



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 094**

51 Int. Cl.:
C12P 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06700945 .6**

96 Fecha de presentación : **10.01.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1838860**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.10.2007**

54 Título: **Proceso para la producción de ésteres alquílicos de ácidos grasos a partir de triglicéridos y alcoholes que utilizan una combinación de dos enzimas lipolíticas.**

30 Prioridad: **10.01.2005 DK 2005 00041**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.07.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.07.2011

73 Titular/es: **NOVOZYMES A/S**
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es: **Abo, Masanobu;**
Christensen, Morten, Würtz y
Hu, Zhengyu

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 363 094 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proceso para la producción de ésteres alquílicos de ácidos grasos a partir de triglicéridos y alcoholes que utilizan una combinación de dos enzimas lipolíticas

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 [0001] La presente invención se refiere a un método para producir ésteres alquílicos de ácidos grasos a partir de triglicéridos usando una primera enzima lipolítica que favorece la conversión de triglicéridos a ésteres alquílicos de ácido graso y una segunda enzima lipolítica que favorece la conversión de ácidos grasos libres a ésteres alquílicos de ácido graso.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

- 10 [0002] El biodiesel, generalmente clasificado como ésteres de mono-alquilo de grasas y aceites, se ha vuelto más atractivo recientemente debido a sus beneficios medioambientales. Aunque el biodiesel es en la actualidad exitosamente producido químicamente (usando por ejemplo NaOH y/o metóxido sódico como catalizador), hay diferentes problemas asociados para restringir su desarrollo, tales como el pre-procesamiento del aceite debido a un alto contenido de ácidos grasos libres, la eliminación del catalizador químico de fase de éster y fase de glicerol y la
15 eliminación de las sales inorgánicas durante la recuperación del glicerol.

[0003] Las desventajas provocadas por los catalizadores químicos son en gran medida evitadas usando enzimas lipolíticas como catalizadores y en los últimos años se ha desarrollado un interés en el uso de lipasas con o sin inmovilización en la transesterificación para la producción de biodiesel.

- 20 [0004] Las esterasas fúngicas se pueden utilizar en la producción enzimática de ésteres, donde pueden reemplazar a catalizadores como ácido mineral (p. ej. ácido sulfúrico, cloruro de hidrógeno, y ácido clorosulfónico), hidróxidos anfóteros de metales de los grupos I, II, III, y IV, y otros. El uso de enzimas para la síntesis de éster ha sido descrito en la técnica anterior, en particular las enzimas clasificadas en EC 3.1.1 hidrolasas de éster carboxílico según la nomenclatura enzimática (Recommendations of the Nomenclature Committee of the international Union of Biochemistry and Molecular Biology, 1992 o posterior).

- 25 [0005] La WO 88/02775 divulga lipasas A y B de *Candida antarctica*. Declara que la lipasa B de la *C. antarctica* (LBCA) es más eficaz para la síntesis del éster.

- [0006] El documento de la patente US-A-5 713 965 divulga un método para producir ésteres alquílicos de ácido graso de un sustrato que comprende triglicéridos y ácidos grasos libres y un alcohol que contiene de 1 a 5 átomos de carbono que utilizan una enzima lipolítica tal como la lipasa B de *Candida antarctica*, o lipasas derivadas de *Pseudomona cepacia*, *Geotrichum candidum*, *Rhizomucor miehei*, o *Rhizopus delemar*.
30

- [0007] El documento de la patente EP-A2-0 407 959 divulga un método para producir monoésteres de ácido graso de poliol a partir de ácidos grasos libres y polioles, o de triglicéridos, tales como grasa o aceite vegetal o de origen animal, y polioles en presencia de un alcohol que contiene de 1 a 5 átomos de carbono que utilizan la lipasa de *Candida antarctica* inmovilizada sp-382, que de hecho es una combinación de las dos enzimas lipolíticas lipasa A de *Candida antarctica* y lipasa B de *Candida antarctica*.
35

[0008] Las cutinasas son enzimas lipolíticas capaces de hidrolizar la cutina de sustrato. Las cutinasas son conocidas gracias a varios hongos (P.E. Kolattukudy en "Lipases", Ed. B. Borgström y H.L. Brockman, Elsevier 1984, 471-504). La secuencia de aminoácidos de una cutinasa de *Humicola insolens* ha sido publicada (US 5,827,719).

- 40 [0009] Muchos investigadores han informado de que un rendimiento elevado de ésteres alquílicos se podría alcanzar en presencia de solventes orgánicos, pero debido a la toxicidad e inflamabilidad de la alcoholisis catalizada de lipasa de solventes orgánicos es preferible en un medio sin solvente. Se ha demostrado que la metanólisis catalizada por lipasas se da en un sistema que contiene agua libre de solventes orgánicos. En tales sistemas, las lipasas que son menos sensibles al metanol son favorables (Kaieda et al. J. Biosci. Bioeng. 2001, 91:12-15). Es bien conocido que los alcoholes de cadena corta excesivos tales como metanol pueden inactivar seriamente la lipasa. No obstante, al menos tres equivalentes molares de metanol se requieren para la conversión completa del aceite a su éster metílico correspondiente. Du et al. (Biotechnol. Appl. Biochem. 2003, 38:103-106) estudiaron el efecto de la proporción molar de aceite/metanol comparativamente durante una operación por lotes no continuo y por lotes continuo.

- [0010] Para evitar la inactivación de las lipasas la concentración de metanol se ha mantenido baja añadiendo gradualmente metanol en toda la reacción (Shimada et al. J Mol Catalysis Enzymatic, 2002, 17:133-142; Xu et al. 2004, Biocat. Biotransform. 22:45-48).
50

[0011] Boutur et al. (J. Biotechnol. 1995, 42:23-33) divulgó una lipasa de *Candida deformans* que era capaz de catalizar tanto la alcoholisis de triglicérido (TG) y la esterificación de ácidos grasos libres (AGL), pero no bajo las mismas condiciones de reacción. Bajo las condiciones descritas por Boutur et al. sólo la esterificación fue catalizada.

- 55 [0012] Para obtener una producción más económica de ésteres de etilo de ácido graso para biodiesel, es necesaria una conversión más rápida de grasas y aceites a sus ésteres de metilo correspondientes y un rendimiento más alto en dicha conversión.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0013] La presente invención se refiere a un método para producir ésteres alquílicos de ácido graso, tales como ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) y ésteres etílicos de ácidos grasos. Tales ésteres son también llamados biodiesel, porque se usan como un aditivo al gasóleo mineral para dar como resultado un combustible sin azufre, con un número más alto de cetano, que está parcialmente basado en recursos renovables.

[0014] El método de la invención incluye una solución que comprende alcohol, triglicéridos y ácidos grasos libres, dicha solución se contacta con una primera enzima lipolítica y una segunda enzima lipolítica de diferente especificidad, donde las enzimas lipolíticas catalizan la conversión de una mezcla de triglicéridos y ácidos grasos libres a ésteres alquílicos de ácidos grasos. La actividad de las primeras y segundas enzimas lipolíticas es determinada usando los métodos descritos en el ejemplo 1 y 2 mencionados abajo.

[0015] La primera enzima lipolítica se define como una enzima que tiene una proporción de actividad de TG/actividad de FFA por debajo de 0.2. La segunda enzima lipolítica se define como una enzima que tiene una proporción de actividad de TG/actividad de FFA por encima de 0.5.

[0016] La combinación de una primera enzima lipolítica y una segunda enzima lipolítica según la presente invención resulta en un efecto sinérgico en la conversión de triglicéridos y triglicéridos en combinación con ácidos grasos libres a ésteres alquílicos de ácidos grasos, por la cual un porcentaje más alto de conversión se obtiene en un periodo de tiempo más corto.

[0017] Además, la invención se refiere a un proceso por lotes o un proceso continuo por etapas para producir ésteres alquílicos de ácidos grasos usando una primera y una segunda enzima lipolítica como se ha descrito anteriormente, donde el alcohol se añade continuamente o gradualmente, y donde las enzimas son recicladas o usadas sólo una vez.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0018] La presente invención se refiere a un método para producir ésteres alquílicos de ácidos grasos. El método de la invención incluye una solución que comprende alcohol, y un sustrato, que comprende triglicéridos y ácidos grasos libres. La solución es contactada con una primera enzima lipolítica y una segunda enzima lipolítica de diferente especificidad, donde las enzimas lipolíticas catalizan la conversión de una mezcla de triglicéridos y ácidos grasos libres o una mezcla de ambos a ésteres alquílicos de ácidos grasos.

[0019] Sustratos Los sustratos adecuados para producir ésteres alquílicos de ácidos grasos conforme a la presente invención son una amplia variedad de aceites vegetales y grasas; aceites de semilla de soja y de semilla de colza son los que se utilizan con más frecuencia, aunque otros cultivos tales como aceite de mostaza, de girasol, de canola, de coco, de cáñamo, de palma e incluso de algas resultan prometedores. El sustrato puede ser de calidad cruda o más procesada (refinado, decolorado y desodorizado). También se pueden utilizar grasas animales, incluyendo sebo, manteca de cerdo, ave, aceite marino al igual que residuos vegetales y grasas y aceites animales, comúnmente conocidas como grasa marrón y amarilla. Las grasas y aceites adecuados pueden ser una mezcla de triglicéridos y ácidos grasos libres, comúnmente vistos en aceites de residuos vegetales y grasas animales. El sustrato puede también ser obtenido de los destilados desodorizantes de aceites vegetales. El tipo de ácidos grasos del sustrato comprende aquellos de origen natural como glicéridos de las grasas y aceites animales y vegetales. Estos incluyen ácido oleico, ácido linoleico, ácido linoléico, ácido de palmético y ácido láurico por nombrar algunos. Ingredientes menores en aceites vegetales crudos son típicamente fosfolípidos, ácidos grasos libres y glicéridos parciales es decir mono- y diglicéridos. Cuando se usa aquí la frase "residuos de ácidos grasos" se refiere a ácidos grasos, bien libres o esterificados como en triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos o ésteres alquílicos de ácidos grasos.

[0020] Biodiesel Los ésteres alquílicos de ácidos grasos, tales como ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) y ésteres etílicos de ácidos grasos son también llamados biodiesel, porque se usan como aditivo al gasóleo fósil. El biodiesel constituye un aditivo o sustituto importante en aumento para combustibles de gasóleo basados en aceite fósil porque se produce a partir de recursos renovables.

[0021] Alcohol El alcohol usado en el método de la invención es un alcohol inferior que contiene de 1 a 5 átomos de carbono (C₁-C₅), Los alcoholes preferidos son el metanol y el etanol.

[0022] Enzima lipolítica La actividad de las enzimas lipolíticas contra triglicéridos y ácido graso libre se determina como se describe en el ejemplo 1 y ejemplo 2, respectivamente.

[0023] Según la presente invención, la primera enzima lipolítica se define como una enzima que tiene una proporción de actividad en triglicéridos (medido durante la conversión de triglicéridos a ésteres alquílicos de ácido graso) a actividad en FFA (medido durante la conversión de los AGL a ésteres alquílicos de ácidos grasos) por debajo de 0.2. La segunda enzima lipolítica es definida como una enzima que tiene una proporción de actividad en triglicéridos (medido durante la conversión de triglicéridos a ésteres alquílicos de ácidos grasos) a actividad en FFA (medido durante la conversión de FFA a ésteres alquílicos de ácido graso) por encima de 0.5.

[0024] Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para la producción de ésteres alquílicos de ácidos grasos, caracterizado por el hecho de que una solución que comprende triglicéridos, ácidos grasos libres y alcohol se contacta con una primera enzima lipolítica que tiene una proporción de actividad en triglicérido a actividad en FFA por debajo de 0.2 y una segunda enzima lipolítica con una proporción de actividad en triglicérido a actividad en FFA por

encima de 0.5.

[0025] La primera enzima lipolítica tiene preferiblemente una proporción de actividad en triglicéridos a actividad en FFA en el intervalo de 0.01 - 0.2, más preferiblemente en el intervalo de 0.01 - 0.1, más preferiblemente en el intervalo de 0.0125 - 0.05, más preferiblemente en el intervalo de 0.015 - 0.025, incluso más preferiblemente en el intervalo de 0.02 - 0.024. La segunda enzima lipolítica tiene preferiblemente una proporción de actividad en triglicérido a actividad en FFA en el intervalo de 0.5 - 20, más preferiblemente en el intervalo de 0.6 - 10, más preferiblemente en el intervalo de 0.7 - 5, incluso más preferiblemente en el intervalo de 0.8 - 1.5.

[0026] Como se ha declarado anteriormente, la actividad de las enzimas lipolíticas contra triglicéridos y ácido graso libre se determina como se describe en el ejemplo 1 y ejemplo 2, respectivamente. Mencionada debajo, la proporción de actividad en triglicéridos (abreviado TG) como se mide en el ejemplo 1 a actividad en ácidos grasos libres (abreviado FFA) como medida en el ejemplo 2, ha sido calculada para las enzimas lipolíticas evaluadas:

CALB:	TG/FFA = 0.55/26.41 = 0.021
Cutinasa de <i>H. insolens</i> :	TG/FFA = 12.13/10 = 1.213
Lipasa de <i>T. lanuginosus</i> :	TG/FFA = 13.22/16.25 = 0.814.

[0027] La combinación de una primera enzima lipolítica y una segunda enzima lipolítica según la presente invención resulta en un efecto sinérgico en la conversión de triglicéridos y/o ácidos grasos libres a ésteres alquílicos de ácidos grasos, con lo cual se obtiene un mayor porcentaje de conversión en un periodo de tiempo más corto.

[0028] En una forma de realización preferida del método de la presente invención, una primera enzima lipolítica de la presente invención es lipasa B de *Candida antarctica* (LBAC) como se describe en WO 88/02775, mientras que la segunda enzima lipolítica es una enzima de las variantes de lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (previamente *Humicola lanuginosus*) ejemplificadas en WO 00/60063 y las variantes de cutinasa de *Humicola insolens* descritas en el ejemplo 2 de WO 01/92502, de ahora en adelante referida como lipasa de *T. lanuginosus* y cutinasa de *H. insolens* respectivamente. En una segunda forma de realización preferida, una primera enzima lipolítica incluye lipasa de *Hyphozyma* sp. y lipasa de *Candida parapsilosis*, mientras que una segunda enzima lipolítica de la presente invención incluye lipasa A de *C. antarctica* como se describe en WO 88/02775 y lipasas de *Thermomyces lanuginosus* (EP 258 068), *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Geotrichum candidum*, *Rhizomucor miehei*, *Cryptococcus* spp. S-2 y *Candida parapsilosis*.

[0029] En una tercera forma de realización la primera enzima lipolítica es homóloga de CALB, lipasa de *Hyphozyma* sp. o lipasa de *Candida parapsilosis*, mientras que la segunda enzima lipolítica es homóloga de la cutinasa de *H. insolens* o cualquiera de las lipasas de *Thermomyces lanuginosus* (EP 258 068), *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Geotrichum candidum*, *Rhizomucor miehei*, *Criptococo* spp. S-2 y *Candida parapsilosis*.

[0030] Preferiblemente, la primera enzima lipolítica según el método de la presente invención es un 60% idéntica a CALB, mientras que la segunda enzima lipolítica es un 60% idéntica a la lipasa de *T. lanuginosus*, la cutinasa de *H. insolens*. Más preferiblemente la primera enzima lipolítica es un 70% idéntica a CALB, incluso más preferiblemente la primera enzima lipolítica es un 75%, 80%, 85%, 88%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o incluso 99% idéntica a CALB. De forma similar, la segunda enzima lipolítica es preferiblemente un 70% idéntica a la lipasa de *T. lanuginosus* y a la cutinasa de *H. insolens*, más preferiblemente la segunda enzima lipolítica es en un 75%, 80%, 85%, 88%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o incluso un 99% idéntica a la lipasa de *T. lanuginosus* o cutinasa de *H. insolens*.

[0031] Las enzimas se pueden aplicar como polvo liofilizado, inmovilizadas o en solución acuosa.

[0032] Para objetivos de la presente invención, el grado de identidad puede ser adecuadamente determinado según el método descrito en Needleman, S.B. and Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-45, con los siguientes ajustes para la comparación de secuencias de polipéptidos: penalización de creación de GAPs (huecos) de 3.0 y penalización de extensión de GAPs de 0.1. La determinación puede realizarse mediante un programa de ordenador conocido tal como GAP proporcionado en el GCG program package (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711).

[0033] Dos secuencias dadas se pueden alinear según el método descrito en Needleman (supra) usando los mismos parámetros. Se puede realizar mediante el programa GAP (supra).

[0034] Además, la invención se refiere a un proceso por lotes y/o un proceso continuo, por etapas para producir ésteres alquílicos de ácidos grasos usando una primera y una segunda enzima lipolítica como se ha descrito anteriormente, donde el alcohol se añade continuamente o gradualmente, y donde las enzimas son recicladas o usadas sólo una vez. Si las enzimas están en una fase acuosa, esta fase se puede separar de la fase grasa por un decantador o por centrifugado. En el proceso continuo las dos fases, de aceite y acuosa, respectivamente, pueden ser procesadas contrariamente. Kosugi, Y; Tanaka, H. y Tomizuka, (1990), Biotechnology and Bioengineering, vol .36, 617-622, describe un proceso continuo, a contracorriente para hidrolizar aceite vegetal por lipasa inmovilizada.

Descripción general de la preparación de ésteres alquílicos de ácidos grasos

[0035] El sustrato que comprende triglicéridos y ácidos grasos libres se mezcla con alcohol, metanol o etanol preferiblemente y es calentado a 30-60 °C, preferiblemente 50 °C en un baño de agua con agitación recíproca (200 rpm). El agua se añade preferiblemente y la solución se mezcla y además se calienta a la temperatura deseada. Las enzimas se añaden y la solución se mezcla enérgicamente y se deja en baño de agua con agitación recíproca a la temperatura deseada, preferiblemente a 50°C y 200 rpm para que reaccione. Las fases de la mezcla reactiva pueden mezclarse usando mezcladores de alta cizalla, tales como los tipos de Silverson o IKA Labortechnik, como usados en el desgomado enzimático de aceite vegetal (Clausen, K. (2001), European Journal of Lipid Science and Technology, vol. 103, 333-340).

[0036] La proporción molar [metanol]/[residuo de ácidos grasos] debería ser por lo menos de 0.1 y como mucho de 10, preferiblemente en el intervalo de 0.3-5, más preferiblemente 0.4-2. El alcohol puede ser añadido gradualmente a la reacción con el paso del tiempo. El agua se puede añadir separadamente o dentro de una solución enzimática acuosa. La concentración final de agua en la mezcla reactiva puede ser de 0-50% (p/p), preferiblemente 5-40%, más preferiblemente 5-30%. El sustrato comprende un 1-99% (p/p) de triglicéridos, preferiblemente en el intervalo de 70-95%. Además, el sustrato comprende ácidos grasos libres con un total de 0.01-95% (p/p), preferiblemente en el intervalo de 0.01-30%. También, puede haber mono- y diglicéridos y fosfolípidos.

[0037] El curso de la reacción se puede seguir retirando muestras de la mezcla reactiva después de un cierto periodo de tiempo de reacción. Las muestras se centrifugan durante 14 minutos a 14000 rpm. La capa superior consiste en material graso no soluble en la fase acuosa y se analiza por ¹H RMN (usando CDCl₃ como solvente). Después de que la reacción haya cesado, la fase de glicerol es eliminada bien por decantación o centrifugado.

Clonación de una secuencia de ADN que codifica una enzima lipolítica

[0038] La secuencia de ADN que codifica una enzima lipolítica madre se puede aislar a partir de cualquier célula o microorganismo que produzca la enzima lipolítica en cuestión, usando varios métodos bien conocidos en la materia. Primero, un ADN genómico y/o genoteca de ADNc debería ser construido usando ADN cromosómico o ARN mensajero del organismo que produce la enzima lipolítica que debe ser estudiada. Entonces, si la secuencia de aminoácidos de la enzima lipolítica es conocida, las investigaciones etiquetadas oligonucleótidas se pueden sintetizar y se pueden utilizar para identificar clones codificadores de enzimas lipolíticas de una genoteca obtenida a partir del organismo en cuestión. Alternativamente, una sonda de las investigaciones oligonucleótidas que contiene secuencias homólogas de otro gen de enzima lipolítica conocido podría ser usado como una investigación para identificar clones codificadores de enzimas lipolíticas, usando hibridación y condiciones de lavado de astringencia inferior.

[0039] Otro método para identificar clones codificadores de enzimas lipolíticas implicarían insertar fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, transformando bacterias cutinasas negativas con el ADN de la genoteca resultante, y luego colocando en placas la bacteria transformada en un agar que contenga un sustrato para enzima lipolítica (es decir, triglicérido), permitiendo así identificar los clones que expresan la enzima lipolítica.

[0040] Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica la enzima se puede preparar sintéticamente por métodos estándar establecidos, por ejemplo el método de fosforamidita descrito por S.L. Beaucage and M.H. Caruthers, (1981), Tetrahedron Letters 22, págs. 1859-1869, o el método descrito por Matthes et al., (1984), EMBO J.3, págs. 801-805. En el método de fosforamidita, los oligonucleótidos son sintetizados, por ejemplo en un sintetizador de ADN automático, purificado, recocado, ligado y clonado en vectores apropiados.

[0041] Finalmente, la secuencia de ADN puede ser de origen sintético y genómico mezclado, origen mezclado sintético y de origen de ADNc u origen mezclado genómico y de ADNc, preparado ligando fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (como es apropiado, los fragmentos que corresponden a varias partes de toda la secuencia de ADN), conforme a técnicas estándar. La secuencia de ADN puede también ser preparada por reacción en cadena de polimerasa (RCP) usando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en US 4,683,202 o R.K. Saiki et al., (1988), Science 239, 1988, págs. 487-491.

Vector de expresión

[0042] El vector de expresión recombinante que lleva la secuencia de ADN que codifica una enzima lipolítica usada en la invención puede ser cualquier vector que pueda convenientemente ser sometido a procedimientos de ADN recombinantes, y la elección del vector frecuentemente dependerá de la célula huésped que ha de ser introducida. El vector puede ser uno que, cuando sea introducido en una célula huésped, se integre en el genoma de la célula huésped y se replique junto con el(los) cromosoma(s) en el que ha sido integrado. Ejemplos de vectores de expresión adecuados incluyen pMT838.

[0043] El vector de expresión usado en la invención puede también comprender un terminador de transcripción adecuado y, en secuencias de eucariotas y de poliadenilación operativamente conectadas a la secuencia de ADN que codifica la enzima lipolítica usada en la invención. Secuencias de terminación y poliadenilación pueden adecuadamente derivar de las mismas fuentes que el promotor.

[0044] El vector puede comprender además una secuencia de ADN que permite al vector replicar en la célula huésped en cuestión. Ejemplos de tales secuencias son los orígenes de replicación de plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 y pIJ702.

[0045] El vector puede también comprender un marcador seleccionable, por ejemplo un gen producto del cual complementa un defecto en la célula huésped, tal como los genes *dal* de *B. subtilis* o *B. licheniformis*, o uno que confiera resistencia antibiótica tal como resistencia a la ampicilina, a la canamicina, al cloranfenicol o a la tetraciclina. Además, el vector puede comprender marcadores de selección de *Aspergillus* tales como *amdS*, *argB*, *niaD* y *sC*, un marcador que aumenta la resistencia a la higromicina, o la selección se puede realizar por cotransformación, por ejemplo como se describe en WO 91/17243.

[0046] Los procedimientos usados para enlazar el constructo de ADN usado en la invención que codifica una variante de cutinasa, el promotor, terminador y otros elementos, respectivamente, y que los inserta en vectores adecuados con la información necesaria para una replicación, son conocidos por personas expertas en la técnica (cf., por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989).

Promotor

[0047] En el vector, la secuencia de ADN debería estar operativamente conectada a una secuencia del promotor adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula huésped elegida y se pueden derivar de genes que codifican proteínas ya sean heterólogas o bien homólogas a la célula huésped.

[0048] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de ADN que codifica una enzima lipolítica usada en la invención, especialmente en un huésped bacteriano, son el promotor del operón *lac* de *E. coli*, los promotores del gen de agarasa *dagA* de *Streptomyces coelicolor*, los promotores del gen de alfa-amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, los promotores del gen de amilasa maltogénica (*amyM*) de *Bacillus stearothermophilus*, los promotores de la alfa-amilasa (*amyQ*) de *Bacillus amyloliquefaciens*, los promotores de los genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis* etc. Para la transcripción en un huésped fúngico, ejemplos de promotores útiles son aquellos derivados del gen que codifica TAKA amilasa de *A. oryzae*, el promotor de TPI (triosa fosfato isomerasa) de *S. cerevisiae* (Alber et al. (1982), *J. Mol. Appl. Genet* 1, págs. 419-434, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra de *A. niger*, alfa-amilasa ácido estable de *A. niger*, glucoamilasa de *A. niger*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *A. oryzae*, triosafosfato isomerasa de *A. oryzae*, o acetamidasa de *A. nidulans*.

Células huéspedes

[0049] La célula usada en la invención, que comprende sea un constructo de ADN o sea un vector de expresión de la invención tal como se ha definido anteriormente, es ventajosamente usada como una célula huésped en la producción recombinante de una enzima lipolítica usada en la invención. La célula se puede transformar con el constructo de ADN usado en la invención que codifica la enzima lipolítica, integrando convenientemente el constructo de ADN (en una o más copias) en el cromosoma huésped. Esta integración es generalmente considerada ventajosa dado que la secuencia de ADN es más propensa a mantenerse estable en la célula. La integración de los constructos de ADN en el cromosoma huésped se puede realizar según métodos convencionales, por ejemplo por recombinación homóloga o heteróloga. Alternativamente, la célula se puede transformar con un vector de expresión como se ha descrito anteriormente en relación con los diferentes tipos de células huéspedes.

[0050] La célula usada en la invención puede ser una célula de un organismo superior tal como un mamífero o un insecto, particularmente una célula microbiana, por ejemplo una célula bacteriana o fúngica (incluyendo levadura).

[0051] Ejemplos de bacterias adecuadas son bacterias Gram positivas tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, o *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*, o bacterias gram negativas tales como la *E. coli*. La transformación de las bacterias se puede, por ejemplo, efectuar transformando el protoplasto o usando células competentes en cierto modo conocidas per se.

[0052] El organismo de levadura puede favorablemente ser seleccionado de unas especies de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*.

[0053] La célula huésped puede también ser un hongo filamentoso por ejemplo una cepa de unas especies de *Aspergillus*, particularmente *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger*, o una cepa de *Fusarium*, tal como una cepa de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium Graminearum* (en la *Gibberella zeae* nombrada de estado perfecto, previamente *Sphaeria zeae*, sinónimo de *Gibberella roseum* y *Gibberella roseum* f. sp. *cerealis*), o *Fusarium sulphureum* (en el estado perfecto nombrada *Gibberella puricaris*, sinónimo de *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium roseum*, y *Fusarium roseum* var. *graminearum*), *Fusarium cerealis* (sinónimo de *Fusarium crockwellense*), o *Fusarium venenatum*.

[0054] La célula huésped puede ser una proteasa deficitaria o cepa menor de proteasa. Ésta puede por ejemplo ser la cepa carente de proteasa *Aspergillus oryzae* JaL 125 con el gen de proteasa alcalina llamado "alp" eliminado. Esta cepa es descrita en WO 97/35956 (Novo Nordisk).

[0055] Las células de hongos filamentosas se pueden transformar por un proceso que implica la formación de protoplasto y la transformación de los protoplastos seguida de la regeneración de la pared celular en cierto modo conocido per se. El uso de *Aspergillus* como un microorganismo huésped es descrito en la EP 238 023 (Novo Nordisk A/S).

Producción de enzima lipolítica por cultivo de transformante

[0056] Se describe un método para producir una enzima lipolítica usada en la invención, este método comprende el cultivo de una célula huésped bajo condiciones propicias para la producción de la enzima lipolítica y recuperación de la enzima lipolítica de las células y/o medio de cultivo.

5 [0057] El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de la célula huésped en cuestión y la obtención de expresión de la enzima lipolítica usada en la invención. Los medios adecuados están disponibles gracias a proveedores comerciales o se pueden preparar según recetas publicadas (p. ej. como se describe en catálogos de la American Type Culture Collection).

10 [0058] La enzima lipolítica segregada de las células huéspedes puede convenientemente ser recuperada del medio de cultivo por procedimientos bien conocidos, incluyendo la separación de las células del medio por centrifugado o filtración, y la precipitación de componentes proteínicos del medio mediante una sal tal como sulfato de amonio, seguido por el uso de procedimientos cromatográficos tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, o similares.

MATERIALES Y MÉTODOS15 **Actividad lipásica en la tributirina (LU)**

[0059] Un sustrato para enzimas lipolíticas se prepara emulsionando tributirina (glicerina tributirato) usando goma arábica como emulsionante. La hidrólisis de tributirina a 30°C con pH 7 se sigue en un experimento de titulación del pH-stat. Una unidad de actividad lipásica (1 LU) iguala la cantidad de enzima capaz de liberar 1 µmol de ácido butírico/min en las condiciones estándares.

20 **Preparación de éster alquílico de ácido graso**

[0060] 8.00 gramos de sustrato se mezclan con metanol (0.500 ml => 0.395 gramos). Los siguientes tipos de sustratos fueron usados:

Ejemplo 1) 100% aceite para ensaladas (aceite de soja refinado, decolorado y desodorizado, RBD SBO);

Ejemplo 2) 100% ácido oleico;

25 Ejemplo 3) Mezcla de 20% p/p de ácido oleico en RBD SBO

[0061] La mezcla de metanol como sustrato se calienta a 50 °C en un baño de agua con agitación recíproca (200 rpm). Se añade agua desmineralizada (el volumen depende del volumen de enzima adicionada; cantidad total de agua: 4.00 ml incluyendo agua de adición enzimática), correspondiente a 32 % p/p de la mezcla total. La mezcla se calienta a 50°C. Luego se añade la enzima a la mezcla y es enérgicamente mezclada durante 10 seg. y dejada en baño de agua con agitación recíproca a 50°C y 200 rpm. Las fases de la mezcla reactiva pueden mezclarse por el uso de mezcladores de alta cizalla, tales como los de Silverson Ltd. UK o IKA Kunkel.

[0062] Las muestras se retiran de la mezcla reactiva después de 3 horas de tiempo de reacción y son centrifugadas durante 14 minutos a 14000 rpm. La capa superior consiste en material graso no soluble en fase acuosa y se analiza por ¹H RMN (usando CDCl₃ como solvente) espectrómetro Varian 400 MHz (Varian Inc. CA, USA). La conversión de los residuos de ácidos grasos en éster metílico de ácido graso se determina por la proporción de las señales de metilo de los ésteres metílicos de ácidos grasos, -COOCH₃ (3.70 ppm) y CH₃ CH₂- (1.0 - 0.9 ppm) de los residuos de ácidos grasos.

[0063] La dosis enzimática se basa en un total 0.4 mg de proteína / 8.00 gramos de sustrato. Para examinar un efecto sinérgico de dos enzimas combinadas; 0.2 mg de cada enzima fueron adicionadas a 8 gramos de sustrato y comparadas con cada una de las enzimas a una dosis de 0.4 mg / 8 gramos de sustrato. Para relacionar la cantidad de proteína con una actividad enzimática, un ensayo de actividad enzimática estándar se puede aplicar, en este caso el ensayo LU como se ha descrito anteriormente (actividad lipásica en tributirina). Las siguientes preparaciones enzimáticas fueron evaluadas:

1. lipasa de *T. lanuginosus* (TLL, actividad específica 7000 LU/mg proteína)

45 2. lipasa B de *C. antarctica* (LBCA, actividad específica 500 LU/mg proteína)

3. cutinasa de *H. insolens* (cutinasa, actividad específica 1800 LU/mg proteína)

[0064] Dosis enzimática y volúmenes de agua adicionales para experimentos con enzimas únicas:

1. TLL: 0.700 ml de 4000 LU/ml de solución enzimática + 3.30 ml agua

2. LBCA: 1.680 ml de 119 LU/m de solución enzimática + 2.32 ml agua

50 3. Cutinasa: 0.450 ml de 1600 LU/ml de solución enzimática + 3.55 ml agua

[0065] Dosis enzimática y volúmenes de agua adicionales para experimentos con combinación de enzimas:

1. TLL + LBCA: (0.350 ml de 4000 LU/ml de solución de TLL + 0.840 ml de un 119 LU/ml de solución de CALB

+ 2.810 ml agua)

2. Cutinasa + CALB: (0.225 ml de 1600 LU/ml de solución de cutinasa + 0.840 ml de 119 LU/ml de solución de CALB + 2.935 ml agua).

EJEMPLOS

5 Ejemplo 1, preparación de ésteres alquílicos de ácido graso a partir de triglicéridos

[0066] Aceite de soja refinado, decolorado y desodorizado (RBD SBO, aceite para ensaladas) fue usado como sustrato según el método general anteriormente descrito.

Las conversiones (%) de residuos de ácido graso en FAME después de 3 horas de tiempo de reacción usando diferentes enzimas lipolíticas se muestran en la Tabla 1, mientras que la conversión (%) conseguida con una combinación de CALB y TLL se muestra en la Tabla 2. Se determinó que el Coeficiente de Variación en % (CV%) de cuatro experimentos idénticos era 2.2%.

10

Tabla 1. Enzimas únicas % conversión de residuos de ácido graso en FAME

CALB	0.55
Cutinasa	12.13
TLL	13.22

Tabla 2. Combinación de enzimas, % conversión de residuos de ácido graso en FAME.

CALB + TLL	16, 21
------------	--------

15 Ejemplo 2, preparación de ésteres alquílicos de ácidos grasos a partir de ácido oleico

[0067] El ácido oleico fue usado como sustrato según el método general anteriormente descrito. Las conversiones (%) de residuos de ácidos grasos en FAME después de 3 horas tiempo de reacción usando diferentes enzimas lipolíticas se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Encimas únicas, % conversión de residuos de ácido graso en FAME.

CALB	26.41
Cutinasa	10
TLL	16.25

20

Ejemplo 3. Preparación de ésteres alquílicos de ácido graso a partir de triglicéridos que contienen ácidos grasos libres

[0068] Una mezcla de un 20% p/p de ácido oleico en RBD SBO fue usada como sustrato según el método general anteriormente descrito. Las conversiones (%) de residuos de ácidos grasos en FAME después de 3 horas tiempo de reacción usando enzimas lipolíticas y combinaciones de dichas enzimas diferentes se muestran en la tabla 4 y 5.

25

Tabla 4. Encimas únicas, % conversión de residuos de ácidos grasos en FAME.

CALB	16.58
Cutinasa	11.22
TLL	14.09

Tabla 5. Combinación de enzimas, % conversión de residuos de ácidos grasos en FAME.

CALB + cutinasa	18.82
CALB + TLL	20

REIVINDICACIONES

1. Método para producir ésteres alquílicos de ácidos grasos, donde se hace una mezcla reactiva contactando una solución que comprende (a) un sustrato, este sustrato comprende triglicéridos y ácidos grasos libres, preferiblemente en el intervalo de 0.01-95% por peso de ácidos grasos libres y (b) un alcohol, este alcohol es un alcohol inferior que contiene de 1 a 5 átomos de carbono (C1-C5), con una primera enzima lipolítica con una proporción de actividad en triglicérido a actividad en FFA por debajo de 0.2 y una segunda enzima lipolítica con una proporción de actividad en triglicérido a actividad en FFA por encima de 0.5.
2. Método según la reivindicación 1, donde el triglicérido se deriva de una o más materias primas de aceite vegetal, aceite de semilla de colza, aceite de soja, aceite de mostaza, aceite de girasol, aceite de canola, aceite de coco, aceite de cáñamo, aceite de palma, aceite de resina, grasas animales incluyendo aceite de sebo, de manteca de cerdo, de ave y de pescado.
3. Método según las reivindicaciones 1 a 2, donde la proporción molar entre el alcohol y los residuos de ácidos grasos es mínimo de 0.1 y máximo de 10, preferiblemente en el intervalo de 0.3-5, más preferiblemente de 0.4-2.
4. Método según las reivindicaciones 1 a 3, donde el alcohol es metanol o etanol.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la mezcla reactiva además comprende agua, preferiblemente hasta un 50% (p/p).
6. Método según todas las reivindicaciones precedentes, donde la primera enzima lipolítica tiene una proporción de actividad en triglicérido a actividad en FFA en el intervalo de 0.01-0.2 y la segunda enzima lipolítica tiene una proporción de actividad en triglicérido a actividad en FFA en el intervalo de 0.5-20.
7. Método según todas las reivindicaciones precedentes, donde la primera enzima lipolítica es en un 60% idéntica a una enzima lipolítica seleccionada del grupo que consiste en lipasa B de *Candida antarctica*, lipasa de *Hyphozyma* sp. y lipasa de *Candida parapsilosis*.
8. Método según la reivindicación 7, donde la primera enzima lipolítica es lipasa B de *Candida antarctica*, lipasa de *Hyphozyma* sp. o lipasa de *Candida parapsilosis*.
9. Método según todas las reivindicaciones precedentes, donde la segunda enzima lipolítica es en un 60% idéntica a una enzima lipolítica seleccionada del grupo que consiste en lipasa de *T. lanuginosus*, cutinasa de *H. insolens*, lipasa A de *C. antarctica*, lipasas de *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Geotrichum candidum*, *Rhizomucor miehei*, *Cryptococcus* spp.S-2, y *Candida parapsilosis*.
10. Método según la reivindicación 9, donde la segunda enzima lipolítica es una de lipasa de *T. lanuginosus*, cutinasa de *H. insolens*, lipasa A de *C. antarctica*, lipasas de *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Geotrichum candidum*, *Rhizomucor miehei*, *Cryptococcus* spp. S-2, y *Candida parapsilosis*.
11. Método según todas las reivindicaciones precedentes, donde el proceso procede en un modo por lotes.
12. Método según todas las reivindicaciones precedentes, donde el proceso procede en un modo continuo.
13. Método según todas las reivindicaciones precedentes, donde las fases de solución en la mezcla reactiva son mezcladas usando un mezclador de alta cizalla.
14. Método según todas las reivindicaciones precedentes, donde el proceso se conduce a modo de contracorriente.