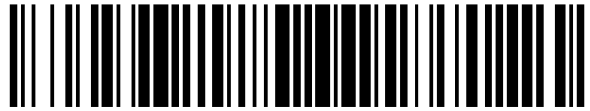


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 482 890**

21 Número de solicitud: 201330114

51 Int. Cl.:

C12N 11/02 (2006.01)

C12N 9/18 (2006.01)

C10L 1/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

01.02.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

04.08.2014

88 Fecha de publicación diferida del informe sobre el estado de la técnica:

18.03.2015

Fecha de la concesión:

23.12.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

05.01.2016

73 Titular/es:

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (70.0%)

SERRANO, 117

28006 MADRID (Madrid) ES;

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID (10.0%)

y

UNIVERSITAT AUTÓNOMA DE BARCELONA

(20.0%)

72 Inventor/es:

MARTÍN LUENGO, María De Los Angeles;

YATES BUXCEY, Malcolm;

PLOU GASCA, Francisco;

LOZANO PIRRONGELLI, Rafael;

SAEZ ROJO, Eduardo;

MARTÍNEZ SERRANO, Ana María;

VEGA ARGOMANIZ, Lorena;

MEDINA TRUJILLO, Laura;

ZURDO, Violeta;

RAMOS GÓMEZ, Milagros;

VALERO BARRANCO, Francisco y

BENALGES MASSA, Maria Dolors

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE UNA ENZIMA INMOVILIZADA EN UN SOPORTE RENOVABLE DERIVADO DE UN RESIDUO AGROALIMENTARIO**

ES 2 482 890 B1

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



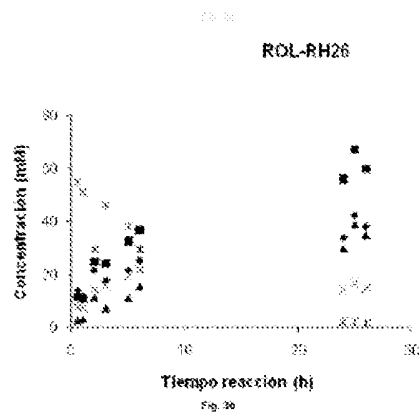
11 Número de publicación: **2 482 890**

21 Número de solicitud: 201330114

57 Resumen:

Procedimiento de obtención de una enzima inmovilizada en un soporte renovable derivado de un residuo agroalimentario.

Procedimiento de obtención de una enzima inmovilizada en un soporte, caracterizado porque comprende: a) obtener un soporte renovable por tratamiento térmico de un residuo agroalimentario que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en sílice, óxido de catión alcalino, óxido de catión alcalinotérreo y mezcla de los anteriores, e b) inmovilizar la enzima en el soporte obtenido en la etapa anterior. Preferiblemente, la enzima es lipasa recombinante del hongo *Rhizopus oryzae* (SEO ID N° 1) y el residuo agroalimentario es cáscara de arroz. Así como el soporte obtenido en la etapa a), la enzima inmovilizada obtenida en la etapa b) y su uso para obtener biodiesel.



ES 2 482 890 B1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención de una enzima inmovilizada en un soporte renovable derivado de un residuo agroalimentario

5

SECTOR TÉCNICO

La presente invención se sitúa dentro del campo de la biotecnología, ya que se refiere a una enzima inmovilizada en un soporte renovable y sus usos, entre otros, en el campo de la química-fina y biocatálisis. Así, las enzimas inmovilizadas en soportes renovables obtenidos a partir de residuos agroalimentarios de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar en la síntesis enantiomérica de compuestos químicos de alto valor añadido, entre otras, para la industria farmacéutica, o como biocatalizadores en biotransformaciones tal como, por ejemplo, la síntesis de biodiesel.

15

Adicionalmente, la presente invención también se puede situar en el sector del reciclado ya que utiliza material de desecho de la industria agroalimentaria, preferiblemente cáscara de arroz, para obtener el soporte renovable donde se inmoviliza la enzima.

20

ESTADO DE LA TÉCNICA

Las enzimas son moléculas de gran interés por sus numerosas aplicaciones industriales en campos tan diversos como la alimentación, por ejemplo, en la obtención de productos deslactosados, edulcorantes, zumos, jarabes de glucosa, piensos animales, etc.; en la obtención de biocombustibles, por ejemplo, bioetanol de primera y segunda generación, biodiesel; detergentes; fármacos tal como, por ejemplo, antibióticos semisintéticos, compuestos enantioméricamente puros; polímeros; ingredientes funcionales, por ejemplo, prebióticos, grasas enriquecidas con ácidos grasos poliinsaturados; o en medicina, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades genéticas o análisis clínicos.

30

En particular, las lipasas son enzimas de la familia de las hidrolasas, capaces de hidrolizar triglicéridos en diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos y glicerol, actuando sobre los enlaces éster carboxílicos de los triglicéridos. Son importantes en el cuerpo humano pues facilitan la absorción de grasas. Las lipasas suponen más de la cuarta parte del total de las enzimas utilizadas en biotransformaciones, siendo su elevado coste de producción, su único inconveniente para su uso industrial. En la industria se usan para fabricar jabones y detergentes por hidrólisis de sebo, para producción de leche infantil por estructuración o modificación de lípidos, en la industria quesera, para hidrolizar la grasa de la leche. También pueden resolver mezclas racémicas mediante estrategias de hidrólisis, esterificación o transesterificación, dando lugar a un solo enantiómero de la mezcla (enantioselectividad), lo que se usa por ejemplo en la industria farmacéutica para la producción de fármacos quirales (A.-L. Groussin, S. Antoniotti, Valuable chemicals by the enzymatic modification of molecules of natural origin: Terpenoids, steroids, phenolics and related. Bioresource Technology 115 (2012) 237-243).

45

La inmovilización de enzimas es interesante porque permite reusar los biocatalizadores, y puede ayudar a aumentar su resistencia contra la inactivación. En el desarrollo de enzimas inmovilizadas se han de tener en cuenta varias propiedades importantes para sus aplicaciones industriales, como son la fuerza mecánica, la estabilidad química y física, el carácter hidrofóbico/hidrofílico, la cantidad de enzima inmovilizada y el coste.

50

Actualmente, y como alternativa al método convencional de catálisis básica, se está investigando la producción de biodiesel mediante el empleo de enzimas, principalmente

lipasas, inmovilizadas para catalizar reacciones de transesterificación, esterificación e interesterificación. En particular, N. Digze et al. describe la producción de biodiesel por transesterificación de aceite de girasol, soja y residuos de cocina utilizando una lipasa inmovilizada en un polímero microporoso obtenido a partir de estireno, divinilbenceno y poliglutaraldehído (N. Digze et al. Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipasa immobilized onto a novel microporous polymer. Biosource Technology, 100 (2009), 1983-1991). Por otro lado, N.W. Li et al. describe la utilización de lipasa de *Penicillium exapansum* inmovilizada en resina D4020 en la transesterificación de aceite de maíz (N.W. Li et al. Immobilization Chinese Journal of Catalysis, Vol 8(4), 2007).

Por otro lado, en la patente EP 444092 B1 (Particulate immobilized lipase preparation, method for production thereof and use thereof, de Novo Norkisk) se describen partículas de una lipasa microbiana, en particular lipasas derivadas de cepas de especies *Humicola*, *Candida antarctica* o *Rhizomucor miehei*, inmovilizada en un soporte macroporoso, donde dicho soporte consiste en al menos 65 % de sílica o silicatos, más del 90 % de las partículas tienen un tamaño de partícula entre 100 y 1000 µm, más del 80 % de los poros de las partículas muestra un diámetro entre 10 y 45 veces el diámetro de los glóbulos de lipasa, y donde el contenido de agua de las partículas de lipasa inmovilizadas se encuentra entre 1 y 20 %. En este documento también se describe el procedimiento de inmovilización de las lipasas y su uso en la interesterificación de grasas, la hidrólisis de grasas y la síntesis de glicéridos u otros ésteres de ácidos grasos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de una enzima inmovilizada en un soporte, caracterizado porque comprende:

- a) obtener un soporte renovable por tratamiento térmico de un residuo agroalimentario que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en sílice, óxido de catión alcalino, óxido de catión alcalinotérreo y mezcla de los anteriores, e
- b) inmovilizar la enzima en el soporte obtenido en la etapa anterior.

El procedimiento de la presente invención utiliza residuos agroalimentarios como material de partida para la obtención del soporte renovable donde se inmoviliza la enzima, lo que supone una disminución significativa en el coste de producción de la mencionada enzima inmovilizada. De esta forma, el procedimiento tal como se describe en esta solicitud de patente permite extender el uso de enzimas, en particular lipasas, en el mercado a gran escala. Adicionalmente, el procedimiento de la presente invención revaloriza el residuo agroalimentario utilizado como material de partida, lo que redundará en un mayor beneficio económico y medioambiental.

La inmovilización de la enzima tiene lugar principalmente por interacciones de la cadena polipeptídica con el soporte mediante, por ejemplo, puentes de hidrógeno e interacciones de van der Waals. Por lo tanto, en principio cualquier proteína y, por ende cualquier enzima, es susceptible de ser adsorbida en el soporte renovable obtenido en la etapa a) del procedimiento de la presente invención.

Para que el procedimiento de inmovilización resulte efectivo, el residuo agroalimentario se ha de someter a tratamiento térmico, es decir, se ha de calentar el residuo agroalimentario que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en sílice, óxido de catión alcalino, óxido de catión alcalinotérreo y mezcla de los anteriores, preferiblemente a una temperatura igual o superior a 500°C.

Tras el tratamiento térmico el soporte renovable posee, en comparación con el material sin dicho tratamiento térmico, una mayor homogeneidad y una mayor estabilidad mecánica y química (S.F. D'Souza, S.S. Godbole J. Biochem. Biophys. Methods 52 (2002) 59–62).

5 En una realización preferida, la etapa a) del procedimiento de obtención de una enzima inmovilizada de la presente invención comprende calentar el residuo agroalimentario entre 500 y 700 °C. En una realización aún más preferida, el calentamiento tiene lugar al aire, a una velocidad de 5°C /min.

10 En otra realización aún más preferida, una vez alcanzada la temperatura final entre 500 y 700 °C se mantiene durante un tiempo entre 2 y 4 horas.

15 En otra realización preferida, la presente invención se refiere al procedimiento de obtención de una enzima inmovilizada tal como se describe en esta solicitud de patente, donde la enzima es una lipasa. Preferiblemente, una lipasa del hongo *Rhizopus oryzae* o *Candida antártica*, en ambos casos dicha lipasa puede ser nativa o recombinante.

20 En una realización aún más preferida, la lipasa inmovilizada en el procedimiento de la presente invención es la lipasa recombinante del hongo *Rhizopus oryzae* (SEQ ID N° 1). Esta enzima puede expresarse en un microorganismo tal como, por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Aspergillus niger*. Preferiblemente, la lipasa inmovilizada es una lipasa recombinante del hongo *Rhizopus oryzae* (SEQ ID N° 1) expresada en la levadura *Pichia pastoris*.

25 En otra realización preferida, el residuo agroalimentario utilizado como material de partida en la etapa a) del procedimiento de la invención comprende entre 40% y 45 % en peso de un átomo seleccionado del grupo que consiste en silicio, potasio, magnesio y una mezcla de los anteriores. Preferiblemente, el residuo agroalimentario comprende 41% en peso de silicio.

30 En una realización aún más preferida, el soporte renovable obtenido en etapa a) del procedimiento de la presente invención comprende un 41 % en peso de silicio, presenta estructura amorfa, y tamaño de partícula medio inferior o igual a 200 micras.

35 En otra realización preferida, la presente invención se refiere al procedimiento de obtención de una enzima inmovilizada tal como se describe en esta solicitud de patente, donde el residuo agroalimentario utilizado para obtener el soporte renovable es cáscara de arroz. Cáscaras de arroz de diferentes procedencias permiten preparar soportes renovables de composiciones similares.

40 En una realización aún más preferida, el procedimiento de obtención de la enzima inmovilizada en un soporte tal como se describe en esta solicitud de patente comprende:
a) obtener un soporte renovable por tratamiento térmico entre 500 y 700 °C de cáscara de arroz, preferiblemente con un contenido en silicio de 41% en peso, e
45 b) inmovilizar la enzima en el soporte obtenido en la etapa anterior. Aún más preferiblemente, la enzima inmovilizada en la etapa b) es la lipasa recombinante del hongo *Rhizopus oryzae* (SEQ ID N° 1).

50 En otra realización preferida, la etapa b) de inmovilización de la enzima, preferiblemente lipasa recombinante del hongo *Rhizopus oryzae* (SEQ ID N° 1), en el soporte renovable tal como se describe en esta solicitud de patente comprende:

b1) obtener una disolución de la enzima en tampón fosfato 0,01 y 0,5 M a pH entre 4,5 y 8,5,
b2) mezclar la disolución de la enzima preparada en la etapa b1) con el soporte renovable,

b3) agitar la suspensión entre 4 y 25 °C a no más de 100 rpm hasta que la cantidad de enzima soportada varíe menos de 2% entre dos medidas consecutivas,

b4) filtrar y lavar la enzima inmovilizada con el tampón fosfato utilizado en la etapa b1).

5 Preferiblemente la etapa b3) de agitación tiene lugar en un agitador de rodillo u orbital.

En una realización aún más preferida, la etapa b) de inmovilización de la enzima en el soporte renovable tal como se describe en esta solicitud de patente comprende:

10 b1) obtener una disolución de lipasa recombinante del hongo *Rhizopus oryzae* (SEQ ID N° 1) en tampón fosfato 0,1 M a pH 6.5,

b2) mezclar la disolución de la enzima preparada en la etapa b1) con el soporte renovable obtenido por tratamiento térmico entre 500-700 °C de cáscara de arroz,

b3) agitar la suspensión entre 4 y 25 °C a no más de 100 rpm, durante máximo 24 horas,

15 b4) filtrar y lavar la enzima inmovilizada con el tampón fosfato utilizado en la etapa b1).

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un soporte renovable caracterizado porque comprende entre 40 y 45 % en peso de silicio, preferiblemente 41% en peso, presenta estructura amorfa, mesoporosa, y un tamaño de partícula medio inferior o igual a 200 micras.

20 En una realización preferida, el soporte renovable tal como se describe en el párrafo anterior se obtiene por tratamiento térmico entre 500 y 700 °C de cáscara de arroz.

25 En un tercer aspecto, la presente invención también se refiere a una enzima inmovilizada en un soporte renovable, donde el soporte renovable comprende entre 40 y 45 % en peso de silicio, preferiblemente 41% en peso, presenta estructura amorfa, mesoporosa, y un tamaño de partícula medio inferior o igual a 200 micras.

30 En una realización preferida, este soporte renovable se obtiene por tratamiento térmico entre 500 y 700 °C de cáscara de arroz.

35 En otra realización preferida, la presente invención también se refiere a la enzima inmovilizada del párrafo anterior, donde la enzima es una lipasa tal como se describe en esta solicitud de patente. Preferiblemente, lipasa recombinante del hongo *Rhizopus oryzae* (SEQ ID N° 1).

40 En un cuarto aspecto, la presente invención también se refiere al uso de un residuo agroalimentario, preferiblemente cáscara de arroz, para obtener el soporte renovable que comprende entre 40 y 45 % en peso de silicio, preferiblemente 41% en peso, presenta estructura amorfa, mesoporosa, y un tamaño de partícula medio inferior o igual a 200 micras.

45 En una realización preferida, este soporte renovable se obtiene por tratamiento térmico entre 500 y 700 °C de cáscara de arroz.

50 El uso de materiales baratos derivados de residuos agroindustriales como soportes para enzimas resulta de interés, ya que permite abaratar los costes del procedimiento de obtención de dicha enzima inmovilizada, y, a su vez de aquellas biotransformaciones donde se utilicen dichos enzimas.

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere al uso de la enzima inmovilizada en el soporte renovable tal como se describe en el tercer aspecto de la presente invención, para

sintetizar biodiesel. En particular, mediante la transesterificación de triglicéridos con un alcohol tal como etanol o metanol.

5 En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso de la enzima inmovilizada en el soporte renovable del párrafo anterior, donde dicha enzima es una lipasa tal como se describe en esta solicitud de patente. Mas preferiblemente, la lipasa recombinante del hongo *Rhizopus oryzae* (SEQ ID N° 1).

10 En un sexto aspecto, la presente invención se refiere a un método de obtención de biodiesel que comprende:

- 15 i) obtener una lipasa recombinante del hongo *Rhizopus oryzae* (SEQ ID N° 1) inmovilizada en un soporte renovable tal como se describe en esta solicitud de patente, y
ii) poner en contacto la lipasa inmovilizada obtenida en la etapa anterior con un triglicérido en presencia de un alcohol seleccionado del grupo que consiste en metanol y etanol para obtener biodiesel.

20 El triglicérido puede contener ácidos grasos saturados o insaturados de distinta longitud de cadena; la reacción puede llevarse a cabo a una temperatura entre 30 y 60°C; el tiempo de reacción es dependiente de la cantidad de enzima inmovilizada añadida, pudiendo estar comprendido típicamente entre 2 y 48 horas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 Figura 1: Determinación de la máxima capacidad de adsorción del soporte RH26 sobre la lipasa recombinante del hongo *Rhizopus oryzae* (SEQ ID N° 1)

30 Figura 2: Cromatograma HPLC típico obtenido en la reacción test de transesterificación de trilaurina con etanol. Picos: (1) 1-monolaurina; (2) ácido láurico; (3) laurato de etilo; (4) 1,2-dilaurina; (5) trilaurina

Figura 3a: Seguimiento de la transesterificación de trilaurina con metanol como se describe en el ejemplo 3, utilizando ROL-RH26 como biocatalizador.

35 Figura 3b: Seguimiento de la transesterificación de trilaurina con etanol como se describe en el ejemplo 3, utilizando ROL-RH26 como biocatalizador.

Figura 4a: Seguimiento de la transesterificación de trilaurina con metanol como se describe en el ejemplo 4, utilizando Novozym 435 como biocatalizador.

40 Figura 4b: Seguimiento de la transesterificación de trilaurina con etanol como se describe en el ejemplo 4, utilizando Novozym 435 como biocatalizador.

45 Figura 5a: Seguimiento de la transesterificación de trilaurina con metanol como se describe en el ejemplo 4, utilizando Lipozyme TL IM como biocatalizador.

Figura 5b: Seguimiento de la transesterificación de trilaurina con etanol como se describe en el ejemplo 4, utilizando Lipozyme TL IM como biocatalizador.

50 Figura 6a: Seguimiento de la transesterificación de trilaurina con metanol como se describe en el ejemplo 4, utilizando Lipozyme RM IM como biocatalizador.

Figura 6b: Seguimiento de la transesterificación de trilaurina con etanol como se describe en el ejemplo 4, utilizando Lipozyme RM IM como biocatalizador.

En las figuras 3a a 6b se indica con (♦) ácido láurico, (■) laurato de etilo, (▲) 1-monolaurina, (x) 1,2-dilaurina y (ж) trilaurina.

EJEMPLOS:

5

Ejemplo 1: Obtención de un soporte renovable a partir de cáscara de arroz

La cáscara de arroz procedente del Levante español se sometió a tratamiento térmico en aire con velocidad de subida de la temperatura hasta la final de 5^o/min y enfriamiento libre a diferentes temperaturas entre 500-700 °C, durante periodos de tiempo variables entre 2 y 4 horas. En particular se utilizaron las condiciones descritas en la tabla 1.

Tabla 1

Soporte enzimático	Temperatura (°C)	Horas
RH45	500	4
RH47	700	4
RH26	600	2

Las siglas utilizadas para identificar los diferentes soportes obtenidos hacen referencia a la temperatura y tiempo utilizados para obtenerlos. Así, los soportes se han identificado como RHXY, donde RH indica cascara de arroz, el primer dígito (X) son las horas de tratamiento térmico y el segundo (Y) corresponde a la temperatura (5: 500°C, 6: 600°C, 7: 700°C).

Los soportes preparados tal como se ha indicado anteriormente se caracterizaron mediante ICP para estudio de su composición, porosimetría de mercurio para conocer su textura, análisis TG-ATD de la descomposición de moléculas sonda para conocer sus características ácido-base (acético para la basicidad y hexilamina para la acidez), difracción de rayos X para conocer su estructura cristalina y espectroscopia FTIR para estudiar los grupos superficiales, análisis textural con adsorción-desorción de nitrógeno y porosimetría de intrusión de mercurio.

Los resultados obtenidos muestran que los soportes preparados a partir de cáscara de arroz (RH47, RH45, RH26) contienen 41% p/p de silicio, 2% p/p de potasio, 1% p/p de calcio y 0,5% p/p de magnesio y su estudio por difracción de rayos X indica que poseen estructura amorfa, característica de su composición principalmente silíceo (A. Samadi-Maybodi, E. Atashbozorg. Quantitative and qualitative studies of silica in different rice samples grown in north of Iran using UV-vis, XRD and IR spectroscopy techniques, Talanta 70 (2006) 756–760).

35

El estudio por espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR) muestra como principales bandas las situadas 1100-1200 cm⁻¹ y a 400-600 cm⁻¹, correspondientes a los enlaces metal-oxígeno que indican la estructura de óxido de los materiales tratados en las condiciones indicadas, más concretamente a 1114–1060 cm⁻¹ correspondiente a la vibración asimétrica de grupos Si–O, la banda a 850–800 cm⁻¹ debida a la vibración simétrica de grupos Si–O, la presente a 1130–1000 cm⁻¹ relacionada con la vibración asimétrica de grupos Si–O–Si y la banda de OH- superficiales centrada a 3300-3500 cm⁻¹, que disminuye al aumentar la temperatura de tratamiento, debido a la pérdida de estos grupos en forma de agua y algunas bandas cercanas a 2100cm⁻¹ correspondientes a pequeñas cantidades de materia orgánica que contiene grupos tipo C=O y que disminuyen a medida que el tratamiento se hace a mayor temperatura y/o mayor tiempo, debido a su descomposición (F.L. Galeener, Phys. Rev. B, 8 (1993), 4292–4297).

45

El estudio de la textura de los soportes mediante porosimetría de mercurio indica que con el incremento de la temperatura de tratamiento hay una sinterización del sólido que causa una pérdida de área superficial siendo de 68 m²/g para RH45, 32m²/g para RH26, a 13m²/g para RH47, un aumento de densidad del material de 2,0g/cc para RH45, 2,1g/cc para RH26 a 2,4 g/cc para RH47 y una disminución de los volúmenes de mesoporos de 0,175cc/g para RH45, 0,11cc/g para RH26 a 0,077cc/g para RH47 y que los tamaños de partícula de los soportes son similares e inferiores a 200 micras para los tres soportes preparados.

La basicidad y acidez de los sólidos se midió utilizando análisis termogravimétrico acoplado a espectrometría de masas de ácido acético para determinar basicidad y hexilamina para determinar acidez. En los soportes se observa la presencia de grupos de fuerza acida y básica baja, debidos principalmente a la presencia de cationes alcalinos y alcalinoterreos y a los OH presentes en la estructura silicea, que también se aprecian por FTIR y las cantidades tanto de centros ácidos como básicos disminuyen al aumentar la temperatura de tratamiento, como es de esperar debido a la sinterización del material con la temperatura, siendo el orden de acidez y basicidad encontrado: RH45 > RH26 > RH47.

Ejemplo 2: Inmovilización de una lipasa recombinante del hongo *Rhizopus oryzae* en los soportes obtenidos en el ejemplo 1

La enzima utilizada fue una lipasa recombinante del hongo *Rhizopus oryzae* (SEQ ID N° 1) expresada en la levadura *Pichia pastoris*, proporcionada por la Universidad Autónoma de Barcelona, recibida en forma sólida. La muestra había sido diafiltrada del caldo de cultivo por un corte de 10 kDa y posteriormente liofilizada. Con ella se preparó una disolución enzimática (stock) de 20 mg/ml con buffer de fosfato sódico 100 mM y pH 6,5, se incubó con agitación durante 1 hora a 4 °C y posteriormente se centrifugó para eliminar posibles restos sólidos (C. Arnau, R. Ramon, C. Casas, F. Valero. Optimization of the heterologous production of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* system using mixed substrates on controlled fed-batch bioprocess. Enzyme and Microbial Technology 46 (2010) 494-500).

Las medidas de actividad enzimática, tanto de sobrenadantes, control y disolución stock se realizaron en el lector de placas Versamax, utilizando p-nitrofenil propionato 10 mM (pNPP) como sustrato de la reacción, en modo cinético, con una longitud de onda de 405 nm, 30° C y 2 minutos. Para determinar la actividad enzimática, ya que el lector proporciona datos de mU/min, se utilizó un coeficiente de extinción (ϵ) para el p-nitrofenol apropiado a la longitud de onda y al pH de trabajo, $\epsilon = 16780 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

La determinación de la concentración de proteínas se realizó mediante el método Bradford utilizando el reactivo y el procedimiento de Bio-Rad. El ensayo se basa en la capacidad de cambio de color del colorante Comassie brilliant blue G-250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. La unión del colorante con la proteína provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm. La forma naranja se convierte en azul cuando el colorante se una a la proteína a 595 nm de longitud de onda. Para la realización de las curvas de calibrado se utilizó una disolución 50 μ g/ml de BSA (albúmina de suero bovino) como patrón.

El proceso de inmovilización y de medición de la actividad del sobrenadante se alargó hasta que se empezó a observar que la actividad ya no variaba significativamente, se filtró, lavó y secó el biocatalizador con P₂O₅. Una vez seco se determinó la actividad enzimática de los tres biocatalizadores a 30° C usando un pH-stato de Mettler Toledo (modelo DL-50) a pH=8,0 usando NaOH 0,1 N como valorante. Se utilizaron 19 ml de tampón Tris-HCl 1 mM, pH 8,0 como medio de reacción, 0,6 ml de acetonitrilo y 0,4 ml de tripropionina como sustrato de reacción. Se realizó también una prueba en blanco para medir la hidrólisis

espontánea, hidrólisis en ausencia de enzima, solo el triglicérido con el medio de reacción. Esta técnica consiste en la adición controlada de una disolución básica para mantener el pH en un sistema donde se está produciendo una reacción que hace variar el pH. En estas condiciones, la tasa de valoración es proporcional a la velocidad de reacción, y por tanto a la producción de ácido.

Los experimentos de inmovilización sobre los soportes identificados como RHXY durante las primeras horas de experimento muestran que a medida que aumenta el tiempo de inmovilización, el porcentaje de enzima adsorbida en el sólido va creciendo y las medidas a partir de las 24 horas proporcionan unos resultados bastante parecidos entre sí. Fijándonos en los resultados numéricos, y teniendo en cuenta los datos obtenidos a partir de la determinación de concentración de proteínas, el material RH45 es el que mejor funciona como adsorbente enzimático, seguido del RH26.

Tabla 2: Enzima inmovilizada tras 24 horas de inmovilización

Soporte enzimático	Enzima inmovilizada (%)
RH45	60
RH47	46
RH26	57

Posteriormente se determinó la actividad catalítica sobre tripropionina de las enzimas inmovilizadas según se describe anteriormente. Los resultados obtenidos se incluyen en la tabla 3. Se realizaron varias medidas con cantidades de biocatalizador entre 20 y 100 mg, y se obtuvieron los valores medios normalizados por unidad de peso de biocatalizador. El material que proporciona una mayor actividad catalítica es ROL-RH26, a pesar de que no es el que proporcionaba una mayor adsorción de enzima. Ello puede deberse a las propiedades texturales del material. No obstante, el parámetro "actividad catalítica" es preferente con relación al parámetro "capacidad de adsorción de enzima", por lo que el material RH26 fue elegido para los estudios posteriores.

Tabla 3

Biocatalizador	Actividad catalítica (U/g)
ROL-RH45	393,5
ROL-RH47	671,5
ROL-RH26	737,2

Ejemplo 3: Determinación de la máxima capacidad de adsorción del soporte RH26

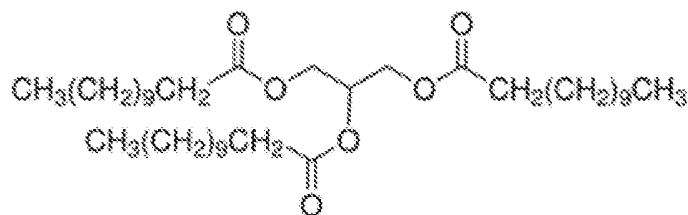
A continuación se realizó el estudio de máxima capacidad de adsorción del material RH26 variando la relación en peso enzima soporte. Para ello se preparó una disolución stock de enzima formada por 100 mg de sólido por mililitro de tampón fosfato, y se utilizaron seis volúmenes distintos de dicha disolución, en el rango 0,25 a 5 ml. El volumen final se mantuvo constante en todos los experimentos (10 ml), así como la cantidad de soporte RH26 (300 mg) de sólido. El estudio de la actividad catalítica de los biocatalizadores obtenidos se realizó en el pH-stat con tripropionina, mostrándose los resultados en la Figura 1. El estudio demostró que a partir de 3 ml de disolución stock se observaba saturación del

soporte de inmovilización. La actividad máxima de la enzima inmovilizada alcanzaba valores de alrededor de 1400 U/g.

Ejemplo 4: Transesterificación (reacción test de formación de biodiesel)

5

Estudiamos una reacción test de síntesis de biodiésel mediante transesterificación de los triglicéridos con un alcohol. En particular, se estudió la transesterificación de trilaurina con metanol y etanol.



10

trilaurina

15

Las reacciones de trilaurina con metanol o etanol dan como producto principal laurato de metilo o etilo, respectivamente, y como secundarios los mono y diglicéridos y el ácido graso correspondiente debido a la hidrólisis del triglicérido.

20

25

30

35

Las reacciones de transesterificación se llevaron a cabo con concentraciones de trilaurina de 50 mM y una proporción molar trilaurina: alcohol (etanol o metanol) 1:4, utilizando 2-metil-2-butanol (2M2B) como disolvente, 20 mg/ml de biocatalizador, enzima inmovilizada ROL-RH26 obtenida tal como se describe en el ejemplo 2. La reacción se llevó a cabo a 45° C y agitación a 300 rpm. El seguimiento de la reacción se hizo por cromatografía de capa fina (TLC), que permite obtener datos cualitativos y por HPLC que permite cuantificar. Para TLC se empleó como eluyente una disolución de hexano, etil acetato y ácido acético glacial (90:10:1) y como revelador una disolución de EtOH, agua, ácido acético glacial y un azul de Comassie como colorante (20:80:0,5:0,03). Para realizar la identificación de patrones, se prepararon disoluciones 50 mM de cada uno de los compuestos de interés, la trilaurina se disolvió en 2-metil-2-butanol (2M2B) y los derivados de ácido láurico se disolvieron con EtOH, inyectándose 1 µl en placas. La separación del ácido láurico y sus derivados es bastante buena y se observan con facilidad. El aparato de análisis HPLC está compuesto por una bomba cuaternaria Waters E600, un inyector y un detector de fotodiodos Varian ProStar y un detector de índice de refracción Waters 2410, con un a columna Cosmosil C18 de 4,6 x 150 mm y con un tamaño medio de partícula de 4,4 µm, a una temperatura de la columna de 40 °C y la fase móvil formada por metanol y agua, adificados con 0,1% v/v de ácido acético y proporción metanol:agua variable. El tiempo de análisis de cada ensayo fue de entre 25 y 30 minutos. Se muestra un cromatograma típico de la reacción de obtención de laurato de etilo en la figura 2.

40

45

La trilaurina es un compuesto apolar debido a sus cadenas hidrocarbonadas de lauril. La columna que se utilizó es una C18, que tiene cadenas de 18 carbonos, por tanto también es apolar, por lo que la trilaurina tiene mucha afinidad con la columna y se retiene mucho. Conforme disminuyen las cadenas de lauril y aumentan los OH, aumenta la polaridad del compuesto, dilaurina, monolaurina o glicerol, y se arrastra más fácilmente por el metanol, que es polar. El método de análisis se basó en un gradiente de tiempo, variando la composición y flujo de la fase móvil, hasta usar solo metanol.

El perfil de la reacción de obtención de laurato de metilo y laurato de etilo con el biocatalizador ROL-RH26 se muestran respectivamente en las figuras 3a y 3b.

Ejemplo 5: Comparación de la lipasa recombinante del hongo *Rhizopus oryzae* (SEQ ID N° 1) inmovilizada en el soporte RH26 (denominada ROL-RH26) con lipasas comerciales

En primer lugar se comparó la actividad hidrolítica sobre tripropionina de la lipasa ROL-RH26 comparada con varias lipasas comerciales. Se realizaron varias medidas con cantidades de biocatalizador entre 20 y 100 mg, y se obtuvieron los valores medios normalizados por unidad de peso de biocatalizador. Los resultados se recogen en la Tabla 4. Cabe destacar que la lipasa recombinante del hongo *Rhizopus oryzae* (SEQ ID N° 1) inmovilizada en el soporte RH26 obtenida tal como se describe en el ejemplo 2, presenta una actividad superior a la de la lipasa de *C. antarctica* B sobre Lewatit (Novozym 435) y ligeramente inferior a la granulada de *T. lanuginosus* (Lipozyme TL-IM), dos de las lipasas más empleadas en biocatálisis y también de las más caras.

Tabla 4

	ROL-RH26	Novozyme 435	Lipozyme TL-IM	Lipozyme RM-IM
U/g	1347,2	1321,5	1444,5	95,4

Asimismo, se estudiaron las tres lipasas comerciales en la reacción test de formación de biodiesel tal como se describe en el ejemplo 4. Las reacciones de transesterificación de trilaurina con metanol y etanol dan como producto principal laurato de metilo y de etilo, respectivamente, y compuestos secundarios como acilgliceroles (monolaurina y dilaurina), y el ácido graso correspondiente debido a la hidrólisis del triglicérido. Los resultados se compararon con los obtenidos con ROL-RH26.

Al utilizar la enzima ROL inmovilizada en RH26, la trilaurina prácticamente se consume tras 24 horas de reacción (Figuras 3a y 3b), aunque la formación de etil laurato no llega al nivel de la enzima Novozym 435 (Figuras 4a y 4b). En este caso, también hay una importante presencia de ácido láurico debido a la hidrólisis producida por el agua contenida en la enzima.

Cuando se emplea Novozym 435, la trilaurina desaparece a partir de las 24 horas de reacción (Figuras 4a y 4b). El producto de interés es el que tiene mayor presencia, seguido del ácido láurico, lo que da una idea de que la enzima puede contener una cantidad importante de agua. Se observa como la concentración de 1,2-dilaurina desciende a las 24 horas de reacción. Esto es debido a que cuando se consume toda la trilaurina en la reacción, el etanol pasará a interactuar con el diglicérido (ver figura 4b).

En el caso de la Lipozyme TL-IM, la formación de etil laurato es algo más lenta, aunque también se llega a consumir prácticamente todo el triglicérido. La formación de ácido es menor, dado que esta enzima contiene menor cantidad de agua en su estructura (ver figura 5b).

Cuando se utiliza Lipozyme RM-IM, la formación de etil laurato no es tan importante como en los casos anteriores, debido a que la reacción transcurre de una forma más lenta pues a las 24 horas de reacción todavía hay bastante trilaurina sin reaccionar (ver figura 6b).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de una enzima inmovilizada en un soporte, caracterizado porque comprende:
- 5 a) obtener un soporte renovable por tratamiento térmico de un residuo agroalimentario que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en sílice, óxido de catión alcalino, óxido de catión alcalinotérreo y mezcla de los anteriores, e
b) inmovilizar la enzima en el soporte obtenido en la etapa anterior.
- 10 2. Procedimiento de obtención de una enzima inmovilizada según la reivindicación 1, donde el tratamiento térmico de la etapa a) comprende calentar el residuo agroalimentario entre 500 y 700 °C
- 15 3. Procedimiento de obtención de una enzima inmovilizada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde la enzima es una lipasa.
4. Procedimiento de obtención de una enzima inmovilizada según la reivindicación 3, donde la lipasa es una lipasa recombinante del hongo *Rhizopus oryzae* (SEQ ID N° 1).
- 20 5. Procedimiento de obtención de una enzima inmovilizada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el residuo agroalimentario es cáscara de arroz.
6. Procedimiento de obtención de una enzima inmovilizada según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la etapa de inmovilización comprende:
- 25 b1) obtener una disolución de la enzima en tampón fosfato 0,01 y 0,5 M a pH entre 4,5 y 8,5,
b2) mezclar la disolución de la enzima preparada en la etapa b1) con el soporte renovable,
b3) agitar la suspensión entre 4 y 25 °C a no más de 100 rpm, hasta que la cantidad de enzima soportada varíe menos de 2 % entre dos medidas consecutivas,
30 b4) filtrar y lavar la enzima inmovilizada con el tampón fosfato utilizado en la etapa b1).
7. Soporte renovable caracterizado porque comprende entre 40 y 45 % en peso de silicio, presenta estructura amorfa, mesoporosa, y un tamaño de partícula medio inferior o igual a 200 micras.
- 35 8. Soporte renovable según la reivindicación 7, obtenido por tratamiento térmico entre 500 y 700 °C de cáscara de arroz.
- 40 9. Enzima inmovilizada en un soporte renovable, caracterizada porque el soporte renovable se describe tal como se indica en una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8.
10. Enzima inmovilizada en un soporte renovable según la reivindicación 9, donde la enzima es lipasa recombinante del hongo *Rhizopus oryzae* (SEQ ID N° 1).
- 45 11. Uso de un residuo agroalimentario para obtener el soporte renovable tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8.
12. Uso de un residuo agroalimentario según la reivindicación 11, donde dicho residuo es cáscara de arroz.
- 50 13. Método de obtención de biodiesel que comprende:
i) obtener una lipasa recombinante del hongo *Rhizopus oryzae* (SEQ N° 1) inmovilizada en un soporte renovable tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, y

ii) poner en contacto la lipasa inmovilizada obtenida en la etapa anterior con un triglicérido en presencia de un alcohol seleccionado del grupo que consiste en metanol y etanol para obtener biodiesel.

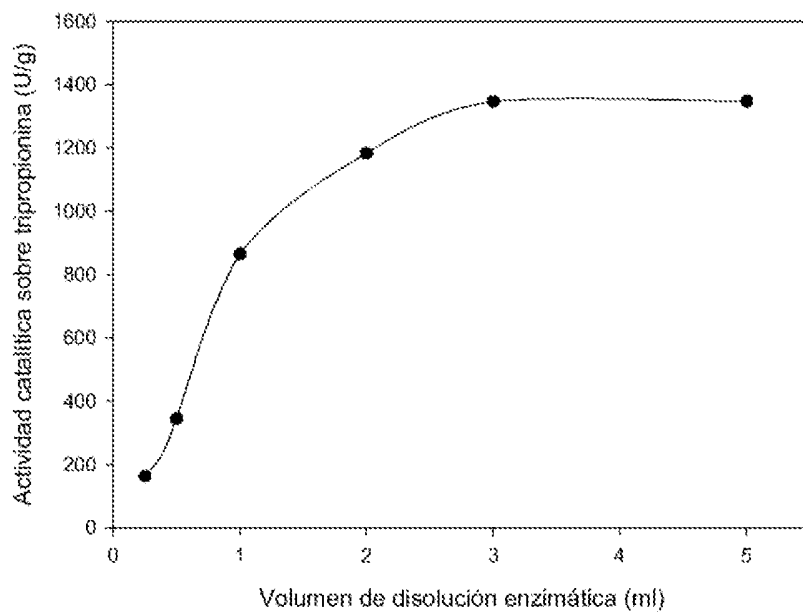


Fig. 1

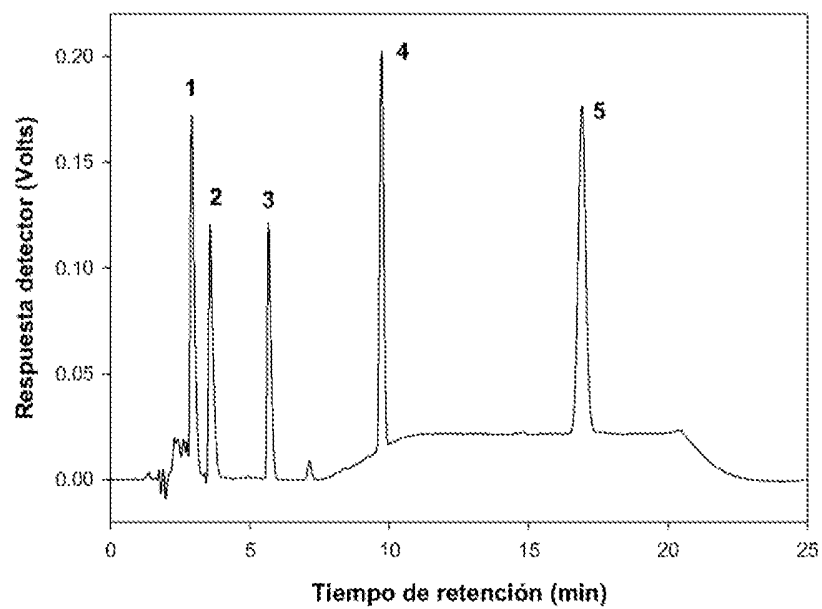


Fig. 2

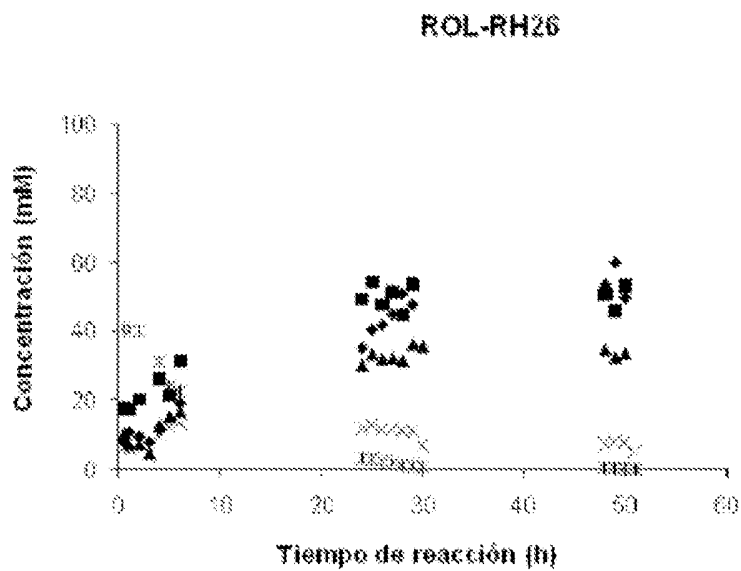


Fig. 3a

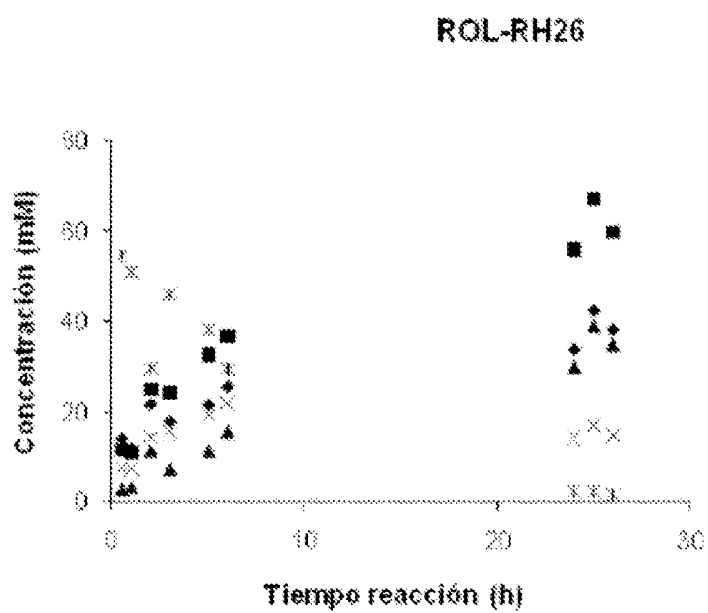


Fig. 3b

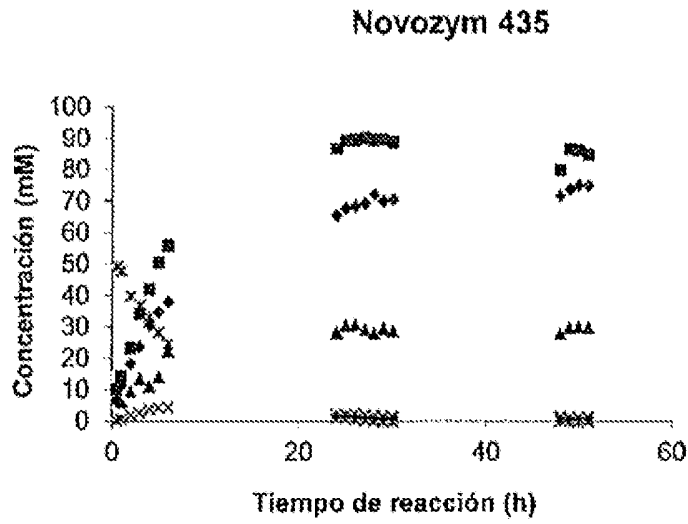


Fig. 4a

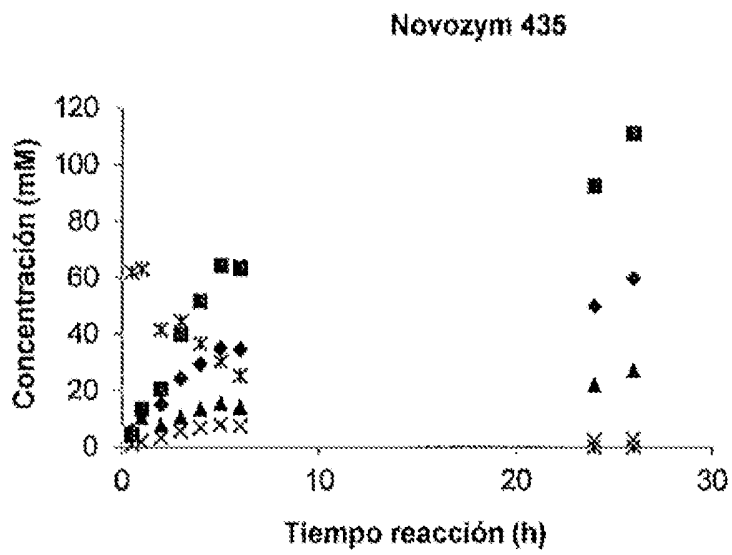


Fig. 4b

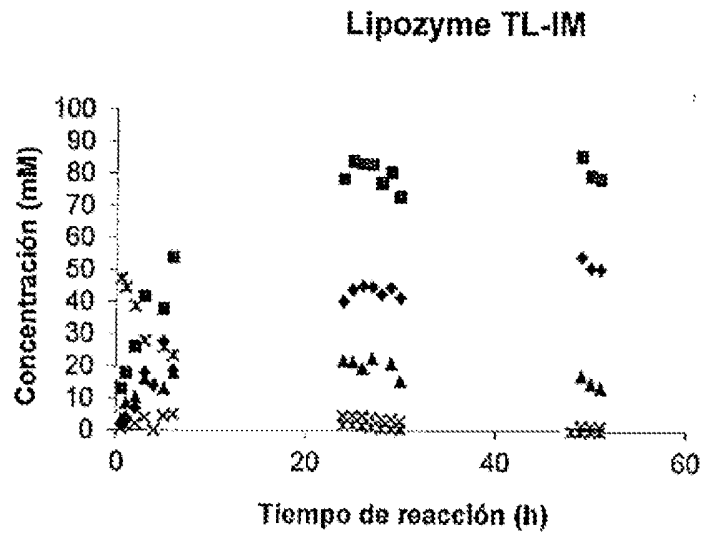


Fig. 5a

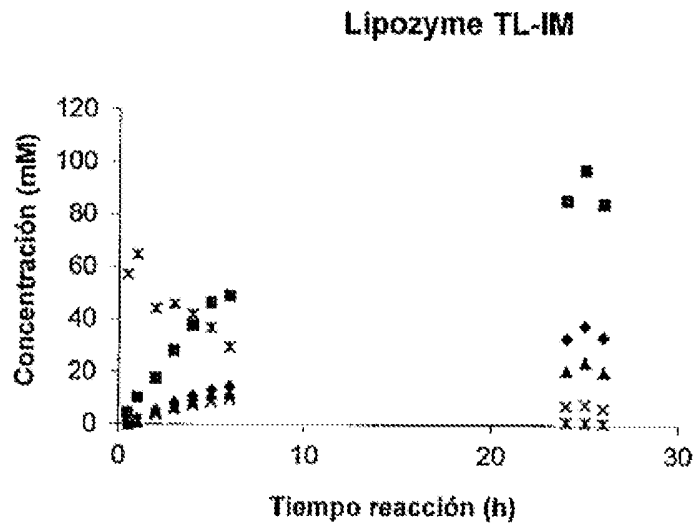


Fig. 5b

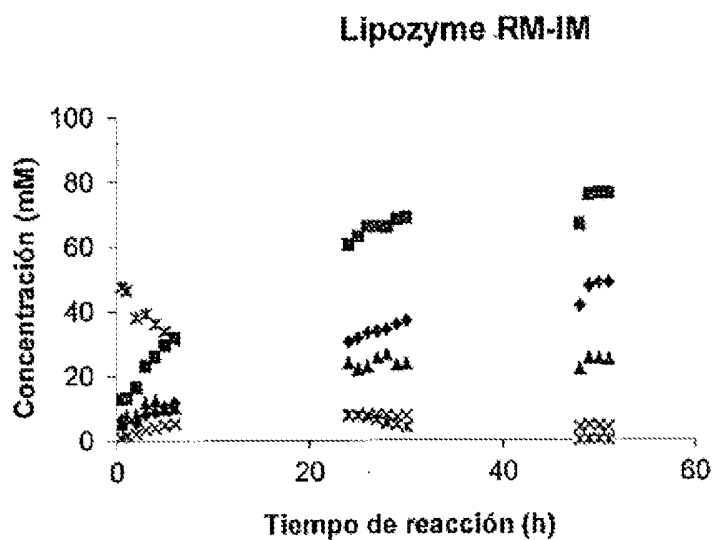


Fig. 6a

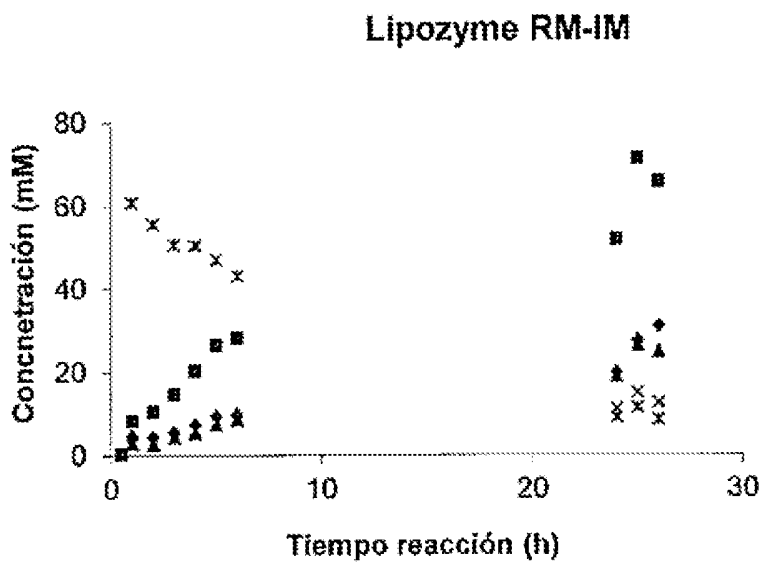


Fig. 6b

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
 Universidad Politécnica de Madrid
 Universitat Autònoma de Barcelona

<120> Procedimiento de obtención de una enzima inmovilizada en un soporte renovable derivado de un residuo agroalimentario

<130> 5120126

<160> 1

<170> BISSAP 1.0

<210> 1
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> *Rhizopus oryzae*

<220>
 <221> SOURCE
 <222> 1..273
 <223> /mol_type="protein"
 /note="Secuencia aminoacídica de la lipasa de *Rhizopus oryzae* expresada en *Pichia pastoris*"
 /organism="Rhizopus oryzae"

<220>
 <221> SITE
 <222> 1..2
 <223> Aminoácidos pertenecientes al final de la secuencia del α -factor de *S. cerevisiae*

<220>
 <221> SITE
 <222> 3..4
 <223> "Aminoácidos codificados cerca de la zona de restricción donde la lipasa fue clonada en el vector pPICZ α A"

<400> 1
 Glu Ala Glu Phe Ser Asp Gly Gly Lys Val Val Ala Ala Thr Thr Ala
 1 5 10 15
 Gln Ile Gln Glu Phe Thr Lys Tyr Ala Gly Ile Ala Ala Thr Ala Tyr
 20 25 30
 Cys Arg Ser Val Val Pro Gly Asn Lys Trp Asp Cys Val Gln Cys Gln
 35 40 45
 Lys Trp Val Pro Asp Gly Lys Ile Ile Thr Thr Phe Thr Ser Leu Leu
 50 55 60
 Ser Asp Thr Asn Gly Tyr Val Leu Arg Ser Asp Lys Gln Lys Thr Ile
 65 70 75 80
 Tyr Leu Val Phe Arg Gly Thr Asn Ser Phe Arg Ser Ala Ile Thr Asp
 85 90 95
 Ile Val Phe Asn Phe Ser Asp Tyr Lys Pro Val Lys Gly Ala Lys Val
 100 105 110
 His Ala Gly Phe Leu Ser Ser Tyr Glu Gln Val Val Asn Asp Tyr Phe
 115 120 125
 Pro Val Val Gln Glu Gln Leu Thr Ala His Pro Thr Tyr Lys Val Ile
 130 135 140
 Val Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Gln Ala Leu Leu Ala Gly Met
 145 150 155 160
 Asp Leu Tyr Gln Arg Glu Pro Arg Leu Ser Pro Lys Asn Leu Ser Ile
 165 170 175
 Phe Thr Val Gly Gly Pro Arg Val Gly Asn Pro Thr Phe Ala Tyr Tyr
 180 185 190
 Val Glu Ser Thr Gly Ile Pro Phe Gln Arg Thr Val His Lys Arg Asp
 195 200 205
 Ile Val Pro His Val Pro Pro Gln Ser Phe Gly Phe Leu His Pro Gly
 210 215 220
 Val Glu Ser Trp Ile Lys Ser Gly Thr Ser Asn Val Gln Ile Cys Thr
 225 230 235 240

ES 2 482 890 B1

Ser Glu Ile Glu Thr Lys Asp Cys Ser Asn Ser Ile Val Pro Phe Thr
245 250 255
Ser Ile Leu Asp His Leu Ser Tyr Phe Asp Ile Asn Glu Gly Ser Cys
260 265 270
Leu



21 N.º solicitud: 201330114

22 Fecha de presentación de la solicitud: 01.02.2013

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

5 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	TANTRAKULSIRI JITAWAN et al. Utilization of rice hull ash as a support material for immobilization of <i>Candida cylindracea</i> lipase. JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society 1997 Feb American Oil Chemists' Soc (02.1997) VOL: 74 No: 2 Págs: 173-175 ISSN 0003-021X (print).	1-13
X	D'SOUZA et al. Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine. JOURNAL OF BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL METHODS, 20020628 AMSTERDAM, NL 28.06.2002 VOL: 52 No: 1 Págs: 59-62 ISSN 0165-022X Doi: doi:10.1016/S0165-022X(02)00032-5.	1
X	DE CASTRO H F et al. Rice straw as a support for immobilization of microbial lipase. Biotechnology Progress 2001 American Chemical Society us (2001) VOL: 17 No: 6 Págs: 1061-1064 ISSN 8756-7938 (print) Doi: doi:10.1021/bp010099t.	1
X	P. VENKATA RAO et al. Production of lipase by <i>Candida rugosa</i> in solid state fermentation. 1: Determination of significant process variables. Process Biochemistry, VOL 28, 1993, páginas 385-389.	1
X	LEE JONG HO et al. Optimization of the process for biodiesel production using a mixture of immobilized <i>Rhizopus oryzae</i> and <i>Candida rugosa</i> lipases. JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, 20080101 KOREAN SOCIETY FOR APPLIED MICROBIOLOGY, SEOUL, KR 01.01.2008 VOL: 18 Págs: 1927-1931 ISSN 1017-7825 Doi: doi:10.4014/JMB.0800.054. Página 1927, columna izquierda; página 1927, columna derecha, último párrafo – página 1928, columna izquierda, primer párrafo; página 1928, columna izquierda, segundo párrafo.	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 n.º:

Fecha de realización del informe
10.03.2015

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N11/02 (2006.01)

C12N9/18 (2006.01)

C10L1/00 (2006.01)

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

C12N, C10L

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

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.03.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 4, 10, 13	SI
	Reivindicaciones 1-3, 5-9, 11 y 12	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-13	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	TANTRAKULSIRI JITAWAN et al. Utilization of rice hull ash as a support material for immobilization of <i>Candida cylindracea</i> lipase. JAOCS, Journal of the American Oil Chemists'; Society 1997 Feb American Oil Chemists'; Soc (02.1997) VOL: 74 No: 2 Págs: 173-175 ISSN 0003-021X (print).	31.01.1997
D02	D'SOUZA et al. Immobilization of invertase on rice husk using polyethylenimine. JOURNAL OF BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL METHODS, 20020628 AMSTERDAM, NL 28.06.2002 VOL: 52 No: 1 Págs: 59-62 ISSN 0165-022X Doi: doi:10.1016/S0165-022X(02)00032-5.	28.06.2002
D03	DE CASTRO H F et al. Rice straw as a support for immobilization of microbial lipase. Biotechnology Progress 2001 American Chemical Society us (2001) VOL: 17 No: 6 Págs: 1061-1064 ISSN 8756-7938 (print) Doi: doi:10.1021/bp010099t.	30.11.2000
D04	P. VENKATA RAO et al. Production of lipase by <i>Candida rugosa</i> in solid state fermentation. 1: Determination of significant process variables. Process Biochemistry, VOL 28, 1993, páginas 385-389.	1993
D05	LEE JONG HO et al. Optimization of the process for biodiesel production using a mixture of immobilized <i>Rhizopus oryzae</i> and <i>Candida rugosa</i> lipases. JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, 20080101 KOREAN SOCIETY FOR APPLIED MICROBIOLOGY, SEOUL, KR 01.01.2008 VOL: 18 Págs: 1927-1931 ISSN 1017-7825 Doi: doi:10.4014/JMB.0800.054. Página 1927, columna izquierda; página 1927, columna derecha, último párrafo – página 1928, columna izquierda, primer párrafo; página 1928, columna izquierda, segundo párrafo.	01.01.2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de patente hace referencia, tal y como ha sido presentada, a un procedimiento de obtención de una enzima inmovilizada en un soporte, que comprende obtener un soporte renovable por tratamiento térmico de un residuo agroalimentario, que comprende un compuesto seleccionado de sílice, óxido de catión alcalino, óxido de catión alcalinotérreo y sus mezclas (reivindicaciones 1 y 6). El tratamiento térmico comprende calentar el residuo agroalimentario entre 500 y 700 grados centígrados (reivindicación 2). La enzima es una lipasa (reivindicación 3), recombinante del hongo *Rhizopus oryzae* (reivindicación 4); el residuo agroalimentario es cáscara de arroz (reivindicación 5). Se reivindica también el soporte renovable que comprende entre 40 y 45% en peso de sílice, estructura amorfa mesoporosa y un tamaño de partícula medio inferior o igual a 200 micras (reivindicaciones 7 y 8), la enzima inmovilizada sobre dicho soporte (reivindicaciones 9 y 10), el uso de un residuo agroalimentario para obtener el soporte renovable (reivindicaciones 11 y 12) y el método de obtención de biodiesel a partir de la lipasa inmovilizada en el soporte renovable (reivindicación 13).

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA ARTS. 6 y 8 DE LA LP

El documento D01 hace referencia al uso de cenizas de cáscara de arroz como soporte para la inmovilización de una lipasa, procedente del microorganismo *Candida cylindracea*. Dichas cenizas consisten principalmente en silicatos y tienen una estructura amorfa (véase página 173, columna izquierda). Para obtener las cenizas de cáscara de arroz como soporte para la inmovilización de la enzima, se quemaron las cáscaras de arroz a una temperatura de 700 grados centígrados durante 2 horas (véase página 173, columna derecha, segundo párrafo). La inmovilización de la enzima se hizo obteniendo una disolución de la enzima en tampón fosfato, mezclando la disolución de la enzima con el soporte, agitando, filtrando y lavando la enzima inmovilizada (véase página 173, columna derecha, tercer párrafo). La lipasa procedente de *Candida cylindracea* tiene un gran potencial para la producción industrial de ácidos grasos y glicerol (véase página 173, columna izquierda, primer párrafo).

El documento D02 se refiere al uso de cascara de arroz como soporte para la inmovilización de enzimas. La enzima que se inmovilizó fue una invertasa. La cáscara de arroz, se lavó, se secó y se revistió con polietilenimina (PEI al 2%), la invertasa se inmovilizó en este soporte a través de adsorción mediante reticulación con glutaraldehído al 2%. La enzima inmovilizada se reutilizó para realizar la hidrólisis de sacarosa sin que se observase pérdida de su actividad (véase resumen, página 60, primer y segundo párrafo y página 61, tercer párrafo).

El documento D03 trata sobre el estudio de la paja de arroz como matriz de soporte o soporte (véase página 1064, columna izquierda, último párrafo) para la inmovilización de enzimas, tales como lipasas (véase página 1061, columna izquierda). Se llevó a cabo un estudio sobre la inmovilización de la lipasa de *Candida rugosa* usando como soporte paja de arroz (véase página 1061, columna derecha, primer párrafo), la paja de arroz se lavó con agua destilada y después se secó a 100 grados centígrados antes de utilizarse como matriz de soporte (véase página 1061, columna derecha, cuarto párrafo), después la enzima se unió al soporte activada previamente con glutaraldehído.

El documento D04 indica la posible inmovilización de lipasas sobre salvado de arroz (véase resumen). Se trató el salvado de arroz previamente, en uno de los pasos del proceso las muestras de arroz se hidrolizaron con CIH durante 8 horas a 100 grados centígrados (véase página 386, columna izquierda, tercer párrafo). Una vez tratado el arroz se llevó a cabo la inmovilización de la lipasa sobre el salvado de arroz (véase página 386, columna derecha, segundo párrafo). La lipasa inmovilizada fue *Candida rugosa*.

El documento D05 se refiere a un proceso enzimático para la producción de biodiesel utilizando una mezcla de lipasas formada por lipasas de *Rhizopus oryzae* y lipasas de *Candida rugosa* (véase página 1928, columna izquierda, segundo párrafo). En este estudio se indica que las lipasas son enzimas que pueden producir biodiesel a partir de alcoholes y aceites vegetales (véase página 1927, columna izquierda). Las lipasas se inmovilizaron en gel de sílice (véase página 1927, columna derecha, último párrafo-página 1928, columna izquierda, primer párrafo).

Por lo tanto, la presente solicitud de patente, a partir de los documentos citados del estado de la técnica, y tal y como se ha presentada, parece carecer de novedad y actividad inventiva ya que se han encontrado documentos (véase documento D01), en los que se utilizan cenizas de cáscara de arroz como soporte para la inmovilización de lipasas y también se ha encontrado el procedimiento de obtención de la enzima inmovilizada, el soporte renovable, el uso del residuo agroalimentario para la obtención del soporte renovable y el uso de dicha lipasa para la obtención de biodiesel (véase documento D05). Por ello, las reivindicaciones 1- 3, 5-9 y 11-12, carecen de novedad, mientras que las reivindicaciones 4, 10 y 13 parecen poseer novedad pero carecen de actividad inventiva. Las reivindicaciones 4, 10 y 13 poseen novedad porque la lipasa utilizada en el documento D01 es la lipasa procedente de *Candida cylindracea* y no es una lipasa recombinante del hongo *Rhizopus oryzae*, pero carecen de actividad inventiva porque no se indica en la presente solicitud de patente que la inmovilización de la lipasa procedente de *Rhizopus oryzae* sea la única que se pueda llevar a cabo, existen otras lipasas procedentes de otros microorganismos (por ejemplo, procedente de *Candida antártica*) que también se pueden inmovilizar en dicho soporte renovable, por lo que en principio, sería evidente para un experto en la materia la inmovilización de cualquier lipasa en dicho soporte, a no ser que se especificase lo contrario. Y por último, el método de obtención de biodiesel carecería de actividad inventiva porque en el documento D05 se describe el uso de lipasas (*Rhizopus oryzae*) para la producción de biodiesel. Además, el documento D02 describe la inmovilización de una enzima sobre cáscara de arroz por lo que este documento también haría que la reivindicación 1 careciese de novedad y actividad inventiva y lo mismo se puede decir de los documentos D03 y D04, en los que se utiliza, como soporte para la inmovilización de enzimas, paja de arroz (documento D03) y salvado de arroz (documento D04). Por consiguiente, las reivindicaciones 1- 3, 5-9 y 11-12 carecen de novedad y actividad inventiva, mientras que las reivindicaciones 4, 10 y 13 poseen novedad pero carecen de actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la LP.