utilizando dichos catalizadores, se deban exclusivamente al tipo de inmovilización realizada, y no al pre-tratamiento oxidativo al que se ha sometido previamente a la enzima.

35

Se han oxidado las preparaciones enzimáticas o los crudos que contienen la enzima OPEr, así como las diferentes preparaciones de enzimas comerciales (Cal A y Cal B). Brevemente, a una solución de lipasa con 20 mg/mL de proteínas totales se le añade NaIO<sub>4</sub> en Tris-HCl 5 mM pH 7, a concentración final 10 mM. Se mantiene la reacción durante 3 h a 4 °C, en oscuridad y sin agitación, y se dializa frente a Tris-HCl 20 mM pH 7 para eliminar los reactivos y subproductos de baja masa molecular. La oxidación de las cadenas glucídicas de las lipasas se lleva a cabo para generar grupos aldehído en los azúcares de dichas enzimas, y posteriormente, durante el proceso de inmovilización sobre las MNPs amino-funcionalizadas, unir covalentemente estos grupos reactivos a los grupos amino de las nanopartículas. Antes de su uso para la inmovilización, se ajustan las soluciones de cada una de las enzimas con actividad lipasa para que contengan alrededor de 0,5 U de actividad medida frente a butirato de *p*-nitrofenilo (*p*-NPB) por mg de la preparación de partículas magnéticas funcionalizadas.

### 1.3. Inmovilización de lipasas.

Brevemente, se parte de 1 g de AMNPs al que se le añade Tris-HCl 20 mM pH 7 que posteriormente se retira con la ayuda de un imán. En ese mismo vial, se añade tampón Tris-HCl 100 mM pH 8, se agita y a continuación se añade el volumen de la preparación de la lipasa equivalente a una actividad de 0,5 U de actividad por mg de AMNP, y trimetil amino borano (TMAB) a una concentración final de 150 mM. Se agita y se mantiene en agitación a 80 rpm y 28 °C durante 16 h. Posteriormente se retira el sobrenadante, midiendo su actividad residual. Se añaden 30 mL de NaBH<sub>4</sub> (1 mg/mL) a las nanopartículas magnéticas con la lipasa inmovilizada y se deja reaccionar durante 1 h. Finalmente se lava la preparación de AMNP-CH-OPEr secuencialmente con Tris-HCl 100 mM pH 7 y Tris-HCl 20 mM pH 7, resuspendiéndolas en este último solvente para su almacenamiento a 4 °C.

### 1.4. Estabilidad a pH y temperatura de las nanopartículas magnéticas con OPEr inmovilizada a través de la unión de sus cadenas glucídicas a MNPs amino-funcionalizadas (AMNP-CH-OPEr).



Se comparó la estabilidad de la enzima OPEr en los crudos antes (OPEr libre) y después de su inmovilización mediante AMNP-CH (AMNP-CH-OPEr). La estabilidad frente a la temperatura se evaluó en un rango comprendido entre 25 y 70 °C, con el catalizador libre (disuelto) o inmovilizado (resuspendido) en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7. La estabilidad de la enzima OPEr a diferentes pHs se determinó a 4 °C poniendo la muestra de catalizador libre o inmovilizado en tampón Britton & Robinson ajustado a valores de pH comprendidos entre 2 y 10.

Se tomaron 500 µL del crudo o de la suspensión de AMNP-CH-OPEr conteniendo aproximadamente la misma actividad frente a *p*-NPB, manteniéndolos durante 24 h en agitación (1200 rpm) en un termobloque a cada una de las temperaturas y pHs ensayados. Tras el tratamiento se midió actividad residual frente a *p*-NPB, considerando como el 100% el valor obtenido a 25 °C y pH 7, respectivamente. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

La enzima AMNP-CH-OPEr es más estable a altas temperaturas que la OPEr libre (**Fig. 1A**). La enzima AMNP-CH-OPEr mantiene un 80% de su actividad hasta los 50 °C, mientras que la enzima OPEr libre conserva solo un 32% de su actividad a la temperatura de 40 °C, y además, se inactiva por encima de esta temperatura.

Con respecto al pH, la enzima AMNP-CH-OPEr muestra una estabilidad igual o mayor que la OPEr libre en todo el rango de pH analizado (pH de 2 a 10). Es interesante destacar la mejora de la actividad a pHs alcalinos (8 y 9) y muy especialmente a pH ácido, donde la actividad llega a duplicarse a pH 2 y 3 (**Fig. 1B**).

El documento Torres *et al.* (Catalysis Communications 2008, 9:539-545) describe la inmovilización de la enzima OPE nativa sobre Dilbeads, un soporte macroporoso, y su efecto sobre la estabilidad térmica y de pH en un periodo de 24 h. En este caso se observó un efecto estabilizador frente al incremento de temperatura, y respecto a la estabilidad frente a pH, los autores solo indican un efecto destacable a pH 8.

### 1.5. Síntesis de biodiesel con lipasas inmovilizadas sobre partículas magnéticas a través de sus cadenas glucídicas.

El análisis de la producción de biodiesel utilizando la lipasa versátil OPEr inmovilizada sobre AMNP-CH según se describe en la presente invención, y comparando dicha producción con la obtenida utilizando otras lipasas comerciales inmovilizadas sobre diferentes sustratos, según se describe en los ejemplos incluidos en el presente documento, se llevó a cabo con 500  $\mu$ L de aceite reciclado y metanol (proporción molar 1:3), y 50 mg de la enzima ensayada (0,3 mg de proteína), sin utilizar cosolventes. Las reacciones se mantuvieron a 28 °C y con agitación rotacional (360°) a 80-100 rpm en un mezclador durante 24 h. Para evaluar la estabilidad de las lipasas ensayadas en estas condiciones de reacción (estabilidad operacional), a las 24 h de reacción se separaron la fase líquida y el catalizador con la ayuda de un imán externo, se lavó el catalizador con Tris-HCl 20 mM pH 7 y se volvió a poner la reacción en las mismas condiciones.

Se realizó un seguimiento de la síntesis de biodiesel a lo largo del tiempo. Las muestras tomadas a las 24 h de reacción fueron analizadas mediante cromatografía de gases, determinando la producción de ésteres metílicos. El oleato de metilo sintetizado se cuantificó utilizando una recta patrón de este compuesto construida empleando colesteno como patrón interno.

Los resultados obtenidos para la síntesis de biodiesel catalizada por OPEr, Cal A y Cal B inmovilizadas covalentemente sobre AMNP-CH se presentan en la **Fig. 2**. Los resultados ponen de manifiesto que las preparaciones de OPEr y Cal A inmovilizadas según se describe en el presente documento, tienen una eficiencia similar, siendo ambas más eficientes que la enzima Cal B también inmovilizada según la presente invención. La estabilidad operacional de AMNP-CH-OPEr y AMNP-CH-Cal A es excelente, ya que aunque en la **Fig. 2** solo se muestran los resultados hasta el quinto ciclo de síntesis de biodiesel (24 h cada uno), esta preparación se ha reciclado más de diez veces, con baja pérdida de actividad (se mantiene más del 70% de la actividad inicial en el 10° ciclo). En las mismas condiciones ensayadas, la lipasa Cal B es menos eficiente que la enzima OPEr, tanto en su forma libre como tras su inmovilización como AMNP-CH-Cal B. Aunque en esta forma la enzima AMNP-CH-Cal B mantuvo estable su actividad en los cinco ciclos, dicha actividad es muy escasa comparada con la actividad mostrada por la enzima OPEr inmovilizada sobre AMNP-CH, o por la enzima AMNP-CH-Cal A. Por el contrario, la enzima Novozym 435 (N 435) produjo un rendimiento muy bajo en la síntesis de ésteres metílicos, y la actividad de dicha enzima desapareció tras el segundo ciclo.

Estos resultados ponen de manifiesto que el procedimiento de inmovilización sobre partículas magnéticas amino-funcionalizadas en su superficie, a través de los carbohidratos oxidados presentes en las glicoproteínas, permite la eficaz recuperación y reciclado de la enzima.

**Ejemplo 2. Síntesis de biodiesel con OPEr inmovilizada sobre nanopartículas comerciales de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) funcionalizada con grupos octilo (MNP-Octil-OPEr).**

10

Para comparar la eficiencia del proceso de síntesis de biodiesel mediante la enzima OPEr inmovilizada covalentemente sobre nanopartículas magnéticas amino-funcionalizadas en su superficie (AMNP-CH-OPEr) respecto de otros procedimientos de inmovilización, se utilizó la misma enzima OPEr pero inmovilizada sobre nanopartículas magnéticas funcionalizadas con grupos octilo en su superficie (MNP-Octil-OPEr). La inmovilización de la enzima OPEr sobre nanopartículas magnéticas funcionalizadas con grupos octilo en su superficie tiene lugar por interacción hidrofóbica de la enzima con las cadenas alquílicas de ocho carbonos disponibles en las nanopartículas magnéticas.

20

Brevemente, la solución comercial de MNP-Octil (Chemicell) contiene 50 mg de nanopartículas por mL de  $\text{H}_2\text{O}$ . Se retira el agua con la ayuda de un imán y se añade el volumen de crudo equivalente a 0,5 U de actividad (medida frente a *p*-nitrofenil butirato, *p*-NPB) por mg de soporte y se completa hasta 1 mL con Tris 100 mM pH 8. Se mezcla suavemente con una pipeta durante 2 min tras los cuales se retira el sobrenadante utilizando el imán, y a continuación se mide la actividad residual tras la inmovilización. El catalizador inmovilizado se resuspende en Tris-HCl 20 mM pH 7 para su almacenamiento a 4 °C.

30

La **Fig. 3** muestra que en el primer ciclo la lipasa OPEr inmovilizada sobre Octil-MNP (MNP-Octil-OPEr) funcionó de forma similar a la enzima inmovilizada sobre AMNP-CH, pero luego la actividad enzimática comenzó a disminuir y en el quinto ciclo casi había desaparecido completamente. Estos resultados ponen de manifiesto la mayor eficiencia y rendimiento en la síntesis enzimática de biodiesel, así como un reciclado de la enzima para futuras reacciones, sencillo y eficiente, sin que la actividad y velocidad de la misma se vea disminuida a lo largo de los ciclos de reacción

35

consecutivos, cuando dicha enzima, preferentemente la enzima OPEr se inmoviliza covalentemente sobre partículas magnéticas amino-funcionalizadas en su superficie, según se describe en la presente invención.

5 **Ejemplo 3. Síntesis de biodiesel con esteroles esterases/lipasas inmovilizadas covalentemente sobre soportes microporosos funcionalizados.**

Se inmovilizaron crudos que comprenden la enzima OPE sobre dos soportes microporosos epoxi comerciales: Eupergit (Rohm Inc.) y Sepabeads (Resindion).

10 Dichos soportes microporosos difieren en su geometría interna. Para la inmovilización sobre ambos soportes se añadieron 180 U de enzimas esteroles esterasa/lipasas (Novozym 435, OPE inmovilizada sobre Sepabeads y OPE inmovilizada sobre Eupergit) en 1 mL de H<sub>2</sub>O. Las inmovilizaciones se realizaron a 4 °C en un mezclador de rodillos durante 48 h.

15

Para la inmovilización sobre el soporte Eupergit, se usaron 100 mg de soporte, 1 mL del crudo disuelto en agua y 1,5 mL de tampón fosfato 0,5 M pH 8. Para la inmovilización en Sepabeads se partió de 200 mg de soporte (puesto que este material tiene un alto grado de humedad) añadiendo 1 mL del crudo disuelto en agua  
20 y 500 µL de tampón fosfato 1,25 mM pH 8. En ambos casos, se enrasó hasta 3 mL con agua. Se realizó un seguimiento de la inmovilización en los dos soportes, tomando muestras a diferentes tiempos. Las muestras se centrifugaron, evaluando la actividad residual tras la inmovilización.

25

Las enzimas así inmovilizadas, Novozym 435, OPE inmovilizada sobre Sepabeads y OPE inmovilizada sobre Eupergit, se ensayaron en reacciones de síntesis de biodiesel a 28 °C y agitación orbital a 200 rpm, en ausencia de cosolvente, utilizando trioleína comercial y metanol (relación molar 1:4) como sustratos y comparando el resultado obtenido con la enzima OPE inmovilizada sobre Sepabeads o Eupergit, con el  
30 obtenido empleando Novozym 435 como catalizador. El seguimiento de estas reacciones se realizó por cromatografía de gases. Las reacciones catalizadas por la enzima OPE inmovilizada sobre ambos soportes transformaron casi totalmente los sustratos aunque más lentamente (72-96 h), mientras que Novozym 435 apenas produjo ésteres metílicos en las condiciones ensayadas (**Fig. 4**).

35

**REIVINDICACIONES**

1. Glicoproteína inmovilizada covalentemente mediante la formación de una amina secundaria sobre partículas magnéticas.
- 5 2. Glicoproteína según la reivindicación 1 donde la glicoproteína es una lipasa y/o una esteroesterasa con actividad lipasa.
3. Glicoproteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 donde la glicoproteína se selecciona de entre cualquiera de la lista que consiste en: SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5.
- 10 4. Glicoproteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la partícula magnética tiene un tamaño de entre 1 a 130 nm.
5. Glicoproteína según la reivindicación 4 donde la partícula magnética tiene un tamaño de entre 10 a 30 nm.
- 15 6. Glicoproteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde la partícula magnética se selecciona de la lista que consiste en: magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), maghemita ( $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), partículas metálicas de hierro, partículas metálicas de cobalto, partículas metálicas de níquel, partículas metálicas de tipo espinela que se seleccionan de la lista que consiste en:  $\text{MgFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  y  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , y partículas metálicas a base de aleaciones tales como  $\text{CoPt}_3$  y  $\text{FePt}$ .
- 20 7. Glicoproteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 caracterizada por que comprende la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5 inmovilizada sobre la partícula magnética  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .
8. Procedimiento de síntesis de glicoproteínas inmovilizadas covalentemente sobre partículas magnéticas mediante la formación de un grupo amino secundario según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
  - 25 a) generar grupos aldehído en las cadenas glucídicas de la glicoproteína,
  - b) funcionalizar las partículas magnéticas con grupos amino en su superficie,
  - 30 c) incubar la glicoproteína de la etapa a) con un agente reductor en presencia de la partícula magnética amino funcionalizada de la etapa b), y
  - d) estabilizar la unión de la glicoproteína inmovilizada sobre la partícula magnética obtenida en la etapa c).
- 35 9. Procedimiento según la reivindicación 8 donde la oxidación de la etapa a) se lleva a cabo en presencia de un agente oxidante que se selecciona de la lista que

consiste en: 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy radical (TEMPO), periodinato Dess-Martin, tetraacetato de plomo  $Pb-(O_2CCH_3)_4$ , bismutato sódico ( $NaBiO_3$ ), ácido periódico, periodato sódico ( $NaIO_4$ ) y periodato potásico ( $KIO_4$ ).

- 5 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9 donde la funcionalización de la etapa b) se lleva a cabo mediante silanización.
11. Procedimiento según la reivindicación 10 donde la funcionalización de la etapa b) y la silanización se llevan a cabo simultáneamente.
- 10 12. Procedimiento según la reivindicación 11 donde la funcionalización y silanización se lleva a cabo mediante un compuesto que se selecciona de la lista que consiste en: 3-aminopropil trietoxisilano (APTES), (3-aminopropil)trimetoxisilano, 3[2-(2-aminoetilamino)etilamino] propiltrimetoxisilano, 3-(2-aminoetilamino)-propildimetoximetilsilano,[3-(2-aminoetilamino)propil]trimetoxisilano, 3-aminopropildimetoximetilsilano y 3-aminopropil(dietoxi)metilsilano.
- 15 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 donde el agente reductor de la etapa c) se selecciona de la lista que consiste en: borohidruro de sodio ( $NaBH_4$ ), cianoborohidruro de sodio, cianoborohidruro de litio, trimetil amino borano (TMAB) o triacetoxiborohidruro.
- 20 14. Procedimiento de síntesis de ésteres de alquilo que comprende la transesterificación y/o esterificación de una fuente de ácidos grasos con un alcohol, en presencia de una preparación enzimática que comprende una glicoproteína según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7.
15. Procedimiento según la reivindicación 14 donde el alcohol es un alcohol de cadena corta.
- 25 16. Procedimiento según la reivindicación 15 donde el alcohol de cadena corta es metanol.
17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16 donde la fuente de ácidos grasos se selecciona de la lista que consiste en aceite vegetal, grasa animal, aceite de algas, aceite de pescado, aceite usado, grasa quemada y/o cualquier combinación de los mismos.
- 30 18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17 donde los ésteres de alquilo se seleccionan de la lista que consiste en: ésteres de metilo, etilo, propilo o butilo.
- 35 19. Procedimiento según la reivindicación 18 donde los ésteres de metilo son ésteres de metilo de ácidos grasos, los ésteres etílicos son ésteres etílicos de ácidos grasos, los ésteres propílicos son ésteres propílicos de ácidos grasos y los ésteres butílicos son ésteres butílicos de ácidos grasos.

20. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19 donde la concentración de la glicoproteína varía entre 1-20 mg/mL o la actividad de la glicoproteína varía entre 100-450 U/mL.
- 5 21. Procedimiento según la reivindicación 20 donde la concentración de la glicoproteína varía entre 2 a 10 mg/mL o la actividad de la glicoproteína varía entre 150-300 U/mL.
22. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 21 donde la reacción de transesterificación y/o esterificación se lleva a cabo a una temperatura de entre 20 a 60 °C y a un pH de entre 2 a 10.
- 10 23. Procedimiento según la reivindicación 22 donde la temperatura varía de entre 25 a 50 °C y el pH de 2 a 5.
24. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 23 donde la temperatura varía entre 25 a 35 °C.

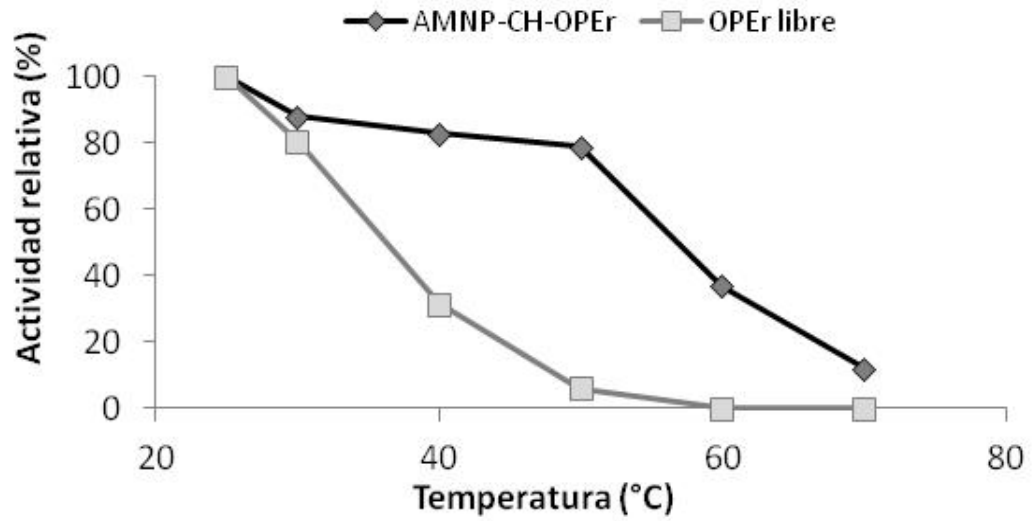


Fig. 1A

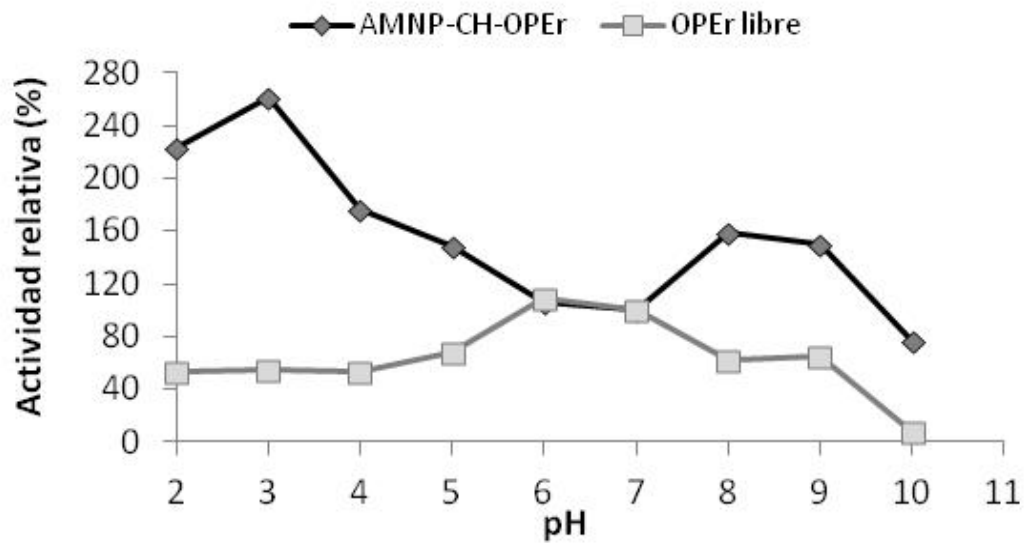


Fig. 1B



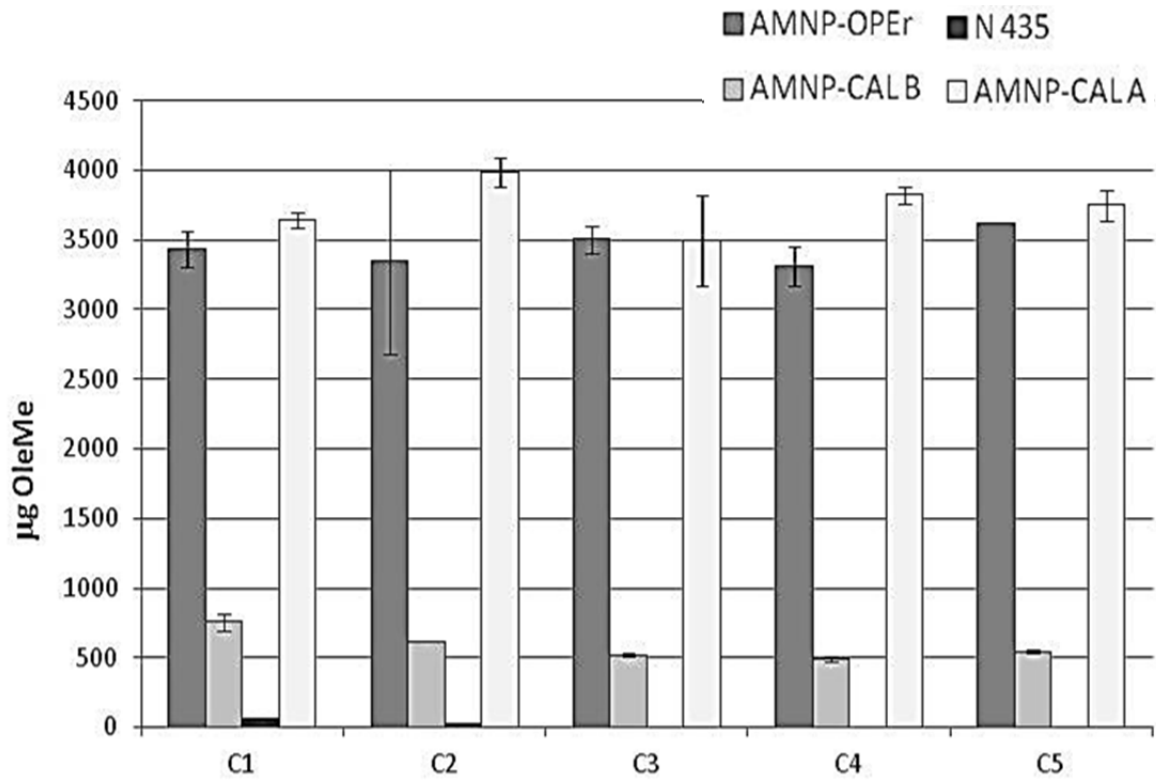


Fig. 2

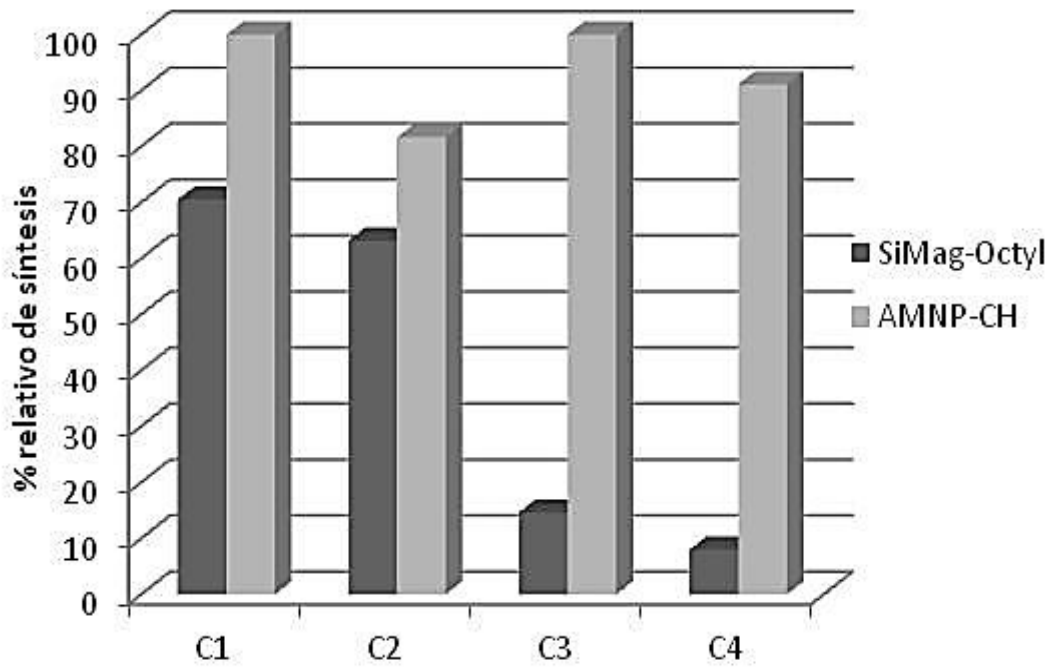


Fig. 3

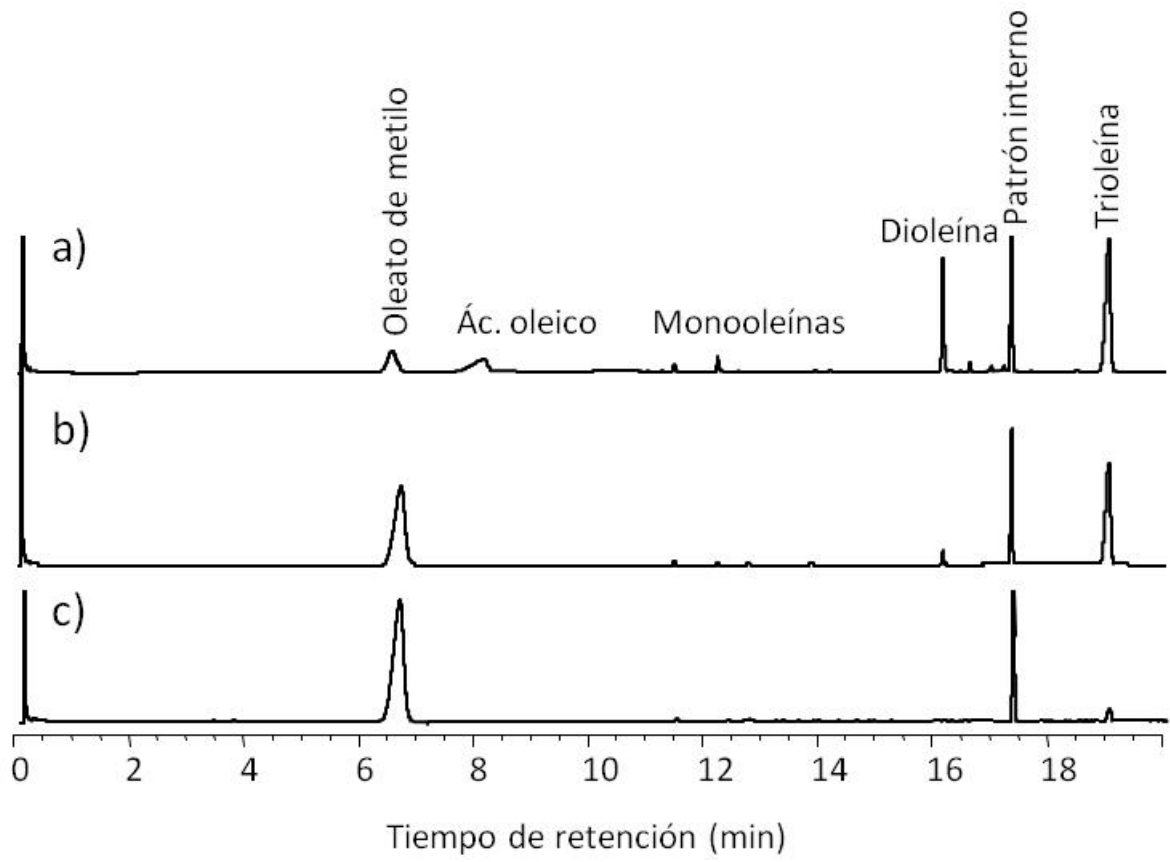


Fig. 4



- ① N.º solicitud: 201730855  
② Fecha de presentación de la solicitud: 28.06.2017  
③ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z.D. et al. . Covalent Immobilization of Enzymes on Eupergit® Supports: Effect of the Immobilization Protocol. ENZYME STABILIZATION AND IMMOBILIZATION. METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 2017, Vol. 1504, Páginas 75-91 [en línea][recuperado el 22.10.2016]. , ISSN ISBN: 978-1-4939-6497-0(H), ISBN: 978-1-4939-6499-4(P), <DOI: 10.1007/978-1-4939-6499-4_7>. Págs. 81-83, 'Immobilization of Enzyme by Periodate Method'	1, 2, 4-6, 8-13
Y	CUI YANJUN et al. Facile synthesis of amino-silane modified superparamagnetic Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanoparticles and application for lipase immobilization. Journal of Biotechnology OCT 1 2010. , 30/09/2010, Vol. 150, Nº 1, Páginas 171-174, ISSN 0168-1656, <DOI: doi:10.1016/j.jbiotec.2010.07.013>. Páginas 172 y 173, figuras 1, 2 y 4.	1, 2, 4-6, 8-13
Y	ZHOU GUI-XIONG et al. Biodiesel production in a magnetically-stabilized, fluidized bed reactor with an immobilized lipase in magnetic chitosan microspheres. Biotechnology Letters JAN 2014. , 31/12/2013, Vol. 36, Páginas 63-68, ISSN 0141-5492(print) ISSN 1573-6776(electronic), <DOI: doi:10.1007/s10529-013-1336-x>. <p>#160;Materiles y métodos; 'Immobilization of lipase'; Resultados y discusión, Figura 5.</p>	14-24
Y	ALEX DEEPHTY et al. Esterases immobilized on aminosilane modified magnetic nanoparticles as a catalyst for biotransformation reactions. Bioresource Technology SEP 2014. , 31/08/2014, Vol. 167, Páginas 547-550, ISSN 0960-8524(print) ISSN 1873-2976(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.biortech.2014.05.110>. Métodos	14-24
Y	PRLAINOVIC NEVENA Z et al. Immobilization of lipase from Candida rugosa on Sepabeads(A (R)): the effect of lipase oxidation by periodates. Bioprocess and Biosystems Engineering SEP 2011. , 31/08/2011, Vol. 34, Nº 7, Páginas 803-810, ISSN 1615-7591(print) ISSN 1615-7605(electronic), <DOI: doi: 10.1007/s00449-011-0530-2>. Experimentación: 'Immobilization by glutaraldehyde', 'Immobilization by periodate'; Resultado y discusión; Resultado y discusión, Figura 2b y 2c.	14-24

#### 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  
07.06.2018

Examinador  
J. L. Vizán Arroyo

Página  
1/4



- ① N.º solicitud: 201730855  
② Fecha de presentación de la solicitud: 28.06.2017  
③ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	KNEZEVIC ZORICA et al. Immobilization of lipase from Candida rugosa on Eupergit (R) supports by covalent attachment. Biochemical Engineering Journal JUN 25 2006. , 31/05/2006, Vol. 30, Páginas 269-278, ISSN 1369-703X. Materiales y métodos, apartados 2.2, 2.2.2 y 2.2.3, Figura 1; Resultados y discusión, Tabla 1, Figura 3.	14-24
A	BARBA V et al. Native and recombinant sterol esterases from Ophiostoma piceae: enzymes with high biotechnological potential. New Biotechnology SEP 2009. , 31/08/2009, Vol. 25, Nº Suppl. 1, Páginas S136, ISSN 1871-6784, <DOI: doi:10.1016/j.nbt.2009.06.452>. todo el documento.	3, 7
A	BARBA CEDILLO VICTOR et al. Potential of Ophiostoma piceae sterol esterase for biotechnologically relevant hydrolysis reactions.. Bioengineered United States. , 30/06/2013, Vol. 4, Páginas 249 - 253, ISSN 2165-5987 (Electronic), <DOI: doi:10.4161/bioe.22818 pubmed: 23138020>. todo el documento.	3, 7
A	TORRES P et al. Characterization and application of a sterol esterase immobilized on polyacrylate epoxy-activated carriers (Dilbeads (TM)). Catalysis Communications MAR 15 2008. , 29/02/2008, Vol. 9, Nº 4, Páginas 539-545, ISSN 1566-7367(print) ISSN 1873-3905(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.catcom.2007.07.014>. todo el documento.	3, 7
A	BARBA CEDILLO VCTOR et al. Recombinant sterol esterase from Ophiostoma piceae: an improved biocatalyst expressed in Pichia pastoris. Microbial Cell Factories JUN 7 2012. , 31/05/2012, Vol. 11, Páginas Article No.: 73, ISSN 1475-2859, <DOI: doi: 10.1186/1475-2859-11-73>. Todo el documento.	3, 7
A	EP 0826382 A2 (MEDTRONIC INC) 04/03/1998, todo el documento.	1, 2, 4-6, 8-13

#### 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  
07.06.2018

Examinador  
J. L. Vizán Arroyo

Página  
2/4



- ②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201730855  
②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 28.06.2017  
③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	KANIMOZHI S et al. Synthesis of amino-silane modified superparamagnetic Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanoparticles and its application in immobilization of lipase from <i>Pseudomonas fluorescens</i> Lp1. Materials Research Bulletin May 2013 Elsevier Science Inc. USA. , 30/04/2013, Vol. 48, Páginas 1830 - 1836, ISSN 0025-5408 (print), <DOI: doi:10.1016/j.materresbull.2013.01.024>. todo el documento.	1, 2, 4-6, 8-13
A	SONG CHONGFU et al. Immobilization and Characterization of a Thermostable Lipase. Marine Biotechnology (New York) DEC 2013. , 30/11/2013, Vol. 15, Nº 6, Páginas 659-667, ISSN 1436-2228(print) ISSN 1436-2236(electronic), <DOI: doi: 10.1007/s10126-013-9515-2>. todo el documento.	1, 2, 4-6, 8-13
A	SCHULTZ NADJA et al. Integrated processing and multiple re-use of immobilised lipase by magnetic separation technology. Journal of Biotechnology OCT 31 2007. , 30/09/2007, Vol. 132, Nº 2, Páginas 202-208, ISSN 0168-1656, <DOI: doi:10.1016/j.jbiotec.2007.05.029>. todo el documento.	1, 2, 4-6, 8-13
A	CN 106119308 A (UNIV SICHUAN) 16/11/2016, todo el documento.	14-24
A	WO 2010049491 A1 (NOVOZYMES AS et al.) 06/05/2010, todo el documento.	14-24
A	MEHRASBI M R et al. Covalent immobilization of <i>Candida antarctica</i> lipase on core-shell magnetic nanoparticles for production of biodiesel from waste cooking oil. Renewable Energy Feb. 2017 Elsevier B.V. Netherlands. , 31/01/2017, Vol. 101, Páginas 593 - 602, ISSN 0960-1481 (print), <DOI: doi:10.1016/j.renene.2016.09.022>. Todo el documento.	14-24
A	KALANTARI MOHAMMAD et al. Evaluation of biodiesel production using lipase immobilized on magnetic silica nanocomposite particles of various structures. Biochemical Engineering Journal OCT 15 2013. , 30/09/2013, Vol. 79, Páginas 267-273, ISSN 1369-703X(print) ISSN 1873-295X(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.bej.2013.09.001>. todo el documento.	14-24

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  
07.06.2018

Examinador  
J. L. Vizán Arroyo

Página  
3/4

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N11/14** (2006.01)

**C12P7/64** (2006.01)

**C12N9/18** (2006.01)

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

C12P, C12N

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, MEDLINE, EMBASE, INSPEC, NPL, INTERNET