

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2015/155400 A1

(43) Fecha de publicación internacional
15 de octubre de 2015 (15.10.2015) **WIPO | PCT**

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
C25B 1/04 (2006.01) *C12N 9/02* (2006.01)
C25B 11/06 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2015/070285
- (22) Fecha de presentación internacional:
10 de abril de 2015 (10.04.2015)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
P201430538 11 de abril de 2014 (11.04.2014) ES
- (71) Solicitante: **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; Calle Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).
- (72) Inventores: **PITA MARTÍNEZ, Marcos**; Calle Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **LÓPEZ DE LACEY, Antonio**; Calle Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **ALCALDE GALEOTE, Miguel**; Calle Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **MATÉ MATE, Diana**; Calle Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **GONZÁLEZ PÉREZ, David**; Calle Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **SHLEEV, Sergey**; Calle Serrano, 117, E-28036 Madrid (ES).
- (74) Mandatario: **FÚSTER, Gustavo**; Paseo de la Habana, 9-11, E-28036 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:
- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
 - con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: USE OF LACCASES FOR THE ELECTROLYTIC SEPARATION OF WATER

(54) Título : USO DE LACASAS PARA LA SEPARACIÓN ELECTROLÍTICA DEL AGUA

(57) Abstract: The invention relates to the use of laccases for the electrolytic separation of water or for the electrocatalytic production of oxygen from water, an enzyme electrode for such an application, a method for the electrolytic production of oxygen from water, and an electrolytic cell and apparatus for the separation of water, containing the enzyme electrode of the invention.

(57) Resumen: El uso de lacasas para la separación electrolítica de agua o para la generación electrocatalítica de oxígeno a partir de agua, un electrodo enzimático para tal aplicación, un método para la generación electrolítica de oxígeno a partir de agua, y una celda electrolítica y un aparato para la separación de agua, conteniendo el electrodo enzimático de la invención.



WO 2015/155400 A1

Uso de Lacasas para la separación electrolítica del agua

Estado de la técnica

La electrolisis del agua para la generación de oxígeno e hidrógeno

La electrólisis del agua es la descomposición del agua (H_2O) en oxígeno O_2 y gas hidrógeno H_2 gracias a una corriente eléctrica que pasa a través del agua. Es una ruta muy accesible para sintetizar O_2 y H_2 .

Para separar el agua en sus componentes elementales O_2 y H_2 , se conecta una fuente eléctrica a dos electrodos o placas que se sitúan dentro del agua. El H_2 se genera en el cátodo (reducción a H_2 molecular) y el oxígeno se genera en el ánodo (oxidación a oxígeno molecular). La principal dificultad para acometer la electrólisis del agua es encontrar catalizadores apropiados para llevar a cabo ambas reacciones redox a una alta velocidad y a bajos sobrepotenciales aplicados.

La descomposición del agua pura en hidrógeno y oxígeno a temperatura y presión estándares no es favorable en términos termodinámicos. De este modo, la electrólisis del agua requiere un exceso de energía en la forma de sobrepotencial para superar varias barreras de activación. Sin el exceso de energía la electrólisis del agua sucede muy despacio, o no sucede. Ésto se debe en parte a la limitada auto-ionización del agua. La conductividad eléctrica del agua pura es mucho menor que, por ejemplo, el agua de mar, debido a su alto contenido en electrolitos. La eficiencia de la electrólisis del agua puede, entonces, incrementarse por la adición de un electrolito (tales como una sal soluble, un ácido o una base) y su uso en electrocatálisis. Actualmente el proceso electrolítico prácticamente no se usa en aplicaciones industriales ya que el hidrógeno puede producirse de manera más económica desde combustibles fósiles.

La electrólisis del agua en condiciones estándar requiere un mínimo teórico de 237 kJ de energía eléctrica aplicada para disociar un mol de agua, que es la energía libre de Gibbs estándar para la formación del agua. En muchas ocasiones, aunque de modo incorrecto, la entalpía estándar de formación del agua líquida se usa como referencia (286 kJ/mol), o posiblemente la del agua vapor (242 kJ/mol). Éstos también se indican habitualmente como los valores de caloríficos superior (Higher Heating Value, HHV) e inferior (Lower Heating Value, LHV) del hidrógeno.

Ya que cada mol de agua necesita dos moles de electrones, y dado que la constante de Faraday, F , representa la carga de un mol de electrones (96485 C/mol), se deduce que el potencial mínimo para la electrólisis es aproximadamente 1,23 V [*Werner Zittel; Reinhold Wurster (1996-07-08) "Chapter 3: Production of Hydrogen. Part 4: Production from electricity by*

means of electrolysis’]. Si se usa el HHV como referencia, el potencial obtenido es 1,48 eV, el potencial termoneutral.

En el caso de la electrólisis del agua, la energía libre de Gibbs representa el trabajo mínimo necesario para que suceda la reacción, y la entalpía de reacción es la cantidad de energía (trabajo y calor juntas) que tiene que suministrarse de modo que los productos de reacción están a la misma temperatura que los reactivos (por ejemplo, la temperatura estándar para los valores dados anteriormente). Esto implica que un electrolizador ideal, 100% eficiente produciría hidrógeno y oxígeno a temperatura más baja que el agua suministrada. Un electrolizador operando a 1,48 V únicamente presentaría una eficiencia del 83%, y produciría hidrógeno y oxígeno a la misma temperatura que el agua suministrada.

De esta manera, los electrolizadores de agua reales requieren potenciales mayores para que suceda la reacción. La parte que excede 1,23 V se llama sobrepotencial, y representa cualquier tipo de pérdida y condición no ideal del proceso electroquímico.

Para una celda bien diseñada el potencial mayor es el sobrepotencial de reacción para el proceso de oxidación de 4 electrones de agua a oxígeno en el ánodo; existen electrocatalizadores que pueden facilitar esta reacción, y las aleaciones de platino son el actual estado de la técnica para esta oxidación. El desarrollo de un electrocatalizador barato y eficaz para esta reacción sería un gran avance, y es un campo de investigación activo. La reacción de dos electrones para producir hidrógeno en el cátodo, que es más sencilla, puede ser electrocatalizada prácticamente sin sobrepotencial por un electrodo de platino, o en teoría con una enzima hidrogenasa. En el caso de emplear otros materiales, menos efectivos, para el cátodo (por ejemplo, grafito), aparecerán sobrepotenciales significativos.

Hasta la fecha, únicamente se ha utilizado un catalizador enzimático para la producción de O₂ en la electrólisis del agua, en particular el Fotosistema II (Photosystem II, PSII), mientras que el electrodo de O₂ tiene un efecto substancial en la actuación y durabilidad de los electrolizadores de agua, dada su cinética intrínsecamente lenta y su pobre durabilidad. Además, es posible enlazar el PSII a un electrodo y oxidar H₂O a O₂ con la ayuda de la luz solar, pero su tamaño, la falta de estabilidad y su complejidad hacen que la tarea sea inabordable. El sistema tiene al menos dos inconvenientes: las dificultades para inmovilizar el complejo enzimático sobre los electrodos y que la electrólisis del agua tiene que acarreararse bajo la acción de la luz visible, la cual si falta priva al PSII de llevar a cabo su actividad [Kato, M et al., JACS (2013), 135, 10610-3].

Las hidrogenasas tolerantes al O₂ son consideradas como bioelectrocatalizadores eficientes para la producción de H₂ [Armstrong, FA et al., *Chem. Soc. Rev.* (2009), 38 (1), 36-51; Shafaat, HS et al., *Biochim. Biophys. Acta* (2013), 1827 (8-9), 986-1002].

Hasta la fecha, no se han descrito otros catalizadores enzimáticos para la electrólisis del agua.

Oxígeno: producción y usos

El oxígeno generalmente se produce industrialmente por destilación fraccionada de aire licuado, usando zeolitas con ciclos de presión para concentrar el oxígeno del aire, por electrólisis de agua y por otros medios. Los usos del oxígeno elemental incluyen la producción de acero, plásticos y materiales textiles, soldaduras, juntas, corte de aceros y otros metales, propulsores de cohetes, terapia de oxígeno, y sistemas de soporte vital en aeronaves, submarinos, vuelos espaciales y buceo.

La toma de oxígeno del aire es el propósito esencial de la respiración, por lo que la suplementación con oxígeno se utiliza en medicina. La terapia con oxígeno se usa para tratar varias enfermedades y condiciones como el enfisema, neumonía, algunos desórdenes cardíacos (fallo cardíaco congestivo), algunos desórdenes que causan un incremento en la presión arterial pulmonar, y cualquier enfermedad que limita la capacidad del cuerpo para tomar y usar oxígeno gaseoso. Otros usos son: el tratamiento de agua; trajes espaciales; suplementos de oxígeno adicionales para gente que escala montañas o vuela en aviones no presurizados de ala fija; suplementos de emergencia de oxígeno en aviones comerciales presurizados para los casos de despresurización de la cabina; usos industriales como el corte y soldadura de metales y la transformación del hierro en acero; en industria química para, por ejemplo, hacer reaccionar el etileno para crear el óxido de etileno, que, posteriormente, se puede convertir en etilenglicol, usado en, por ejemplo, la fabricación de anticongelantes y polímeros como el poliéster (precursor de muchos plásticos y tejidos).

Hidrógeno

Actualmente sólo el 5% del gas hidrógeno producido en el mundo se genera por electrólisis del agua. El hidrógeno se obtiene fundamentalmente de recursos fósiles (como el metano), pero estos recursos no son sostenibles. La mayoría del hidrógeno se usa cercano al sitio donde se produce, siendo los dos usos mayoritarios el procesado de combustibles fósiles (craqueo de petróleo en presencia de hidrógeno, hidrocrqueo) y la producción de amoníaco, sobre todo para el mercado de fertilizantes.

Lacasas

Las lacasas son enzimas oxidasas que contienen cobre y se encuentran en muchas plantas, hongos, microorganismos e insectos. Las oxidasas multicobre azules se componen de un centro activo poblado por cuatro cationes de cobre que catalizan la oxidación de muchos compuestos orgánicos e inorgánicos, tales como orto- y paradifenoles, aminofenoles, polifenoles, poliaminas, ligninas y arildiaminas usando O_2 como el único aceptor de electrones, generalmente a valores ácidos de pH [Morozova, OV et al., *Biochemistry* (2007), 72 (10), 1136-50]. El mecanismo general de la lacasa incluye la oxidación de un sustrato reductor en el sitio de cobre T1 con la consecuente reducción de O_2 a agua en el cluster trinuclear de cobre T2/T3, situado a una distancia de 12-13 Å, sin liberar intermedios tóxicos como el peróxido.

Las lacasas se pueden inhibir con iones pequeños tales como azida, haluros, cianuros; este tipo de iones se juntan al cluster T2/T3 e impiden la transferencia electrónica entre los centros de cobre, y por lo tanto reduciendo su actividad.

Las lacasas se han estudiado ampliamente en bioelectroquímica como biocatalizadores en pilas de combustible enzimáticas, usando el cátodo como donante de electrones para reducción de O_2 . Hasta el momento no se ha descrito ninguna actividad reversible para la lacasa.

Las lacasas son unas de las pocas oxidorreductasas comercializadas como catalizadores industriales. Las enzimas se pueden usar para el tinte y acabado de productos textiles, fabricación de corchos para vino, blanqueadores dentales, biorremediación, que son todos ellos usos relacionados con procesos oxidativos.

En cualquier caso, ningún tipo de actividad inversa para esta oxidorreductasa parece haber sido descrito nunca, por ejemplo la oxidación de agua a través de su cluster de cobre, a pesar de que la enzima se ha utilizado ampliamente como bioelectrocatalizador para la reducción de O_2 [Shleev, S et al., *Biosens. Bioelectron.* (2005), 20 (12), 2517-54; Cracknell, JA et al., *Chem. Rev.* (2008), 108 (7), 2439-61].

RESUMEN DE LA INVENCION

Ahora se ha encontrado que las lacasas catalizan la electrooxidación de agua a oxígeno molecular. Lacasas, tanto nativas como evolucionadas en laboratorio, han sido inmovilizadas sobre electrodos y han demostrado que funcionan como sistemas bioelectrocatalíticos con bajo sobrepotencial y una alta ratio de evolución de O_2 frente a la producción de H_2O_2 durante la electrólisis del agua.

De este modo, de acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de una lacasa para catalizar la generación electrocatalítica de O₂ partiendo de agua.

Otro aspecto de la presente invención es un electrodo enzimático para el uso en la generación electrolítica de O₂ a partir de agua caracterizada en que contiene un miembro base electroconductor y al menos una enzima inmovilizada, seleccionada de la familia de enzimas lacasas.

La invención también está relacionada, en un aspecto adicional, con un método para la generación electrolítica de O₂ a partir de agua, que comprende el paso de poner agua en contacto con un cátodo y un ánodo, cuando la enzima, seleccionada de la familia de enzimas de las lacasas, es inmovilizada sobre el ánodo.

Otro aspecto de la presente invención es una celda electrolítica que comprenda:

- un recipiente para contener o recibir agua, y
- al menos un electrodo enzimático como el descrito arriba.

Un último aspecto de la presente invención es un aparato para separar agua electrocatalíticamente, donde el aparato contenga una o un grupo de celdas tales y como se han definido arriba.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Detalles estructurales para el sitio activo del mutante ChU-B (A) y ThLc (*Trametes hirsuta*) (B). Los residuos de aminoácidos están resaltados en modo de vuelo ("stick mode") y coloreados con el código CPK. Las estructuras globales se muestran a modo de dibujo ("cartoon mode"). Los iones de cobre se muestran como grandes esferas identificadas como T1, T2, T3a y T3b; las moléculas de agua se muestran como pequeñas esferas y están identificadas como HOH. Las líneas de rayas indican las interacciones entre los iones cobre y los aminoácidos involucrados en el sitio activo. Las mutaciones introducidas en ChU-B están subrayadas. El mutante ChU-B se ha modelizado usando la plantilla 2HRG de la lacasa de *Trametes trogii* (97% de identidad de secuencia con ChU-B); el modelo de ThLc se tomó de la estructura PDB ID:3FPX.

Figura 2.

(A) Esquema mostrando el prototipo del bioánodo basado en ThLc.

(B) CVs (voltamogramas cíclicos) para la reducción de O_2 : (a) respuesta de fondo dada por un electrodo sin enzimas (NH_2 -LDG), (b) respuesta inicial de un electrodo de ThLc-LDG, (c) respuesta tras un experimento de producción anódica de O_2 , (d) respuesta del electrodo tras 18 h de regeneración.

(C) CVs de oxidación del agua: (a) respuesta inicial de un electrodo de NH_2 -LDG, (b) primer ciclo de un electrodo de ThLc-LDG recién preparado, (c) segundo ciclo de un electrodo de ThLc-LDG recién preparado, (d) primer ciclo de un electrodo de ThLc-LDG tras 18 horas de regeneración, (e) segundo ciclo de un electrodo de ThLc-LDG tras 18 horas de regeneración.

(D) CVs cíclicos de oxidación de agua en presencia de 30 mM NaF: (a) electrodo NH_2 -LDG, (b) primer ciclo del electrodo ThLc-LDG, (c) segundo ciclo del electrodo ThLc-LDG.

Figura 3. (A) CVs (voltamogramas cíclicos) mostrando el primer (línea sólida) y el segundo (línea a rayas) ciclo de (a) electrodo NH_2 -LDG, (b) primer ciclo del electrodo ChU-B-LDG, (c) electrodo de ChU-B-LDG tras una chronoamperometría de 30 minutos a un potencial constante de +1,2 V vs. NHE.

(B) Cronoamperometrías para (a) electrodo NH_2 -LDG, (b) electrodo ThLc-LDG, (c) electrodo ChU-B-LDG.

Figura 4. Método enzimático diseñado para la determinación de $[O_2]$ y $[H_2O_2]$.

Figura 5. Alineamiento de secuencias de ChU-B y ThLc. Las posiciones conservadas se marcan con un asterisco. Los puntos indican que se conserva la polaridad del aminoácido.

Figura 6. CVs (voltamogramas cíclicos) para la reducción de O_2 tomados usando un electrodo de ChU-B-LDG (línea a rayas) y un electrodo de aminoaryl-LDG (línea sólida) de +0,9 V a +0,2 V vs. NHE a una velocidad de 10 mV/s en tampón acetato 100 mM a pH 4,2, conteniendo 100 mM de perclorato sódico enriquecido en O_2 por borboteo durante 10 minutos antes de la medida.

Figura 7. CVS (voltamogramas cíclicos) para la reducción de O_2 tomados usando un electrodo de ThLc-LDG antes (línea sólida) y después (línea a rayas) de una chronoamperometría de 30 minutos medida a un potencial de +1,2 V vs. NHE. Las medidas se realizaron desde +1V hasta 0,2V vs. NHE a una velocidad de 10 mV/s en tampón acetato 100 mM a pH 4,2, conteniendo 100 mM de perclorato sódico enriquecido en O_2 por borboteo durante 10 minutos antes de la medida.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Tal y como se indica arriba, la presente invención se relaciona con el uso de una lacasa para la catálisis de la generación electrocatalítica del oxígeno molecular O₂ a partir del agua. Preferentemente, la lacasa se inmoviliza sobre el ánodo.

En el marco de la presente invención “inmovilizada” significa unida covalentemente al ánodo, adsorbida sobre el ánodo, inmovilizada electrostáticamente sobre el ánodo, unida mediante quelatos al ánodo, unida por monocapas autoensambladas, diazotación, procesos de “click-chemistry”, uniones avidina-biotina, formación de enlaces con maleimida, formación de un recubrimiento sobre el ánodo, secada sobre el ánodo, encerrada en un liposoma que se inmoviliza sobre el ánodo, o por el uso de un polímero y/o un agente de entrecruzamiento.

El ánodo contiene un material electroconductor seleccionado de uno, más de uno, o un compuesto/mezcla de grafito (incluyendo grafito de baja densidad (LDG), grafito espectroscópico, grafito pirolítico altamente ordenado, carbono vítreo, etc.), óxido de manganeso, fibras de carbono, carbono activo, negro de carbono, biocarbón, fibras de carbono, partículas de carbono, láminas de carbono, grafeno, óxido de grafeno, óxido de grafeno reducido, nanotubos de carbono, platino, acero inoxidable, iridio, oro, germanio, plata, cobre, molibdeno, óxido de indio y estaño, óxido de estaño dopado con flúor, diamante dopado con boro, etc. La superficie de dicho ánodo puede ser modificada con el fin de facilitar la inmovilización de la enzima en su superficie.

En una configuración preferida, “inmovilizada” significa unida covalentemente al ánodo.

En una configuración particular, el electrodo contiene grafito de baja densidad, grafito de baja densidad dopado con nanopartículas de oro, electrodo de oro modificado con nanopartículas de oro; en una configuración particular, el grafito de baja densidad (LDG) se modifica con grupos aminoarilo, aminonaftoico, aminoantraceno o aminas alifáticas [*Gutierrez-Sanchez, C et al., Electrochimica Acta (2012), 82, 218-23; Gutierrez-Sanchez, C et al., JACS (2012), 134 (41), 17212-20*], aquí incluidas como referencia], monocapas mixtas incluyendo 10-50% de grupos amina primaria y completadas con uno o más grupos funcionales que pueden seleccionarse de, pero no restringido a, hidroxilos, carbonilos, carboxilos, amidas y tioles. En una configuración preferente, el LDG se modifica con grupos aminoarilo.

La lacasa se puede modificar adecuadamente antes de la inmovilización sobre el electrodo, de modo que se facilite el enlace covalente. Por ejemplo, una lacasa se puede modificar con grupos aldehído en su superficie antes de su inmovilización; esto se puede hacer, por ejemplo, por tratamiento con NaIO₄ [*Gupta, G et al. Electroanalysis (2004), 16 (13-14), 1182-5*, aquí incluida como referencia]. En el caso del LDG modificado con grupos aminoarilo, la enzima se puede inmovilizar sobre el electrodo por formación de un enlace imino, y entonces unirla

covalentemente al mismo por enlace carbodiimida.

Un método adicional para inmovilizar la enzima sobre el electrodo puede ser el uso de inmovilización dirigida, por ejemplo via “click chemistry”, la introducción de grupos químicos únicos en estructuras proteicas por medio de aminoácidos no naturales, especialmente aminoácidos funcionalizados con azidas, o la modificación de grupos existentes dentro de los aminoácidos originales, facilita la formación de enlaces covalentes con la superficie del electrodo, modificado por ejemplo con grupos alquino o ester, por medio de la reacción conocida como ligado de Staudinger.

Cuando la lacasa se inmoviliza sobre el electrodo usando un polímero y un agente de entrecruzamiento, ejemplos de polímeros adecuados que pueden usarse para inmovilizar la enzima incluyen polivinil imidazol, polialilamina, poliaminoácidos (poli-lisina, etc), polipirrol, ácido poli-actílico, polivinil alcohol, polietilenimina, polivinilpirrolidona, polivinilpiridina, etc. Agentes de entrecruzamiento adecuados incluyen, pero no se limitan, al éter polietilenglicol diglicidil, glutaraldehido, etc. Se pueden encontrar más detalles en WO2011/145000, incluido aquí como referencia.

Para un experto en el estado de la técnica serán evidentes otros medios de inmovilizar la enzima sobre el electrodo.

De acuerdo con una configuración particular, la lacasa de la invención es una lacasa de hongo, por ejemplo la fuente de la lacasa de origen micótico. Ejemplos de ello, pero no limitados a éstos, son *Trametes hirsuta*, *Trametes versicolor*, *Trametes trogii*, *Trametes villosa*, *Rhus vernificera*, PM1. Preferentemente es *Trametes hirsuta*.

Preferiblemente, la lacasa es de alto potencial redox, teniendo un valor de E^0 para el sitio T1 entre 700 y 800 mV frente a NHE [Reinhammar, BRM et al., *Biochim. Biophys. Acta* (1972), 275, 245–59; Xu, F et al., *Biochim. Biophys. Acta* (1996), 1292, 303–11; Koroleva, OV et al., *Biochemistry* (2001), 66, 618–22], en una configuración particular entre 730 y 780 mV frente a NHE.

Preferiblemente, la lacasa es resistente a aniones. Las lacasas pueden diseñarse y modificarse específicamente para evitar los inhibidores aniónicos, por ejemplo haluros e hidroxilos. Un ejemplo es ChU-B [Mate, DM et al., *Chem. Biol.* (2013), 20 (2), 223–31] (SEQ ID NO 2). Semejante propiedad se puede alcanzar por modificación de la esfera de coordinación primaria y secundaria del sitio del cobre T1, modificación de la esfera de coordinación primaria y secundaria del cluster T2/T3, el camino de transferencia electrónica intramolecular que une el sitio T1 y el T2/T3 y/o los aminoácidos involucrados en los canales de acceso bien del sitio T1 o del T2/T3.

En una realización preferida, al menos el 40% de las lacasas se inmovilizan con el sitio T2/T3 orientado hacia el electrodo. Esto significa que la distancia desde el cluster T2/T3 hasta la superficie del electrodo es suficientemente pequeña como para comunicar eléctricamente y permitir la transferencia de electrones sin necesitar un mediador. En configuraciones particulares, al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% de las lacasas están inmovilizadas con su cluster T2/T3 mirando al electrodo, o incluso la totalidad, por ejemplo el 100%. Esto se puede lograr por la inmovilización covalente de la lacasa a través de los residuos cercanos al canal de entrada del sitio T2/T3 a los grupos funcionales de la superficie del electrodo.

En una realización particular, la lacasa es la procedente de *Trametes hirsuta* o una que tenga una alta identidad con esta la casa, por ejemplo, la lacasa comprende:

- a) la secuencia SEQ ID NO 1; o
- b) una variante de la secuencia de a) que tenga al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO 1, basada en la identidad de la totalidad de los aminoácidos de dicha secuencia.

En el marco de la presente invención, el término “% de identidad de secuencia” en relación con las secuencias de aminoácidos significa el porcentaje determinado por el uso del siguiente método: el alineamiento de dos secuencias de aminoácidos uno con otro o de dos secuencias de ácidos nucleicos una con otras se llevan a cabo por el siguiente servicio <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> donde los ajustes son los que se proporcionan por defectos en <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>.

De acuerdo con las realizaciones preferidas, la identidad de la secuencia a la SEQ ID NO 1 es al menos 77%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99%. En un caso particular, la lacasa comprende la secuencia SEQ ID NO 1.

De acuerdo con una realización particular, la lacasa es el mutante modificado genéticamente ChU-B [*Mate, DM et al., Chem. Biol. (2013), 20 (2), 223-31*], por ejemplo, la lacasa comprende:

- a) la secuencia SEQ ID NO 2; o
- b) una variante de la secuencia de a) que tenga al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO 2, basada en la identidad de la totalidad de los aminoácidos de dicha secuencia.

De acuerdo con las realizaciones preferidas, la identidad de la secuencia a la SEQ ID NO 2 es al menos 77%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99%. En una realización particular, la lacasa comprende la secuencia SEQ ID NO 2.

Una realización adicional de la invención es un electrodo enzimático válido para la generación

de O₂ a partir de agua o capaz de catalizar la generación electrolítica de O₂, caracterizado de modo que contenga un miembro base electroconductor y al menos una enzima inmovilizada, seleccionada de la familia de enzimas de las lacasas, de acuerdo con cualquiera de las definiciones dadas anteriormente. El electrodo puede contener una lacasa o más de una lacasa.

Preferentemente la lacasa se une covalentemente al miembro base electroconductor. Detalles adicionales para esto se han dado anteriormente. Análogamente, en una configuración preferida, el electrodo comprende LDG modificado con grupos aminoarilo y la lacasa se ha modificado con residuos aldehído sobre su superficie antes de su inmovilización sobre el ánodo, por ejemplo con tratamiento con NaIO₄, la lacasa entonces es unida al electrodo mediante un enlace amida formado usando un derivado de carbodiimida.

El electrodo enzimático tal y como se define arriba puede contener, además de una o más lacasas, al menos un catalizador adicional, seleccionado entre PSII (fotosistema II) inmovilizado, peroxidasas, superoxidasas, microperoxidasas, catalasas, oxidasas, complejos organometálicos de rutenio [por ejemplo, *J Am Chem Soc.* 2014 Apr 3. [Epub ahead of print], *Electrocatalytic Water Oxidation by a Monomeric Amidate-Ligated Fe(III)-Aqua Complex*, Coggins MK et al], cobalto y hierro [por ejemplo, *Chen, Z et al., JACS (2010), 132 (50), 17670–3*], al igual que partículas metálicas, tales como platino, oro o paladio, etc.

Otro aspecto de la invención es un método para la generación electrolítica de oxígeno a partir de agua, conteniendo el paso de poner el agua en contacto con un cátodo y un ánodo, cuando la enzima, seleccionada de la familia de enzimas de las lacasas, de acuerdo con cualquiera de las definiciones dadas anteriormente, se inmoviliza sobre el ánodo. Es importante que este método pueda llevarse a cabo sin la necesidad de luz solar, a diferencia de PSII, la única enzima conocida hasta la fecha capaz de catalizar la generación electrolítica de O₂ a partir de agua. Cualquiera de las definiciones anteriores de la lacasa, el material del electrodo o ánodo y los métodos de inmovilización de la lacasa sobre el ánodo descritos arriba se pueden aplicar en este método.

De acuerdo con una realización preferida, la lacasa se une covalentemente al ánodo. Los detalles de esta etapa han sido proporcionados anteriormente, y se pueden aplicar al método ya mencionado.

Un aspecto adicional de la invención es la celda electrolítica que comprende:

- un contenedor para contener o recibir agua, y
- al menos un electrodo de acuerdo con las definiciones dadas arriba.

Preferentemente, el potencial eléctrico aplicado a la celda electrolítica mencionada está entre 1,23 V y +1,48 V, de acuerdo con las configuraciones particulares del potencial eléctrico está entre +1,23 V y +1,4 V, entre +1,23 V y +1,35 V, entre +1,23 V y +1,30 V o entre +1,23 V y +1,25 V.

La presente invención también se relaciona con un aparato para separar agua electrocatalíticamente, donde el aparato comprende:

-una o varias celdas, tal y como se describen arriba.

De acuerdo con configuraciones particulares adicionales, la lacasa comprende:

a) cualquiera de las secuencias SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 16, SEQ ID NO 17; o

b) una variante de cualquiera de las secuencias entre SEQ ID NO 3 a SEQ ID NO 17 de a), teniendo al menos un 70% de identidad de secuencia a cualquiera de las secuencias entre SEQ ID NO 3 a SEQ ID NO 17, basadas en la identidad de la totalidad de los aminoácidos de dicha secuencia.

De acuerdo con las realizaciones preferidas, la identidad de secuencia a cualquiera de las secuencias entre SEQ ID NO 3 a SEQ ID NO 17 es, al menos 77%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99%. En un caso particular, la lacasa comprende cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO 3 a SEQ ID NO 17.

La SEQ ID NO 17 es la secuencia de la lacasa de *Trametes hirsuta* de acuerdo con EMBL, tal y como se recoge a través de la *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) a fecha de Abril, 10, 2014, con "UniProt Accession Lumber" B2L9C1.

A continuación se describen como ejemplos ilustrativos no limitantes de la presente invención

EJEMPLOS

MATERIALES

Lacasas

Se han utilizado como biocatalizadores dos lacasas de hongo diferentes:

Enzima nativa de *Trametes hirsuta* (de aquí en adelante ThLc)

Una mutante del basidiomicete PM1 evolucionado en laboratorio, ChU-B18 (de aquí en adelante (CHU-B).

Las lacasas se trataron con 10 mg/mL de NaIO_4 durante 45 minutos para proveer de grupos aldehído su superficie y luego fueron inmovilizadas sobre un electrodo de LDG funcionalizado con grupos amino por la formación de un enlace imina. Posteriormente, la enzima se unió covalentemente al electrodo usando enlace con carbodiimida (ver más abajo).

Las secuencias de las lacasas de *Trametes hirsuta* y de ChU-B se alinearon con el software T-COFFEE (Fig 5).

Electrodos

Se usaron barras de grafito LDG de 3 mm de diámetro (Sigma-Aldrich) como electrodos de trabajo, y se modificaron con grupos aromáticos terminados en aminas siguiendo un procedimiento conocido que sirve para unir las lacasas de manera orientada y covalente al electrodo de grafito [Gutierrez-Sanchez, C et al., *Electrochimica Acta* (2012), 82, 218-23].

MÉTODOS

Las medidas electroquímicas se llevaron a cabo en una celda de tres electrodos. Los voltamogramas cíclicos (CVs) de los electrodos modificados para la reducción de O_2 se tomaron entre +1 V y +0,2 V frente al electrodo normal de hidrógeno (NHE) a una velocidad de 10 mV/s en un medio 100 mM de acetato sódico a pH 4,2, conteniendo 100 mM de NaClO_4 como electrolito y enriquecido por borboteo de O_2 durante 10 minutos antes de realizar la medida. Los voltamperogramas anódicos se grabaron usando tampón fosfato 20 mM a pH 7,4, conteniendo 100 mM NaClO_4 y bajo una atmósfera de N_2 . Los CVs para un electrodo ThLc-LDG se tomaron entre +0,5 V y +1,2 V a una velocidad de 10 mV/s. Los CVs para un electrodo ChU-B-LDG se tomaron entre +0,7 V y +1,4 V a una velocidad de 10 mV/s. Las medidas de cronoamperometría se grabaron durante 30 minutos a un potencial de +1,2 V vs. NHE.

La cuantificación del O_2 y el H_2O_2 producido se llevó a cabo dentro de una cámara anaerobia (MBraun, $\text{O}_2 < 0,1$ ppm) mediante la medida de una cronoamperometría durante 30 minutos a un potencial de +1,2 V vs. NHE en una disolución de 3 mL de tampón fosfato 20 mM, pH = 7,4, conteniendo 100 mM NaClO_4 . Tras la medida, el volumen de celda se dividió entre tres cubetas para UV-VIS, cada una de ellas completada con (a) 400 μl de tampón conteniendo ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (Sigma-Aldrich) con una concentración final

de 0,65 mM; (b) 400 μ l de tampón conteniendo ABTS) con una concentración final de 0,65 mM, 1 unidad de peroxidasa de rábano tipo VI (HRP)(Sigma Aldrich); y (c) 400 μ l de tampón conteniendo ABTS) con una concentración final de 0,65 mM, 1 unidad de HRP, glucosa (3,6 mM concentración final), y 1 unidad de glucosa oxidasa (GOx) de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich). Las cubetas se sellaron con un tapón Septum después de la mezcla, se agitó el contenido durante 30s hasta que las reacciones enzimáticas se completaron y finalmente se sacaron de la cámara anaerobia directamente al espectrofotómetro UV-VIS. La cantidad de ABTS oxidado se midió a 405 nm, usando un coeficiente de extinción molar de $38,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Para cada experimento la cubeta (a) nos daba la medida del blanco, la (b) se relacionaba con la concentración de H_2O_2 y (c) – (b) se relacionaba con la concentración de O_2 (Fig 4). Las medidas se realizaron para 4 electrodos NH_2 -LDG, 3 ThLc-LDG, and 3 ChU-B-LDG, 3 electrodos ThLc-LDG y 3 electrodos ChU-B-LDG.

Lacasa Trametes hirsuta, ThLc

Ejemplo 1:

La lacasa nativa de alto potencial redox ThLc se unió a electrodos de LDG modificados con grupos aminoarilo (ThLc-LDG) [Gutierrez-Sanchez, C et al., *Electrochimica Acta* (2012), 82, 218-23; Gutierrez-Sanchez, C et al., *JACS* (2012), 134 (41), 17212-20] (Fig. 1). El LDG tiene un alto sobrepotencial para la producción de O_2 en un experimento electrolítico, en particular cuando se compara con Pt o incluso con Au, de ahí que los resultados se puedan atribuir a la presencia de la lacasa en su superficie.

Ejemplo 2:

La actividad estándar de reducción de O_2 a pHs ácidos se determinó por CV para electrodos de ThLc-LDG. Bajo estas condiciones se obtiene una corriente típicamente bioelectrocatalítica de aproximadamente 30 microamperios (Figura 2B, curva b), indicando que la lacasa inmovilizada era bioelectrocatalíticamente activa para la electrorreducción de O_2 .

Ejemplo 3:

El electrodo ThLc-LDG se introdujo en una celda con tampón fosfato a pH 7,4, en el que la enzima se inhibe para la reducción de O_2 [Shleev, S et al., *Biosens. Bioelectron.* (2005), 20 (12), 2517-54; Clot, S et al., *Electrochemistry Communications* (2012), 18, 37-40] pero la producción del mismo debería estar favorecida termodinámica y cinéticamente. Una medida de CV mostró una onda anódica que comenzaba a 0,95 V frente a NHE, lo que está bastante cerca del potencial de equilibrio redox para el par $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ bajo estas condiciones (ver arriba), llegando a 80 microamperios a +1,2 V (Figura 2C, curva b). Los ciclos siguientes causaron un

descenso en la señal en comparación con el primer ciclo, aunque aún se obtuvieron valores de corriente de aprox. 50 microamperios a +1,2 V (Figura 2B, curva C).

Ejemplo 4:

Se realizaron varios experimentos control. Se comprobó que la producción de O₂ por parte del electrodo modificado con enzima en presencia de NaF 30 mM, un inhibidor natural para el proceso de reducción catalizado por ThLc, no se inhibía. La intensidad de corriente bajo 30 mM de NaF es comparable a la de un experimento típico a pH 7,4 en ausencia de NaF (curva b en Figs. 2C y 2D).

Ejemplo 5:

Como la actividad de ThLc se ve mermada tras varios ciclos de oxidación de agua, se aplicó un periodo de descanso en las condiciones óptimas para la reducción de O₂, i.e. el tampón acetato a pH 4,2 mencionado anteriormente, consiguiendo restaurar parcialmente la actividad (Figura 2B, curva d).

Lacasa mutante ChU-B

La lacasa mutante de alto potencial redox ChU-B [Mate, DM et al., Chem. Biol. (2013), 20 (2), 223-31] se diseñó específicamente para evitar la inhibición por parte de aniones, tales como haluros e hidroxilos, con una identidad de secuencia del 77% y una similaridad del 83% vs. ThLc (Figura 1). Este mutante es el producto de varios ciclos de evolución y aproximaciones híbridas para adaptar la enzima a las condiciones de inclemencia propias de la sangre humana (pH 7,4, con altas concentraciones de cloruros) (Figura 5).

Ejemplo 6:

Usando la misma estrategia descrita para la inmovilización de ThLc descrita anteriormente en el ejemplo 1, la lacasa ChU-B se unió covalentemente a la superficie de un electrodo modificado con grupos aminoarilo.

Ejemplo 7:

El electrodo ChU-B-LDG se probó en primer lugar para la reducción de O₂ en las mismas condiciones que el electrodo ThLc-LDG por comparación, de acuerdo con el ejemplo 2 descrito arriba (Figura 6). Los resultados electroquímicos demostraron que la transferencia electrónica directa desde el electrodo al sitio T1 de la enzima está menos favorecida que para el sitio T2/T3, de acuerdo con resultados previos para los electrodos ChU-B-LDG [Mate, DM et al., Chem. Biol. (2013), 20 (2), 223-31].

Ejemplo 8:

Los CVs anódicos con el electrodo ChU-B-LDG a pH 7,4, siguiendo el mismo método descrito en el ejemplo 3 anteriormente, mostraron mayores corrientes anódicas que aquellos registrados para el electrodo ThLc-LDG (Figura 3A, curva b). La Figura 3B muestra medidas de cronoamperometría típicas para electrodos ChU-B-LDG y ThLc-LDG, mientras que el resultado obtenido para electrodos de LDG modificados con aminoarilos (NH_2 -LDG) se muestra como control. Se puede apreciar que ambos electrodos modificados con enzimas ofrecen unas corrientes de oxidación mucho mayores que el electrodo control.

Ejemplo 9:

La regeneración y durabilidad de los electrodos modificados fue evaluada. El electrodo de ThLc-LDG mantuvo una corriente anódica significativa medida por CV, típicamente $70 \pm 10\%$ de la inicial, a lo largo de tres experimentos. Entre cada experimento se llevó a cabo una etapa de regeneración mediante la inmersión durante un tiempo igual o superior a 1h en tampón acetato 100 mM pH 4,2. Los electrodos de ChU-B-LDG se midieron a lo largo de tres días, y tratándolos con la misma etapa de regeneración. De manera adicional, se compararon los Cvs antes y después de un proceso de cronoamperometría similar al que se muestra en la Figura 3B. Estos experimentos mostraron una desventaja para los electrodos de ThLc-LDG, ya que su actividad se vió diezmada para su actividad estándar de electrorreducción de O_2 (Figura 6); por el contrario, el electrodo de ChU-B-LDG mantuvo una alta respuesta anódica tras la cronoamperometría (Figura 3A, curva c).

Ejemplo 10:

La detección colorimétrica de los posibles productos (H_2O_2 y O_2) basada en un método enzimático se llevó a cabo por triplicado para corroborar los resultados electroquímicos. La cuantificación de los productos se llevó a cabo dentro de una cámara anaeróbica mediante una medida cronoamperométrica de 30 minutos aplicando un potencial de +1,2 V vs NHE en una disolución de 3 mL de tampón fosfato a pH 7,4 (Figura 3B). Tras cada experimento, la disolución de la celda se separó en tres cubetas de UV-VIS para medir bien el espectro del blanco, el H_2O_2 producido o el O_2 producido por los electrodos enzimáticos (Figura 4). Aproximadamente se obtuvo una concentración de O_2 disuelto de $3 \mu\text{M}$, mientras que en el experimento control se detectó en promedio 5 veces menos O_2 . Además, el peróxido detectado en todos los casos es comparable, de modo que se ser atribuida a la producción no enzimática de H_2O_2 por el grafito. Los resultados indican claramente la habilidad de los electrodos de grafito modificados con lacasa para producir mayoritariamente O_2 a pH neutro mediante la aplicación de un potencial de +1,2 V frente a NHE.

Muestra	[O ₂] / μM	[H ₂ O ₂] / μM	Eficiencia coulombica
NH ₂ -LDG	0,6 ± 0,4	0,5 ± 0,3	----
ThLc-LDG	3±1	0,5±0,5	0,11
ChU-B-LDG	2,9±0,7	0,4±0,5	0,16

Tabla 1. [O₂] y [H₂O₂] producido por cada tipo de electrodo durante una medida de cronoamperometría típica, eficiencia coulombica para la formación de O₂.

SECUENCIAS

SEQ ID NO 1

AVGPVADLTITDAAVSPDGF SRQAVVNGVTPGPLVAGNIGDRFQLNVIDNL TNHTMLKSTSIH
 WHGFFQHGTNWADGPAFINQCPISPGHSFLYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPV
 VYDPNDPHASRYDVDNDDTVITLADWYHTAAKLGPRFPGGADATLINGKGRAPSDSVAELSVI
 KVTKGKRYRFRLVSLSCNPNTFSIDGHNLTIIEVDSVNSQPLEVDSIQIFAAQRYSFVLDANQA
 VDNWIRANPNFGNVGFDGGINSAILRYDGAPAVEPTTNQTTSVKPLNEVDLHPLVSTPVPGS
 PSSGGVDKAINMAFNFNFSNFFINGASFVPPTVPVLLQILSGAQTAQDLLPSGSVYVLPNASIE
 ISFPATAAAPGAPHPFHLHGHTFAVRSAGSTVYNYDNPIFRDVVSTGTPAAGDNVTIRFDTN
 PGPWFLHCHIDFHLEGGFAVMAEDTPDVKAVNPVPQAWSDLCPTYDALDPNDQ

SEQ ID NO 2

EFSIGPVADLTISNGAVSPDGF SRQAILVNDVFPSPPLITGNKGDRFQLNVIDNMTNHTMLKSTSI
 HWHGFFQHGTNWADGPAFVNQCPISTGHAFLYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPV
 VVYDPQDPHKSLYDVDDDSTVITLADWYHLAAKVGPAAPTADATLINGLGRSINTLNADLAVITV
 TKGKRYRFRLVSLSCDPNYTFSIDGHSLTVIEADGVNLKPQTVDSIQIFPAQRYSFVLNADQDVD
 NYWIRALPNSGTRNFDGGVNSAILRYEGAAPVEPTTTQTPSTQPLVESALTTLEGTAAPGNPTP
 GGVDLALNMAFGFAGGRFTINGASFTPTVPVLLQILSGAQAQDLLPSGSVYSLPANADIEISL
 PATSAAPGFPHPIHLHGHTFAVRSAGSSTYNYANPVYRDVVNTGSPGDNV TIRFRDNP GPW
 FLHCHIDEHLEAGFTVMAEDIPDVAATNPVPQAWSDLCPTYDALSPDDQ

SEQ ID NO 3

SIGPVADLTISNGAVSPDGF SRQAILVNDVFPSPPLITGNKGDRFQLNVIDNMTNHTMLKSTSIHW
 HGFFQHGTNWADGPAFVNQCPISTGHAFLYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVYVY

DPQDPHKSLYDVDDDSTVITLADWYHLAAKVGPAAPTADATLINGLGRSINTLNADLAVITVTKG
KRYRFRLVSLSCDPNYTFSIDGHSLTVIEADGVNLPKQTVDSIQIFPAQRYSFVLNADQDVDNY
WIRALPNSGTRNFDGGVNSAILRYEGAAPVEPTTTQTPSTQPLVESALTTLEGTAAPGNPTPG
GVDLALNMAFGFAGGRFTINGASFTPPTVPVLLQILSGAQAQDLLPSGSVYSLPANADIEISLP
ATSAAPGFPHPHLHGHTFAVVRSAQSSTYNYANPVYRDVVNTGSPGDNVTIRFRTDNPGPW
FLHCHIDFHLEAGFTVMAEDIPDVAATNPVPQAWSDLCPYDALSPDDQ

SEQ ID NO 4

SIGPVADLTISNGAVSPDGF SRQAILVNDVFP SPLITGNKGDRFQLNVIDNMTNHTMLKSTSIHW
HGFFQHGTNWADGPAFVNQCPISTGHAFLYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVIVY
DPQDPHKSLYDVDDDSTVITLADWYHLAAKVGPAAPTADATLINGLGRSINTLNADLAVITVTKG
KRYRFRLVSLSCDPNYTFSIDGHSLTVIEADGVNLPKQTVDSIQIFPAQRYSFVLNADQDVDNY
WIRALPNSGTRNFDGGVNSAILRYEGAAPVEPTTTQTPSTQPLVESALTTLEGTAAPGNPTPG
GVDLALNMAFGFAGGRFTINGASFTPPTVPVLLQILSGAQAQDLLPSGSVYSLPANADIEISLP
ATSAAPGFPHPIHLHGHTFAVVRSAQSSTYNYANPVYRDVVNTGSPGDNVTIRFRTDNPGPWF
LHCHIDFHLEAGFTVMAEDIPDVAATNPVPQAWSDLCPYDALSPDDQ

SEQ ID NO 5

SIGPVADLTISNGAVSPDGF SRQAILVNDVFP SPLITGNKGDRFQLNVIDNMTNHTMLKSTSIHW
HGFFQHGTNWADGPAFVNQCPISTGHAFLYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVIVY
DPQDPHKSLYDVDDDSTVITLADWYHLAAKVGPAAPTADATLINGLGRSINTLNADLAVITVTKG
KRYRFRLVSLSCDPNYTFSIDGHSLTVIEADGVNLPKQTVDSIQIFPAQRYSFVLNADQDVDNY
WIRALPNSGTRNFDGGVNSAILRYEGAAPVEPTTTQTPSTQPLVESALTTLEGTAAPGNPTPG
GVDLALNMAFGFAGGRFTINGASFTPPTVPVLLQILSGAQAQDLLPSGSVYSLPANADIEISLP
ATSAAPGFPHPIHLHGHTFAVVRSAQSSTYNYANPVYRDVVNTGSPGDNVTIRFRTDNPGPWF
LHCHIDFHLEAGFTVMAEDIPDVAATNPVPQAWSDLCPYDALSPDDQ

SEQ ID NO 6

SIGPVADLTISNGAVSPDGF SRQAILVNDVFP SPLITGNKGDRFQLNVIDNMTNHTMLKSTSIHW
HGFFQHGTNWADGPAFVNQCPISTGHAFLYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVIVY
DPQDPHKSLYDVDDDSTVITLADWYHLAAKVGPAAPTADATLINGLGRSINTLNADLAVITVTKG
KRYRFRLVSLSCDPNYTFSIDGHSLTVIEADGVNLPKQTVDSIQIFPAQRYSFVLNADQDVDNY
WIRALPNSGTRNFDGGVNSAILRYEGAAPVEPTTTQTPSTQPLVESALTTLEGTAAPGNPTPG
GVDLALNMAFGFAGGRFTINGASFTPPTVPVLLQILSGAQAQDLLPSGSVYSLPANADIEISLP
ATSAAPGFPHPIHLHGHTFAVVRSAQSSTYNYANPVYRDVVNTGSPGDNVTIRFRTDNPGPWF
LHCHVDFHLEAGFTVMAEDIPDVAATNPVPQAWSDLCPYDALSPDDQ

SEQ ID NO 7

SIGPVADLTISNGAVSPDGF SRQAILVNDVFP SPLITGNKGDRFQLNVIDNMTNHTMLKSTSIHW
HGFFQHGTNWADGPAFVNQCPISTGHAFLYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVIVY
DPQDPHKS LYDVDDDSTVITLADWYHLAAKVGPAAPTADATLINGLGRSINTLNADLAVITVTKG
KRYRFRLVSLSCDPNYTFSIDGHSLTVIEADGVNLPKQTVDSIQIFPAQRYSFVLNADQDVDNY
WIRALPNSGTRNFDGGVNSAILRYEGAAPVEPTTTQTPSTQPLVESALTTLEGTAAPGNPTPG
GVDLALNMAFGFAGGRFTINGASFTPPTVPVLLQILSGAQAQDLLPSGSVYSLPANADIEISLP
ATSAAPGFPHPIHLHGHTFAVVR SAGSSTYNYANPVYRDV VNTGSPGDNVTIRFR TDNPGPWF
LHCHIDEHLEAGFTV VMAEDIPDVAATNPVPQA WSDLCPTYDALSPDDQ

SEQ ID NO 8

SIGPVADLTISNGAVSPDGF SRQAILVNDVFP SPLITGNKGDRFQLNVIDNMTNHTMLKSTSIHW
HGFFQHGTNWADGPAFVNQCPISTGHAFLYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVIVY
DPQDPHKS LYDVDDDSTVITLADWYHLAAKVGPAAPTADATLINGLGRSINTLNADLAVITVTKG
KRYRFRLVSLSCDPNYTFSIDGHSLTVIEADGVNLPKQTVDSIQIFPAQRYSFVLNADQDVDNY
WIRALPNSGTRNFDGGVNSAILRYEGAAPVEPTTTQTPSTQPLVESALTTLEGTAAPGNPTPG
GVDLALNMAFGFAGGRFTINGASFTPPTVPVLLQILSGAQAQDLLPSGSVYSLPANADIEISLP
ATSAPGFPHPIHLHGHTFAVVR SAGSSTYNYANPVYRDV VDTGSPGDNVTIRFR TDNPGPWFL
HCHIDFHLEAGFTV VMAEDIPDVAATNPVPQA WSDLCPTYDALSPDDQ

SEQ ID NO 9

SIGPVADLTISNGAVSPDGF SRQAILVNDVFP SPLITGNKGDRFQLNVIDNMTNHTMLKSTSIHW
HGFFQHGTNWADGPAFVNQCPISTGHAFLYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVIVY
DPQDPHKS LYDVDDDSTVITLADWYHLAAKVGPAAPTADATLINGLGRSINTLNADLAVITVTKG
KRYRFRLVSLSCNPNYTFSIDGHSLTVIEADGVNLPKQTVDSIQIFPAQRYSFVLNADQDVDNY
WIRALPNSGTRNFDGGVNSAILRYEGAAPVEPTTTQTPSTQPLVESALTTLEGTAAPGNPTPG
GVDLALNMAFGFAGGRFTINGASFTPPTVPVLLQILSGAQAQDLLPSGSVYSLPANADIEISLP
ATSAAPGFPHPIHLHGHTFAVVR SAGSSTYNYANPVYRDV VNTGSPGDNVTIRFR TDNPGPWF
LHCHVDFHLEAGFTV VMAEDIPDVAATNPVPQA WSDLCPTYDALSPDDQ

SEQ ID NO 10

SIGPVADLTISNGAVSPDGF SRQAILVNDVFP SPLITGNKGDRFQLNVIDNMTNHTMLKSTSIHW
HGFFQHGTNWADGPAFVNQCPISTGHAFLYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVIVY
DPQDPHKS LYDVDDDSTVITLADWYHLAAKVGPAAPTADATLINGLGRSINTLNADLAVITVTKG
KRYRFRLVSLSCDPNYTFSIDGHSLTVIEADGVNLPKQTVDSIQIFPAQRYSFVLNADQDVDNY
WIRALPNSGTRNFDGGVNSAILRYEGAAPVEPTTTQTPSTQPLVESALTTLEGTAAPGNPTPG

GVDLALNMAFGFAGGRFTINGASFTPPTVPVLLQILSGAQSAQDLLPSGSVYSLPANADIEISLP
ATSAAPGFPHPIHLHGHTFAVVR SAGSSTYNYANPVYRDVVD TGSPGDNVTIRFRTDNPGPWF
LHCHVDFHLEAGFTV VMAEDIPDVAATNPVPQA WSDLCPTYDALSPDDQ

SEQ ID NO 11

SIGPVADLTISNGAVSPDGFSRQAILVNDVFP SPLITGNKGDRFQLNVIDNMTNHTMLKSTSIHW
HGFFQHGTNWADGPAFVNQCPISTGHAF LYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVIVY
DPQDPHKS LYDVDDDSTVITLADWYHLAAKVGPAAPTADATLINGLGRSINTLNADLAVITVTKG
KRYRFRLVSLSCDPNYTFSIDGHSLTVIEADGVNLKPQTVDSIQIFPAQRYSFVLNADQDVDNY
WIRALPNSGTRNFDGGVNSAILRYEGAAPVEPTTTQTPSTQPLVESALTTLEGTAAPGNPTPG
GVDLALNMAFGFAGGRFTINGASFTPPTVPVLLQILSGAQSAQDLLPSGSVYSLPANADIEISLP
ATSAAPGFPHPIHLHGHTFAVVR SAGSSTYNYANPVYRDVVD TGSPGDNVTIRFRTDNPGPWF
LHCHVDPHLEAGFTV VMAEDIPDVAATNPVPQA WSDLCPTYDALSPDDQ

SEQ ID NO 12

SIGPVADLTISNGAVSPDGFSRQAILVNDVFP SPLITGNKGDRFQLNVIDNMTNHTMLKSTSIHW
HGFFQHGTNWADGPAFVNQCPISTGHAF LYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVIVY
DPQDPHKS LYDVDDDSTVITLADWYHLAAKVGPAAPTADATLINGLGRSINTLNADLAVITVTKG
KRYRFRLVSLSCDPNYTFSIDGHSLTVIEADGVNLKPQTVDSIQIFPAQRYSFVLNADQDVDNY
WIRALPNSGTRNFDGGVNSAILRYEGAAPVEPTTTQTPSTQPLVESALTTLEGTAAPGNPTPG
GVDLALNMAFGFAGGRFTINGASFTPPTVPVLLQILSGAQSAQDLLPSGSVYSLPANADIEISLP
ATSAAPGFPHPIHLHGHTFAVVR SAGSSTYNYANPVYRDVVD TGSPGDNVTIRFRTDNPGPWF
LHCHVDTHLEAGFTV VMAEDIPDVAATNPVPQA WSDLCPTYDALSPDDQ

SEQ ID NO 13

SIGPVADLTISNGAVSPDGFSRQAILVNDVFP SPLITGNKGDRFQLNVIDNMTNHTMLKSTSIHW
HGFFQHGTNWADGPAFVNQCPISTGHAF LYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVIVY
DPQDPHKS LYDVDDDSTVITLADWYHLAAKVGPAAPTADATLINGLGRSINTLNADLAVITVTKG
KRYRFRLVSLSCDPNYTFSIDGHSLTVIEADGVNLKPQTVDSIQIFPAQRYSFVLNADQDVDNY
WIRALPNSGTRNFDGGVNSAILRYEGAAPVEPTTTQTPSTQPLVESALTTLEGTAAPGNPTPG
GVDLALNMAFGFAGGRFTINGASFTPPTVPVLLQILSGAQSAQDLLPSGSVYSLPANADIEISLP
ATSAAPGFPHPIHLHGHTFAVVR SAGSSTYNYANPVYRDVVD TGSPGDNVTIRFRTDNPGPWF
LHCHVDAHLEAGFTV VMAEDIPDVAATNPVPQA WSDLCPTYDALSPDDQ

SEQ ID NO 14

SIGPVADLTISNGAVSPDGFSRQAILVNDVFP SPLITGNKGDRFQLNVIDNMTNHTMLKSTSIHW
HGFFQHGTNWADGPAFVNQCPISTGHAF LYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVIVY

DPQDPHKSLYDVDDDSTVITLADWYHLAAKVGPAAPTADATLINGLGRSINTLNADLAVITVTKG
KRYRFRLVSLSCDPNYTFSIDGHSLTVIEADGVNLPKQTVDSIQIFPAQRYSFVLNADQDVDNY
WIRALPNSGTRNFDGGVNSAILRYEGAAPVEPTTTQTPSTQPLVESALTTLEGTAAPGNPTPG
GVDLALNMAFGFAGGRFTINGASFTPPTVPVLLQILSGAQAQDLLPSGSVYSLPANADIEISLP
ATSAAPGFPHPIHLHGHTFAVVRSA GSSTYNYANPVYRDV VNTGSPGDNVTIRFRTDNPGPWF
LHCHVDGHLEAGFTV VMAEDIPDVAATNPVPQA WSDLCPTYDALSPDDQ

SEQ ID NO 15

SIGPVADLTISNGAVSPDGFSRQAILVNDVFPSPPLITGNKGDRFQLNVIDNMTNHTMLKSTSIHW
HGFFQHGTNWADGPAFVNQCPISTGHAFLYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVIVY
DPQDPHKSLYDVDDDSTVITLADWYHLAAKVGPAAPTADATLINGLGRSINTLNADLAVITVTKG
KRYRFRLVSLSCDPNYTFSIDGHSLTVIEADGVNLPKQTVDSIQIFPAQRYSFVLNADQDVDNY
WIRALPNSGTRNFDGGVNSAILRYEGAAPVEPTTTQTPSTQPLVESALTTLEGTAAPGNPTPG
GVDLALNMAFGFAGGRFTINGASFTPPTVPVLLQILSGAQAQDLLPSGSVYSLPANADIEISLP
ATSAAPGFPHPIHLHGHTFAVVRSA GSSTYNYANPVYRDV VNTGSPGDNVTIRFRTDNPGPWF
LHCHVDRHLEAGFTV VMAEDIPDVAATNPVPQA WSDLCPTYDALSPDDQ

SEQ ID NO 16

SIGPVADLTISNGAVSPDGFSRQAILVNDVFPSPPLITGNKGDRFQLNVIDNMTNHTMLKSTSIHW
HGFFQHGTNWADGPAFVNQCPISTGHAFLYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPVIVY
DPQDPHKSLYDVDDDSTVITLADWYHLAAKVGPAAPTADATLINGLGRSINTLNADLAVITVTKG
KRYRFRLVSLSCDPNYTFSIDGHSLTVIEADGVNLPKQTVDSIQIFPAQRYSFVLNADQDVDNY
WIRALPNSGTRNFDGGVNSAILRYEGAAPVEPTTTQTPSTQPLVESALTTLEGTAAPGNPTPG
GVDLALNMAFGFAGGRFTINGASFTPPTVPVLLQILSGAQAQDLLPSGSVYSLPANADIEISLP
ATSAAPGFPHPIHLHGHTFAVVRSA GSSTYNYANPVYRDV VDTGSPGDNVTIRFRTDNPGPWF
LHCHIDSHLEAGFTV VMAEDIPDVAATNPVPQA WSDLCPSYDALSPDDQ

SEQ ID NO 17

MSRFQSLLTFINISLVAVAHAAVGPVADLTITDAAVSPDGFSRQAVVWNGVTPGPLVAGNIGDRF
QLNVIDNLTNHTMLKSTSIHWHGFFQHGTNWADGPAFINQCPISPGHSFLYDFQVPDQAGTFW
YHSHLSTQYCDGLRGPVIVYDPNDPHASRYDVDNDDTVITLADWYHTAAKLGPRFPGGADAT
LINGKGRAPSDSPAELSVIKVTKGKRYRFRLVSLSCPNHTFSIDGHNLTIIEVDSVNSQPLEVD
SIQIFAAQRYSFVLNANQAVDNYWIRANPNFGNVGFDGGINSAILRYDGAPAVEPTTNQTTSVK
PLNEVDLHPLVSTPVP GSPSSGGVDKAINMAFNFN GSNFFINGASFVPPTVPVLLQILSGAQA
QDLLPSGSVYVLP SNASIEISFPATAA APGAPHPFHLHGHTFAVVRSA GSTVYNYDNPIFRD VV
STGTPAAGDNVTIRFD TNNPGPWFLHCHIDFHLEGGFAV VMAEDTPDKAVNPVPQA WSDLC
PTYDALDPNDQ

REIVINDICACIONES

1. Uso de una lacasa para catalizar la generación electrocatalítica de O₂ molecular a partir de agua.
2. Uso de una lacasa de acuerdo a la reivindicación 1, donde la lacasa se inmoviliza en el ánodo.
3. Uso de una lacasa de acuerdo con la reivindicación 2, donde la lacasa está unida covalentemente al ánodo, adsorbida sobre el ánodo, inmovilizada electrostáticamente sobre el ánodo, unida por medio de quelatos al ánodo, unida por monocapas autoensambladas, inmovilizada sobre el ánodo por diazotación, inmovilizada sobre el ánodo por procesos de *click-chemistry*, unida por avidina-biotina, mediante la formación de enlaces maleimida, mediante la formación de un recubrimiento sobre el ánodo, secada sobre el ánodo, incluida en un liposoma que se inmoviliza sobre el ánodo, o por medio de un polímero y/o un agente de entrecruzamiento.
4. Uso de una lacasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3, donde la lacasa se une covalentemente al ánodo.
5. Uso de una lacasa de acuerdo con la reivindicación 4, donde el electrodo incluye grafito de baja densidad modificado con grupos aminoarilo.
6. Uso de una lacasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 2 a la 5, donde la lacasa está provista de residuos aldehído sobre su superficie antes de la inmovilización sobre el ánodo.
7. Uso de una lacasa de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 6, donde la lacasa es una lacasa fúngica.
8. Uso de una lacasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 7, donde la lacasa tiene un potencial para el sitio T1 entre 730 y 780 mV.
9. Uso de una lacasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 8, donde la lacasa es resistente a aniones.
10. Uso de una lacasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 2 a la 9, donde el cluster T2/T3 de la lacasa inmovilizada está orientado hacia el electrodo.
11. Uso de una lacasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 10, donde la lacasa comprende:

a) la secuencia SEQ ID NO 1; o

b) una variante de la secuencia de a) que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia a la SEQ ID NO 1, basándose en la identidad de la totalidad de los aminoácidos de dicha secuencia.

12. Uso de una lacasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 11, donde la lacasa comprende la secuencia SEQ ID NO 1.

13. Uso de una lacasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 10, donde la lacasa comprende:

a) la SEQ ID NO 2; o

b) una variante de la secuencia de a) que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO 2, basándose en la identidad de la totalidad de los aminoácidos de dicha secuencia.

14. Uso de una lacasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 10 y la 13, donde la lacasa comprende la secuencia SEQ ID NO 2.

15. Uso de una lacasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 10, donde la lacasa comprende:

a) cualquiera de las secuencias SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 12, SEQ ID NO 13, SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15, SEQ ID NO 16, SEQ ID NO 17; o

b) una variante de cualquiera de las secuencias de la SEQ ID NO 3 a la SEQ ID NO 17 de a), que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO 3 a la SEQ ID NO 17, basándose en la identidad de la totalidad de los aminoácidos de dicha secuencia.

16. Un electrodo enzimático adecuado para la generación electrolítica de oxígeno molecular O₂ a partir de agua, caracterizado por comprender un soporte electroconductor y, al menos, una enzima inmovilizada, seleccionada de la familia de enzimas de las lacasas, tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones de la 5 a la 7 y de la 9 a la 13.

17. Un electrodo de acuerdo con la reivindicación 16, donde la lacasa está unida covalentemente al electrodo, adsorbida sobre el electrodo, inmovilizada electrostáticamente sobre el electrodo, unida por medio de quelatos al electrodo, unida por monocapas autoensambladas, inmovilizada sobre el electrodo por diazotación, inmovilizada sobre el electrodo por procesos de *click-chemistry*, unida por avidina-biotina, unida mediante la

formación de enlaces maleimida, formando un recubrimiento sobre el electrodo, secada sobre el electrodo, incluso en un liposoma que se inmoviliza sobre el ánodo, o por medio de un polímero y/o un agente de entrecruzamiento.

18. Un electrodo de acuerdo con las reivindicaciones 16 y 17, donde la lacasa está unida covalentemente al miembro soporte electroconductor.

19. Un electrodo de acuerdo con las reivindicaciones de la 16 a la 18, donde el electrodo incluye grafito de baja densidad con grupos aminoarilo.

20. Un electrodo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 16 a la 19, el cual contiene al menos un catalizador adicional, seleccionado del fotosistema II inmovilizado, peroxidasa, superoxidasa, microperoxidasa, catalasa, oxidasas, complejos organometálicos, de rutenio, cobalto, y/o hierro, y partículas metálicas tales como platino, oro o paladio.

21. Un método para la generación electrolítica de oxígeno a partir de agua, que comprenda un paso en el que se ponga el agua en contacto con el cátodo y el ánodo, donde una enzima, seleccionada de la familia de enzimas de las lacasas, tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones de la 5 a la 7 y de la 9 a la 13, se inmoviliza sobre el ánodo tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 3 a la 6.

22. Un método de acuerdo con la reivindicación 21, donde la lacasa se une covalentemente al ánodo.

23. Una celda electrolítica que comprenda:

- un contenedor para contener o recibir agua, y
- al menos un electrodo tal y como se definen en cualquiera de las reivindicaciones de la 16 a la 20.

24. Una celda electrolítica de acuerdo con la reivindicación 23, donde se aplica un potencial eléctrico entre +1,23 V y +1,45 V.

25. Un aparato para la separación electrocatalítica del agua, donde el aparato contenga:

- una o una pluralidad de celdas tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 23 y 24.

FIGURAS

Figura 1

A

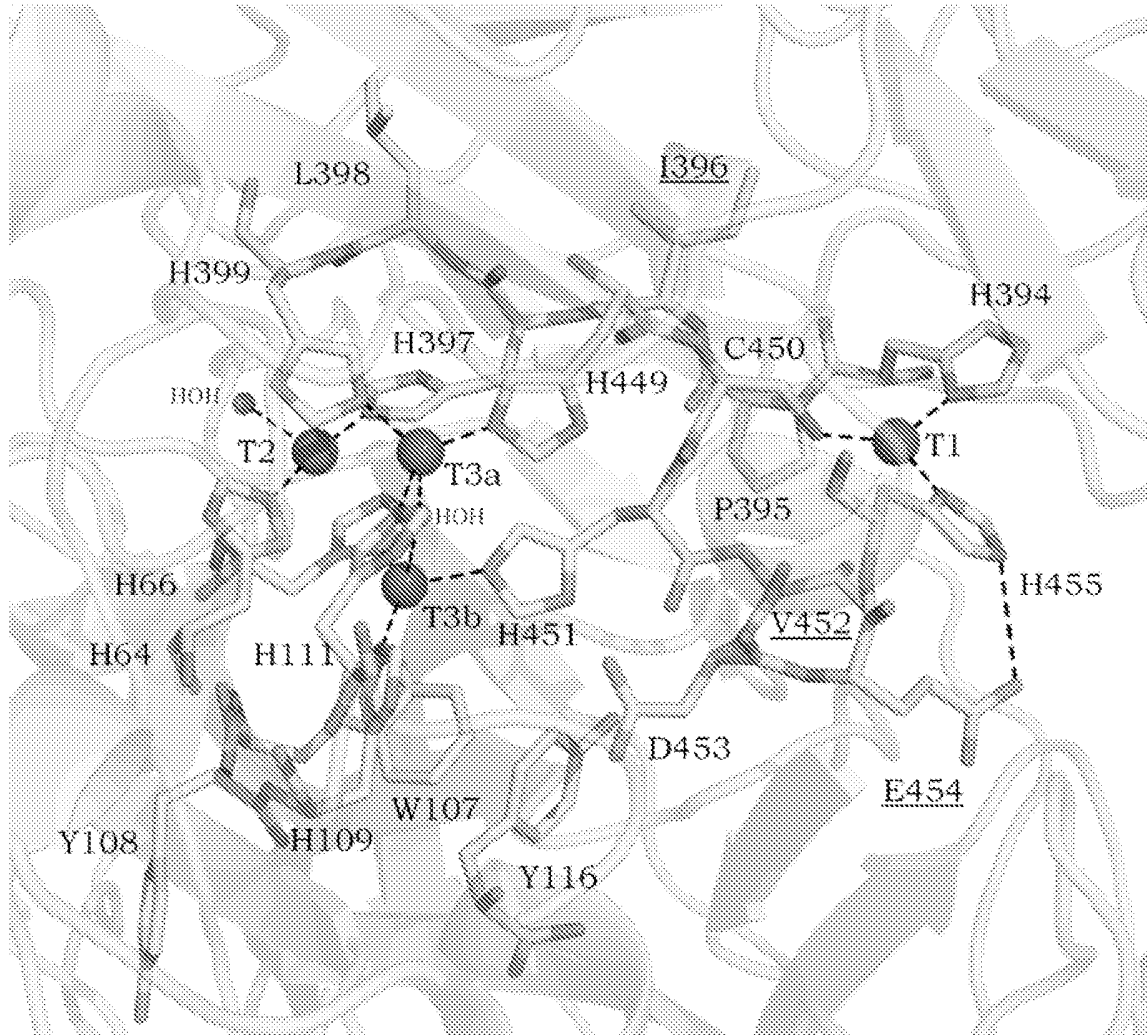


Figura 1

B

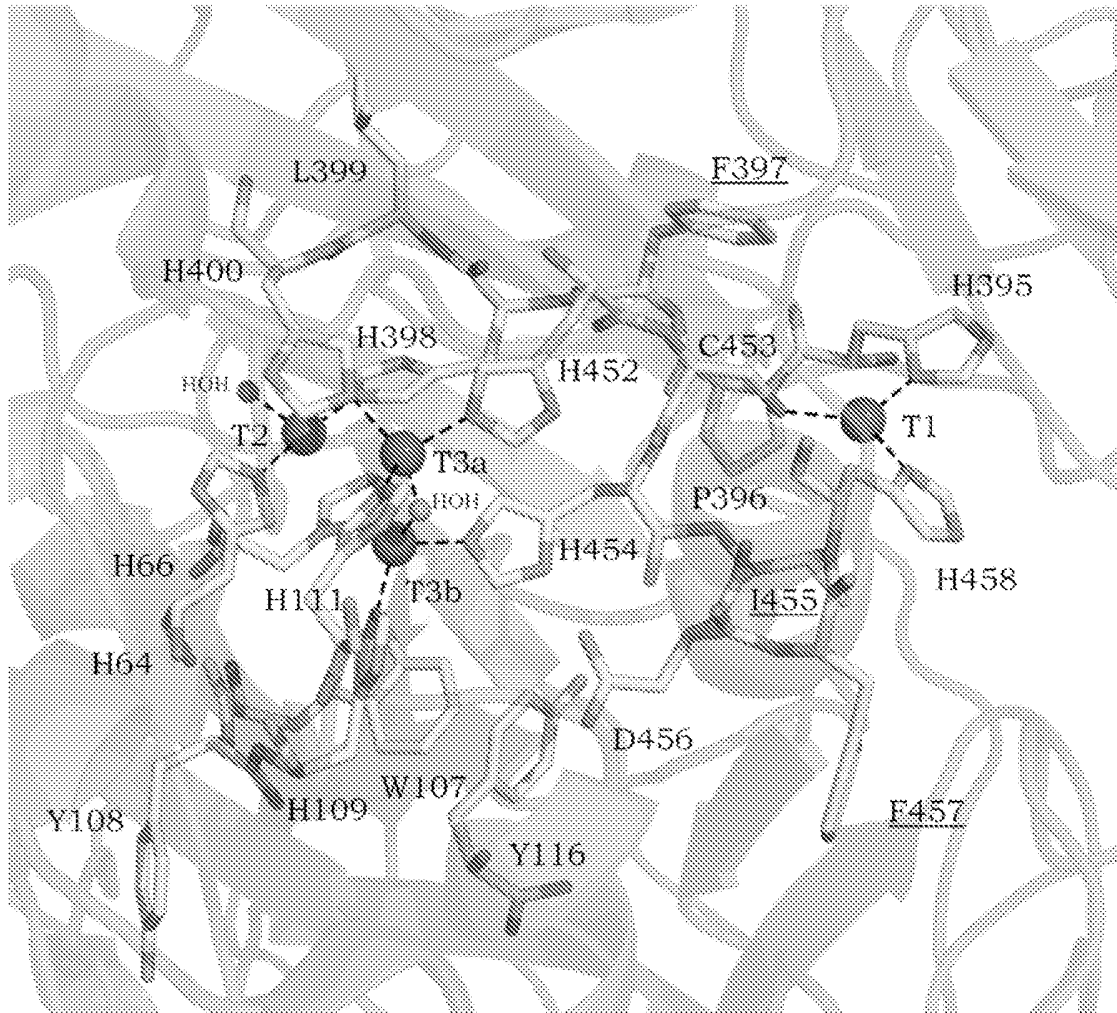


Figura 2

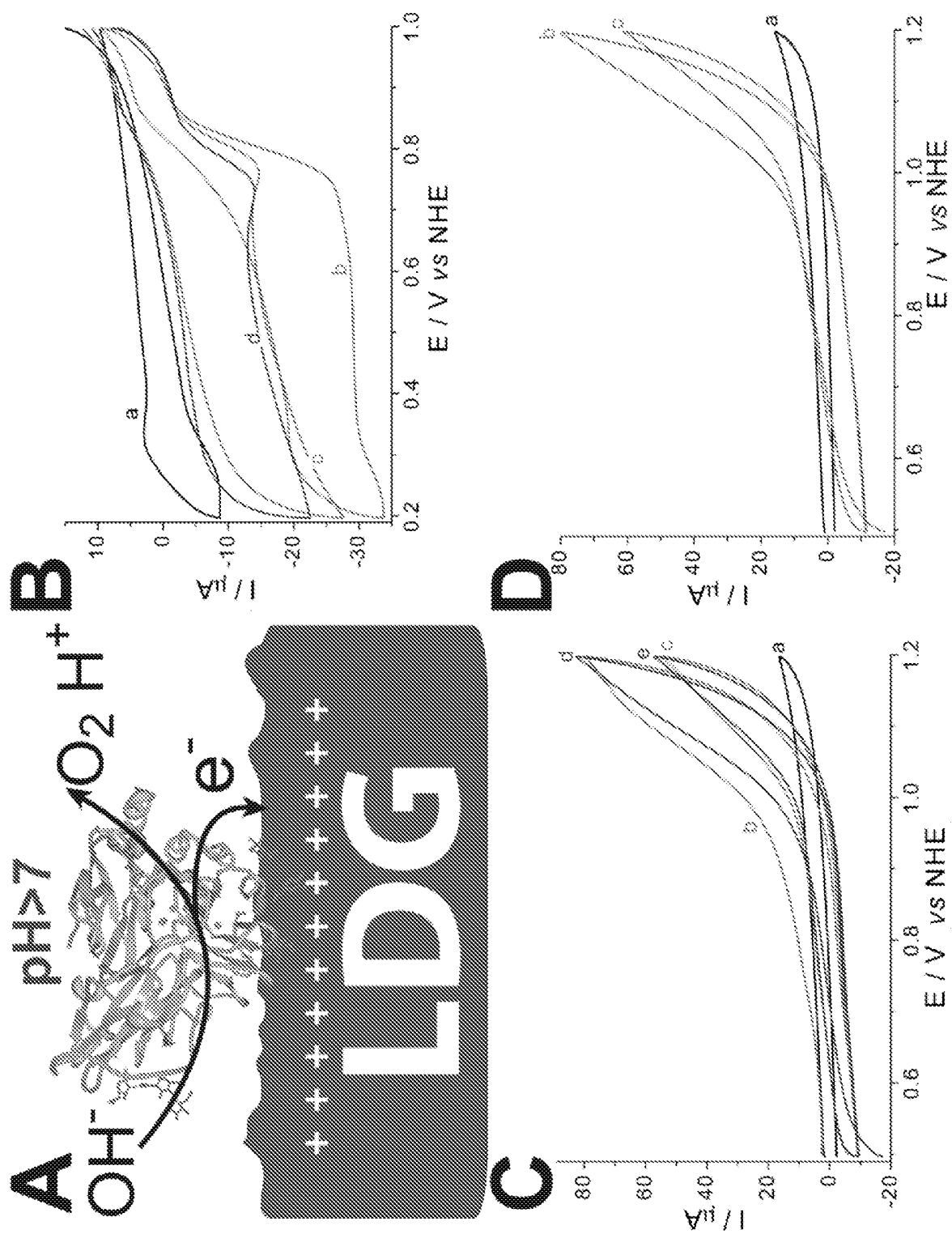


Figura 3

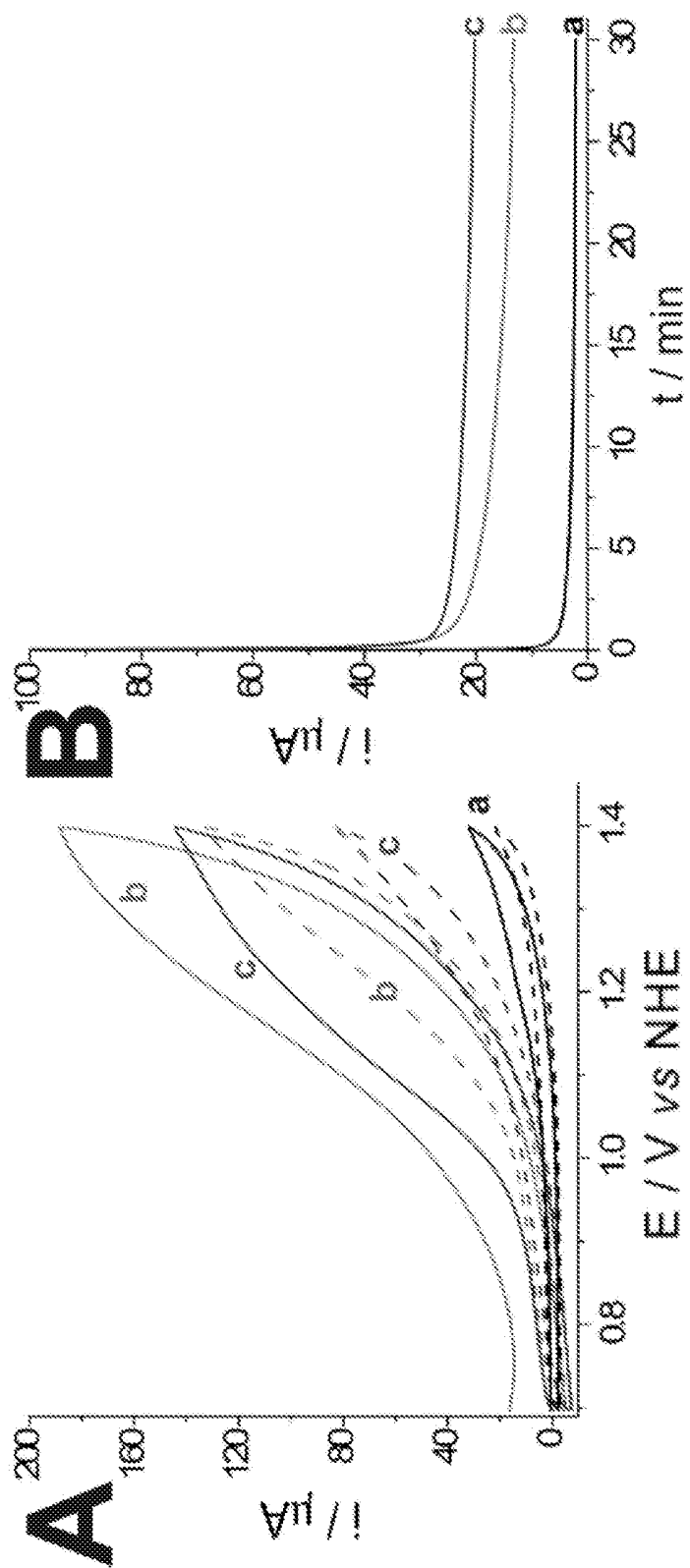


Figura 4

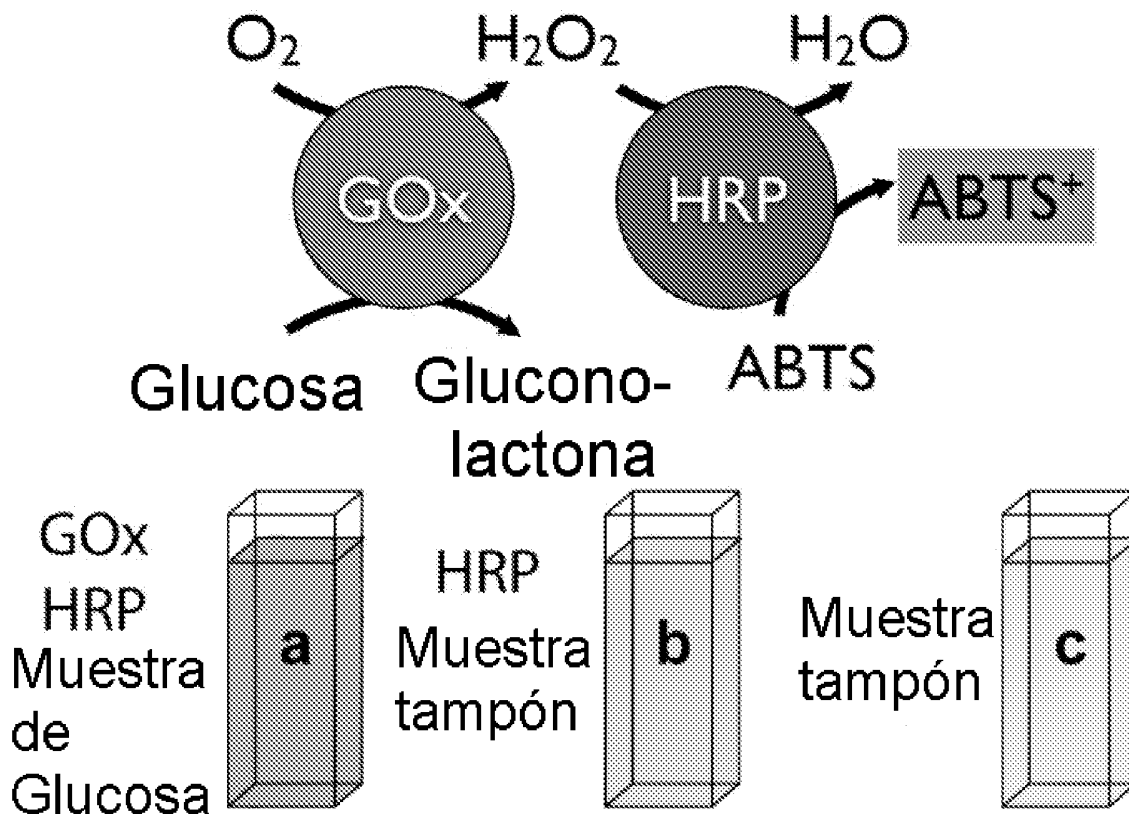


Figura 5

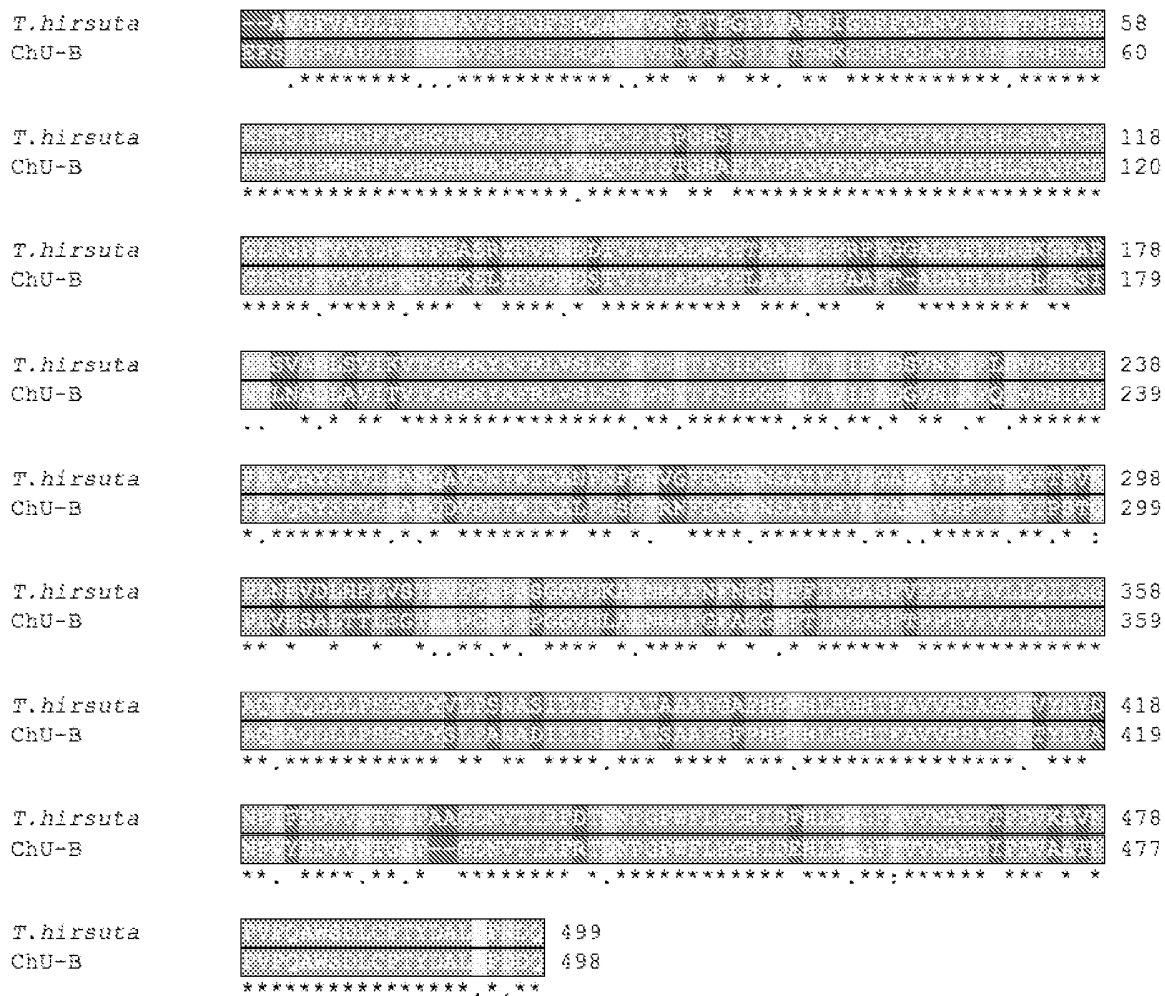


Figura 6

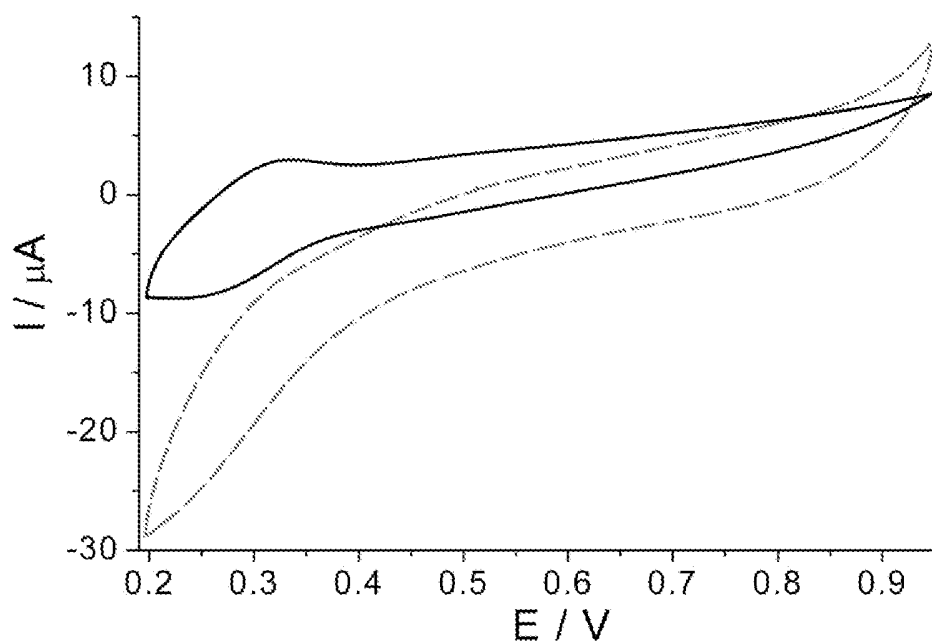
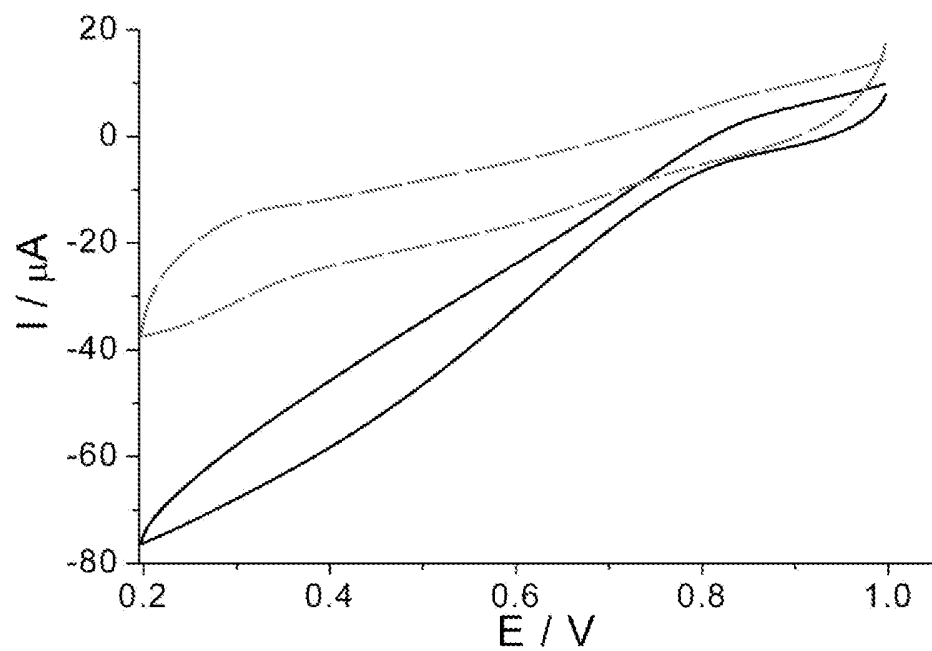


Figura 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070285

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C25B, C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, TXPUS, NPL, XPESP, BIOSIS, EMBASE, EMBL-EBI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	PITA, M et al. Bioelectrochemical Oxidation of Water. J. Am. Chem. Soc. 2014, vol. 136 (16), pages 5892-5895, the whole document.	1-25
A	US 2014038065 A1 (RAMASAMY RAMARAJA P) 06/02/2014, especially figure 1; claims 1-8.	1-25
A	US 4541908 A (NIKI KATSUMI ET AL.) 17/09/1985, especially column 1, line 66 a column 2, line 8; column 2, lines 26-31; column 2, lines 57-65; claims 1 and 4.	1-25

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
02/07/2015

Date of mailing of the international search report
(03/07/2015)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
J. Collado Martínez

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3493095

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070285

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VAZ-DOMÍNGUEZ, C et al. Laccase electrode for direct electrocatalytic reduction of O ₂ to H ₂ O with high-operational stability and resistance to chloride inhibition. <i>Biosensors and Bioelectronics</i> . 2008, vol 24, pages 531-537, the whole document.	1-25
A	MATE, DM et al. Blood Tolerant Laccase by Directed Evolution. <i>Chemistry and Biology</i> . 2013, vol 20, pages 223-231, the whole document. Cited in the application.	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070285

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C25B1/04 (2006.01)

C25B11/06 (2006.01)

C12N9/02 (2006.01)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/070285

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US4541908 A	17.09.1985	JPS57205970 A JPS6322024B B2 EP0068664 A1 EP0068664 B1	17.12.1982 10.05.1988 05.01.1983 14.05.1986
----- US2014038065 A1 -----	----- 06.02.2014 -----	----- NONE -----	----- -----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2015/070285

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C25B, C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, TXPUS, NPL, XPESP, BIOSIS, EMBASE, EMBL-EBI

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
P,X	PITA, M et al. Bioelectrochemical Oxidation of Water. J. Am. Chem. Soc. 2014, vol. 136 (16), páginas 5892-5895, todo el documento.	1-25
A	US 2014038065 A1 (RAMASAMY RAMARAJA P) 06/02/2014, especialmente figura 1; reivindicaciones 1-8.	1-25
A	US 4541908 A (NIKI KATSUMI ET AL.) 17/09/1985, especialmente columna 1, línea 66 a columna 2, línea 8; columna 2, líneas 26-31; columna 2, líneas 57-65; reivindicaciones 1 y 4.	1-25

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
02/07/2015

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
03 de julio de 2015 (03/07/2015)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
J. Collado Martínez

Nº de teléfono 91 3493095

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2015/070285

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	VAZ-DOMÍNGUEZ, C et al. Laccase electrode for direct electrocatalytic reduction of O ₂ to H ₂ O with high-operational stability and resistance to chloride inhibition. Biosensors and Bioelectronics. 2008, vol 24, páginas 531-537, todo el documento.	1-25
A	MATE, DM et al. Blood Tolerant Laccase by Directed Evolution. Chemistry and Biology. 2013, vol 20, páginas 223-231, todo el documento. Citado en la solicitud.	1-25

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C25B1/04 (2006.01)

C25B11/06 (2006.01)

C12N9/02 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2015/070285

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US4541908 A	17.09.1985	JPS57205970 A JPS6322024B B2 EP0068664 A1 EP0068664 B1	17.12.1982 10.05.1988 05.01.1983 14.05.1986
----- US2014038065 A1 -----	----- 06.02.2014 -----	----- NINGUNO -----	----- -----