

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 171**

51 Int. Cl.:
C12N 11/00 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)
C12N 9/96 (2006.01)
C10L 1/08 (2006.01)
C12N 9/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07849656 .9**
96 Fecha de presentación: **31.12.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2118277**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.11.2009**

54 Título: **ENZIMAS INTERFACIALES INMOVILIZADAS DE ACTIVIDAD MEJORADA Y ESTABILIZADA.**

30 Prioridad:
08.01.2007 IL 18059807

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2012

73 Titular/es:
**TRANSBIODIESEL LTD.
REGIONAL R&D CENTER
20200 SHFARAM, IL**

72 Inventor/es:
BASHEER, Sobhi

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 373 171 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

Enzimas interfaciales inmovilizadas de actividad mejorada y estabilizada

Campo de la Invención

5 La invención se refiere a enzimas interfaciales inmovilizadas, particularmente lipasas y fosfolipasas, así como a otras hidrolasas, que tienen actividad y estabilidad mejoradas. La invención también se refiere a procedimientos para la preparación de tales enzimas y a sus diversos usos industriales y de investigación.

Antecedentes de la Invención

10 Las enzimas interfaciales son una clase de enzimas que comprenden dos dominios en su estructura proteica; el primero es el dominio hidrófilo mientras que el segundo es el dominio hidrófobo. Esta característica única hace que esta clase de enzimas prefiera el área interfacial una vez presente en un sistema de dos fases. En estas condiciones, se forma la conformación activa cuando el dominio hidrófilo de las moléculas de enzima se enfrenta a la capa acuosa mientras que el dominio hidrófobo se enfrenta a la capa hidrófoba.

15 Las lipasas y fosfolipasas son las enzimas interfaciales más conocidas que expresan su actividad catalítica una vez que están presentes en un sistema interfacial. Las lipasas (triacilglicerol hidrolasa E.C. 3.1.1.3) se definen como enzimas hidrolíticas que actúan sobre el enlace éster del triacilglicerol en sistemas acuosos para producir ácidos grasos libres, glicéridos parciales y glicerol. Las fosfolipasas también pertenecen a la clase de enzimas hidrolíticas, sin embargo, escinden preferente y específicamente el enlace éster de fosfolípidos presentes en sistemas acuosos, para producir ácidos grasos libres, lisofosfolípidos, glicerofosfolípidos, ácido fosfatídico y alcohol libre, dependiendo del tipo de fosfolipasa.

20 Las lipasas y fosfolipasas están ampliamente distribuidas entre los animales, plantas y microorganismos. El interés en la aplicación industrial de las lipasas y las fosfolipasas ha crecido rápidamente durante las últimas dos décadas. Se ha descubierto que en condiciones de actividad con bajo contenido de agua esta clase de enzimas cataliza su reacción de hidrólisis inversa. La actividad catalítica inversa de las lipasas y fosfolipasas se ha explotado ampliamente para las síntesis de compuestos valiosos que contienen enlaces éster y amida u otras sustancias químicas relacionadas que contienen grupos funcionales tales grupos hidroxilo, carboxílicos y amino. En particular, las lipasas y fosfolipasas se han utilizado para la reformación de grasas, aceites, ceras, fosfolípidos y esfingolípidos para obtener nuevas propiedades funcionales deseadas, y para separar compuestos ópticamente activos de sus mezclas racémicas. De interés particular, en la presente memoria se desvelará el uso de enzimas interfaciales para la síntesis de ésteres cerosos únicos y ésteres alquílicos de cadena corta (biodiesel).

30 Actualmente, hay más de 40 lipasas y fosfolipasas diferentes comercialmente disponibles, sin embargo, solamente algunas de ellas se preparan en cantidades comerciales. Algunas de las enzimas interfaciales más prometedoras industrialmente proceden de *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus niveus*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium camembertii*, *Alcaligenes sp.*, *Burkholderia sp.*, *Thermomyces lanuginosa*, *Chromobacterium viscosum*, semillas de papaya y pancreatina.

35 La inmovilización de enzimas se ha descrito por un amplio número de técnicas que se dirigen básicamente a reducir la contribución de coste de las enzimas en el proceso global, facilitar la recuperación de enzimas a partir de los productos y permitir la operación continua del proceso. Las técnicas de inmovilización, en general, se dividen de acuerdo con lo siguiente:

- 40 1. Adsorción física de enzimas en soportes sólidos, tales como sílice y polímeros insolubles.
2. Adsorción sobre resinas de intercambio iónico.
3. Enlace covalente de enzimas en un material de soporte sólido, tal como soportes inorgánicos epoxidados o poliméricos.
4. Atrapamiento de enzimas en un polímero en crecimiento.
5. Confinamiento de enzimas en un reactor de membrana o en geles semipermeables.
- 45 6. Cristales de enzimas reticulados (CLECS) o agregados de enzimas reticulados (CLEAS).

Todos los procedimientos de inmovilización de enzimas mencionados anteriormente comprenden las siguientes etapas:

1. Disolver la enzima en un sistema tampón apropiado con respecto al pH, temperatura, tipo de sales tampón e intensidad iónica.
- 50 2. Añadir el soporte sólido a la solución de enzima y mezclar durante algún tiempo hasta que las moléculas de enzima se inmovilicen sobre el soporte sólido.
3. Separar por filtración el soporte sólido que contiene la enzima inmovilizada.

4. Lavar el soporte con un tampón apropiado para retirar las moléculas de enzima unidas sueltamente y luego secar el soporte sólido.

Se han inmovilizado enzimas interfaciales, principalmente lipasas, siguiendo las técnicas mencionadas anteriormente. Estas preparaciones de enzima inmovilizadas ofrecidas poseen baja actividad sintética y/o un tiempo de semivida operativa corto. En un intento de incrementar la actividad sintética de las lipasas inmovilizadas y otras enzimas interfaciales diferentes, se han aplicado procedimientos de activación. Estos procedimientos incluyen:

1. Unión de los grupos funcionales de superficie de las enzimas con restos hidrófobos tales como ácidos grasos o polietilenglicol.

2. Recubrimiento de la superficie de las enzimas con tensioactivos, tales como ésteres de ácidos grasos de polioli.

10 3. Contacto de las enzimas con soportes hidrófobos, típicamente polipropileno, que se han pretratado con disolventes hidrófilos, tales como etanol o isopropanol.

4. Adición de activadores de enzimas, tales como una solución de sal, glicerol, etc., a baja concentración, típicamente por debajo del 1%, en el sistema de reacción.

15 El documento WO 97/01632 desvela un procedimiento para la inmovilización de una enzima mediante la selección de una enzima anfífila para la inmovilización, la preparación de una emulsión que comprende una fase hidrófoba continua y una fase acuosa dispersa en la que se disuelven la enzima y un material adecuado para actuar como vehículo para la enzima cuando se realice la siguiente etapa, y la retirada del agua de la fase acuosa hasta que esta fase se convierta en partículas sólidas recubiertas de enzima. Una fase acuosa preferida se prepara con un líquido de fermentación de lipasa bruto del cual se ha eliminado la biomasa y que aún contiene residuos de fermentación
20 adecuados para actuar como vehículo.

El documento WO 94/28118 desvela un procedimiento para la inmovilización de enzimas tales como lipasas en un material de soporte hidrófobo. En este procedimiento se aplica un tensioactivo no iónico. El procedimiento da como resultado nuevas lipasas inmovilizadas en un soporte hidrófobo.

25 Nouredini y col. (Bioresource Technology, Elsevier, 96, 7, 2005, 769-777) desvela una transesterificación enzimática de aceite de soja con metanol y etanol. Como enzima lipasa se usó lipasa de *Pseudomonas cepacia*, que se investigó adicionalmente en forma inmovilizada dentro de un soporte sol-gel hidrófobo químicamente inerte.

30 Talukder y col. (Biochemical Engineering Journal, 33, 1, 2007, 60) desvela una preparación sencilla y eficaz de lipasas para uso en disolventes orgánicos. Se tratan lipasas en solución acuosa con isopropanol, seguido inmediatamente de inmovilización en una resina macroporosa disponible en el mercado. La modificación dual de las lipasas por tratamiento con isopropanol e inmovilización mejora la actividad y estabilidad de las lipasas más significativamente que cualquiera de los dos tratamientos por separado.

35 El documento US 6.528.293 desvela un procedimiento para activar una lipasa mediante la adición de una solución de lipasa en un tampón acuoso a un pH próximo a la neutralidad a una fase orgánica, por ejemplo, tetradecano. En estas condiciones, la lipasa se activa como una función de la superficie límite agua-orgánica entre las fases orgánica y acuosa.

El documento D6 (WO 00/56869) desvela una preparación de lipasa que comprende una matriz insoluble y un complejo de lipasa recubierto con tensioactivo inmovilizado en dicha matriz insoluble. Se describe el uso del complejo de lipasa inmovilizado como un biocatalizador para catalizar la inter- y/o transesterificación de aceites y grasas en medios orgánicos hidrófobos.

40 Mateo y col. (Enzyme and Microbial Technology, 40, 6, 2007, 1451) es una revisión de estrategias para mejorar las propiedades de las enzimas durante la realización de protocolos de inmovilización de enzimas adaptados.

45 Ninguno de los procedimientos mencionados anteriormente produjo resultados satisfactorios con respecto a la activación, estabilización y eficacia en coste de las enzimas interfaciales inmovilizadas para llevar a cabo las conversiones inversas enzimáticas en cantidades industriales. Además, se ha notificado que la mayoría de las enzimas, cuando se inmovilizan de acuerdo con el procedimiento mencionado anteriormente, pierden una parte significativa de su actividad sintética o no presentan su actividad completa debido a ciertas restricciones impuestas por el procedimiento de inmovilización. Por ejemplo, el recubrimiento de lipasas y fosfolipasas con ésteres de ácidos grasos de polioli se enfrentó a un serio desafío cuando las moléculas de lipasa no se recubrían completamente con el activador; por lo tanto esas moléculas de enzima que no estaban en contacto con el activador, permanecieron
50 inactivas.

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar un nuevo procedimiento para obtener enzimas interfaciales inmovilizadas altamente activas y estables, en particular lipasas y fosfolipasas para aplicaciones sintéticas. De interés particular, estas enzimas se pueden utilizar para la síntesis de ésteres cerosos y biodiesel.

Es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar enzimas interfaciales inmovilizadas altamente activas,

estables, para su uso en varios procedimientos industriales así como procedimientos de investigación.

Estos y otros objetivos de la invención llegarán a ser evidentes según avance la descripción.

Sumario de la Invención

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de una enzima interfacial inmovilizada sobre un soporte insoluble, que comprende las etapas de:
- (a) proporcionar un sistema bi-fásico que comprenda una solución tampón acuosa y por lo menos un primer disolvente orgánico;
 - (b) mezclar dicha enzima interfacial con el sistema bi-fásico proporcionado en la etapa (a);
 - (c) añadir dicho soporte a la mezcla de la etapa (b) y mezclar; y
 - 10 (d) aislar de la mezcla obtenida en la etapa (c) la enzima interfacial inmovilizada sobre dicho soporte,
- en el que antes de añadir dicho soporte a la solución bifásica de enzima obtenida en la etapa (b), dicho soporte se trata con un tensioactivo disuelto en un segundo disolvente orgánico, obteniéndose de esta manera un soporte cubierto homogéneamente con un tensioactivo.
- 15 Antes de la mezcla con la solución bifásica de enzima, dicho soporte se lava opcionalmente para retirar las sales y materiales orgánicos, y luego se trata con un tensioactivo disuelto en un segundo disolvente orgánico.
- El soporte insoluble es capaz de unirse a la enzima interfacial mediante adsorción o mediante unión covalente a grupos funcionales. El soporte es de preferencia un soporte poroso que puede ser orgánico o inorgánico, de preferencia seleccionado del grupo que consiste en un soporte inorgánico poroso tal como soportes basados en sílice o en alúmina, soportes orgánicos tales como un soporte basado en polímero, pudiendo dicho soporte contener
- 20 opcionalmente grupos funcionales activos tales como grupos epoxi o aldehído, o grupos iónicos.
- En el procedimiento de la invención, dicho primer disolvente orgánico se selecciona de alcanos (tales como octano), alcoholes (tales como n-octanol), aldehídos (tales como decanaldehído) y cetonas (tales como 2-octanona) y cualquier mezcla de los mismos.
- 25 El tensioactivo es de preferencia, pero no limitado, un éster de ácido graso de azúcar, un éster o éter de ácido graso de azúcar de polioxietileno, alquil glucósido de cadena media y larga, fosfolípido, derivado de polietilenglicol o sal de amonio cuaternaria.
- Dicho segundo disolvente orgánico puede ser un alcano, de preferencia n-alcano, un éter, de preferencia éter dietílico, una cetona, de preferencia acetona y un alcohol, de preferencia iso-propanol y cualquier mezcla de los mismos.
- 30 La enzima interfacial a preparar por el procedimiento de la invención es de preferencia una lipasa o una fosfolipasa. Son ejemplos no limitantes específicos enzimas derivadas de *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus niveus*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium camembertii*, *Alcaligenes sp.*, *Burkholderia sp.*, *Thermomyces lanuginosa*, *Chromobacterium viscosum*, semillas de papaya y pancreatina.
- 35 En otro aspecto, la invención se refiere a una enzima interfacial inmovilizada sobre un soporte poroso sólido, bloqueada en su conformación activa.
- De acuerdo con la invención, el soporte se cubre homogéneamente con un tensioactivo, o con una monocapa de dicho tensioactivo. El soporte es capaz de unirse a dicha enzima mediante adsorción o mediante unión covalente a grupos funcionales, y puede ser un soporte orgánico o inorgánico, de preferencia seleccionado de soportes
- 40 inorgánicos tales como soportes basados en sílice y alúmina, o soportes orgánicos tales como un soporte basado en polímero, y el soporte puede contener grupos funcionales activos tales como grupos epoxi o aldehído y grupos iónicos, o dicho soporte puede ser una resina de intercambio iónico.
- En la preparación de enzima de la invención, el tensioactivo es de preferencia, pero no se limita a, un éster de ácidos grasos de azúcar, un éster o éter de ácidos grasos de azúcar de polioxietileno, alquil glucósido de cadena media y larga, fosfolípido, derivado de polietilenglicol o sal de amonio cuaternaria.
- 45 La enzima interfacial inmovilizada de la invención es de preferencia una lipasa o una fosfolipasa. Son ejemplos específicos enzimas derivadas de *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus niveus*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium camembertii*, *Alcaligenes sp.*, *Burkholderia sp.*, *Thermomyces lanuginosa*, *Chromobacterium viscosum*, semillas de papaya y pancreatina.
- 50 En una realización adicional, la invención se refiere a un procedimiento enzimático para la preparación de ésteres cerosos estructurados que contienen un componente superficialmente activo inherente al material de partida, que

comprende la etapa de hacer reaccionar una fuente de cera de partida con un alcohol en presencia de una lipasa inmovilizada de la invención o preparada por el procedimiento de la invención. En este procedimiento, los ésteres cerosos estructurados resultantes contienen un componente superficialmente activo inherente al material de partida, por lo que poseen una mejor dispersabilidad en agua.

- 5 En una realización específica, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de ésteres alquílicos de cadena corta de ácidos grasos, de preferencia ésteres metílicos de ácidos grasos (biodiesel), que comprende añadir gradualmente metanol a un aceite vegetal, animal, de alga o de pescado, o una mezcla de por lo menos dos de estos aceites que contienen una lipasa de acuerdo con la invención o preparada por el procedimiento de la invención, y permitir que proceda la reacción en condiciones adecuadas, hasta que dichos triglicéridos de aceite se conviertan en ésteres metílicos de ácidos grasos.

En este procedimiento, el aceite vegetal puede ser, pero no está limitado a aceite de soja, canola, colza, oliva, aceite de palma, aceite de girasol, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite residual de cocina o cualquier triglicérido de aceite derivado de fuentes vegetales no comestibles.

Breve Descripción de las Figuras

- 15 **Figura 1:** Una ilustración esquemática del procedimiento para la activación de la enzima en el área interfacial, seguido por la inmovilización de la enzima sobre un soporte.
- Figura 2:** Una enzima interfacial “bloqueada” en su conformación activa inmovilizada sobre un soporte poroso cubierto de tensioactivo de monocapa.

Descripción Detallada de la Invención

- 20 En la búsqueda de un nuevo procedimiento para la preparación de enzimas interfaciales inmovilizadas altamente activas y estables, el presente inventor desarrolló una técnica de dos etapas, sustancialmente como sigue:

Etapa 1: Hacer que todas las moléculas de enzima interfacial adopten su conformación activa mezclándolas en un sistema bi-fásico que comprende fase acuosa y fase orgánica hidrófoba (véase la Fig. 1(A y B)).

Etapa 2: Añadir un soporte adecuado al sistema bifásico que ya contiene la enzima (véase la Fig. 1(B y C)).

- 25 La característica principal del soporte es su capacidad para situarse en la interfase del sistema bi-fásico.

En estas condiciones, las moléculas de enzima activa que se sitúan en la interfase bi-fásica pueden inmovilizarse fácilmente sobre el soporte mediante adsorción simple, unión covalente con resinas activadas que contienen grupos funcionales tales como grupos epoxi o aldehído, o mediante adsorción sobre resinas de intercambio iónico.

- 30 Esta técnica de dos etapas se emplea en la preparación de la enzima interfacial inmovilizada activa de acuerdo con la invención.

- De esta manera, en una primera realización, la invención se refiere a un procedimiento para preparar enzimas interfaciales inmovilizadas estables, altamente activas, particularmente lipasas y fosfolipasas, en el que se proporciona un sistema bi-fásico que comprende una solución tampón acuosa y por lo menos un primer disolvente orgánico; la enzima interfacial se mezcla con el sistema bi-fásico; se añade un soporte sólido a la mezcla; y se aísla la enzima interfacial inmovilizada sobre el soporte, en el que antes de añadir dicho soporte a la solución bifásica de enzima, dicho soporte se trata con un tensioactivo disuelto en un segundo disolvente orgánico, obteniéndose de esta manera un soporte cubierto homogéneamente con un tensioactivo o con una monocapa de un tensioactivo.

- 40 Utilizando soportes específicos que se caracterizan con preferencia en el área interfacial del sistema bifásico, éstos soportes “fijan” las moléculas de enzima presentes en la interfase, estando bloqueadas de esta manera las enzimas en su conformación activa. La afinidad del soporte dependerá de su porosidad, de las propiedades de hinchamiento así como de la dispersabilidad, que depende de su polaridad y de la polaridad del solvente. En un sistema bi-fásico, los soportes hidrófilos prefieren el agua mientras que los soportes hidrófobos prefieren los disolventes orgánicos polares.

- 45 El presente inventor descubrió que para mejorar la afinidad del soporte en área interfacial, el área de superficie del soporte, que puede ser hidrófila o hidrófoba, se cubre con una mono-capa de un tensioactivo. Esto hace que el soporte prefiera el área interfacial cuando está presente en un sistema bi-fásico. De esta manera, esta característica mejora la capacidad del soporte para capturar enzimas interfaciales “bloqueadas” en su conformación activa. Así, en lugar de que la enzima se difunda en el soporte, como es conocido en la técnica, la presente invención proporciona una herramienta eficaz para fijar la enzima y estabilizarla en su conformación activa.

- 50 De esta manera, con el fin de mejorar el posicionamiento de la matriz sólida en la interfase bi-fásica, la matriz sólida, de preferencia una matriz porosa (también se pueden usar matrices no porosas) se modifica, como se detalla más adelante, de modo que se cubre homogéneamente con un tensioactivo. La característica principal del soporte modificado es su tendencia a situarse en la interfase producida en los sistemas bi-fásicos hidrófobos-hidrófilos.

Por lo tanto, de acuerdo con la invención, el soporte sólido se pre-trata con un tensioactivo disuelto en un segundo disolvente orgánico, antes de mezclarse con la solución bifásica de enzima. Típicamente, el soporte que es de preferencia poroso, pero también puede ser no poroso, primero se limpia de cualquier sal adsorbida y residuo orgánico, luego se seca para retirar cualquier residuo de agua, y luego se mezcla con un disolvente orgánico de baja evaporación, por ejemplo, n-hexano, isopropanol, etanol, tolueno, acetonitrilo y disolventes similares, que contiene un agente superficialmente activo. Después se retira el disolvente orgánico, produciendo un soporte sólido poroso seco, cubierto homogéneamente con el agente superficialmente activo.

El agente superficialmente activo (tensioactivo) puede ser no iónico o iónico (aniónico o catiónico) por ejemplo, pero sin limitación, un éster de ácido graso de azúcar, un éster o éter de ácido graso de azúcar de polioxietileno, un alquil glucósido de cadena media o larga, un fosfolípido, un derivado de polietilenglicol o una sal de amonio cuaternaria. Los tensioactivos específicos se presentan en los ejemplos proporcionados más adelante.

El soporte sólido es de preferencia un soporte poroso que puede ser orgánico e inorgánico, particularmente seleccionado del grupo que consiste en soportes inorgánicos porosos tales como soportes basados en sílice o en alúmina, soportes orgánicos tales como un soporte basado en polímero, pudiendo contener dicho soporte opcionalmente grupos funcionales activos tales como epoxi o aldehído, o grupos iónicos. En los ejemplos proporcionados a continuación se proporcionan algunos soportes específicos, particularmente en la Tabla 1.

El sistema bi-fásico se prepara a partir de un tampón acuoso adecuado y un disolvente orgánico. Este disolvente orgánico puede ser, pero no está limitado a, un alcano (tal como octano), un alcohol (tal como n-octanol), un aldehído (tal como decanaldehído), una cetona (tal como 2-octanona) y cualquier mezcla de los mismos.

En una realización adicional, la invención se refiere a una enzima interfacial inmovilizada sobre un soporte sólido pretratado (modificado) que está cubierto homogéneamente con un tensioactivo, de preferencia con una monocapa de tal tensioactivo. Esta estructura única permite el uso eficaz de la enzima en reacciones que se realizan en disolventes orgánicos. La mono-capa de tensioactivo producida en el área de superficie del soporte tiene una estructura única, representada por grupos de cabeza, cabeza-cabeza, y grupos de cola, cola-cola. En la Fig. 2 se muestra una ilustración esquemática de esta estructura. Sin limitarse por la teoría, parece ser que esta estructura tiene una función importante relacionada con que la enzima inmovilizada adopte su conformación activa y favorable. Además, el agente superficialmente activo está unido a la matriz solamente, previniendo la desactivación de la enzima. La preparación de enzima puede contener una o más lipasas del grupo de las enzimas mencionadas en la presente memoria.

Las matrices, tensioactivos y enzimas a usar son como se han detallado anteriormente.

La enzima inmovilizada de la invención, o preparada por el procedimiento de la invención, es muy activa, y particularmente estable. Como se puede observar en la Tabla 2 presentada a continuación, se conserva una actividad de aproximadamente un 90% incluso después de 10 ciclos de reacción. Esta estabilidad es de una gran importancia económica.

En otra realización, la invención se refiere a un procedimiento para preparar ésteres cerosos estructurados, mediante la reacción de una fuente de cera con un alcohol en presencia de una lipasa inmovilizada de la invención o preparada por el procedimiento de la invención.

Los ésteres cerosos obtenidos por este procedimiento contienen ingrediente/componente superficialmente activo, que es inherente a los materiales de partida en bruto. Como se muestra en los ejemplos proporcionados a continuación, la relación molar entre los triglicéridos de aceite y el alcohol en el sistema de reacción es 1:2, respectivamente. Por lo tanto, la relación molar entre los productos de reacción, ésteres cerosos y monoglicéridos inherentes al aceite es 2:1, respectivamente. El alcohol puede ser cualquier alcohol C_{2-22} adecuado, de preferencia alcohol cetílico. Después de retirar por filtración la enzima inmovilizada, el producto restante contiene una mezcla de ésteres cerosos y monoglicéridos en una relación de 2:1, respectivamente. Debido a las propiedades emulsionantes de los monoglicéridos, la mezcla se puede utilizar para la preparación de ceras dispersables en agua para usarse como cremas, particularmente cremas cosméticas y médicas, que tienen mejores efectos de penetración en la piel e hidratantes. La presencia de este agente superficialmente activo imparte a los ésteres cerosos una mejor dispersabilidad en agua. De esta manera, los ésteres cerosos producidos de acuerdo con la invención son particularmente adecuados para su uso como ingredientes de varios productos cosméticos y estéticos, tales como cremas y lociones, y se pueden utilizar como se obtienen, sin la necesidad de añadir emulsionantes o dispersantes. La mejor propiedad de emulsión de la mezcla formada se confiere por la presencia de monoglicéridos producidos en el procedimiento. Los monoglicéridos son bien conocidos como buenos emulsionantes debido a que la molécula tiene dominios tanto hidrófobos como hidrófilos, impartiendo dicha estructura a los monoglicéridos la capacidad de mejorar la dispersabilidad de los ésteres cerosos en agua. Los ésteres cerosos así producidos tienen mejor dispersabilidad en agua en comparación con los ésteres cerosos preparados sin utilizar monoglicéridos en el mismo sistema.

En una realización importante, la invención también se refiere a un procedimiento para la preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos (biodiesel). Generalmente, en este procedimiento, primero se añade gradualmente

metanol a un aceite vegetal, animal, de alga o de pescado o a un aceite derivado de hongos y contiene ácidos grasos n-3 o n-6, o una mezcla de por lo menos dos de tales aceites. A la mezcla de metanol/aceite se le añade una lipasa inmovilizada sobre un soporte sólido que está cubierto con un tensioactivo, de preferencia con una monocapa de tensioactivo, o una lipasa inmovilizada preparada por el procedimiento de la invención, y se deja que la reacción continúe hasta que los triglicéridos de aceite se conviertan en ésteres metílicos de ácidos grasos.

Debe tenerse en cuenta que, en la descripción de la presente memoria, los términos soporte y matriz se utilizan intercambiamente.

Se debe entender que esta invención divulgada y descrita no está limitada a los ejemplos particulares, etapas de procedimiento y materiales divulgados en la presente memoria, ya que tales etapas del procedimiento y materiales pueden variar en alguna medida. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente memoria se utiliza con el propósito de describir únicamente realizaciones particulares, y no deben considerarse limitantes puesto que el alcance de la presente invención estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de las mismas.

Se debe observar que, como se utiliza en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen referencias plurales a menos que el contenido dicte claramente otra cosa.

A lo largo de toda esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que la palabra "comprender" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas establecidos, pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

Los siguientes Ejemplos son representativos de técnicas empleadas por los inventores para llevar a cabo aspectos de la presente invención. Se debe apreciar que aunque estas técnicas son ejemplares de realizaciones preferidas para la práctica de la invención, los expertos en la materia, en vista de la presente divulgación, reconocerán que pueden realizarse numerosas modificaciones sin apartarse del alcance propuesto de la invención.

Ejemplos

25 Ejemplo 1- Preparación de lipasa inmovilizada (Lipozyme TL)

Primero se lava el soporte de enzima (1 g) con agua para retirar cualquier sal absorbida y residuo orgánico. El soporte se filtra y luego se seca al vacío para retirar los residuos de agua. El soporte seco (1 g) se mezcla con disolvente orgánico, tal como n-hexano o iso-propanol que contiene un tensioactivo no iónico, aniónico o catiónico (100 mg). El disolvente orgánico se evapora al vacío para producir un soporte seco cubierto homogéneamente con un tensioactivo (que puede ser, pero no está limitado a, fosfatidil colina, AOT (bis-(2-etilhexil)sulfosuccinato sódico), polietilenglicol, Tween 20, 40, 60, 65, 80 y 85, Span 20, 40, 60, 65, 80, y 85, y ésteres de ácidos grasos de azúcar, tales como mono-, di-, y tri-oleato de sorbitán u otros ésteres de ácidos grasos de sorbitán).

Se mezcla lipasa derivada de *Thermomyces lanuginosa* (1 ml de Lipozyme TL 100 L, Novozymes, Dinamarca) en un sistema bifásico que comprende 10 ml de tampón fosfato de 0,05 M y pH 6,5, y 10 ml de n-hexano. La mezcla se agita vigorosamente durante 10 min seguido por la adición de soporte poroso tratado con tensioactivo. La mezcla se agita durante 4 horas más. El soporte que contiene la enzima inmovilizada se separa por filtración y se seca en un secador durante una noche para producir la lipasa inmovilizada altamente activa. El procedimiento de inmovilización se puede llevar a cabo también utilizando soportes no modificados.

La Tabla 1 muestra la actividad de transesterificación relativa de Lipozyme TL 100 L inmovilizada sobre diferentes soportes. Las reacciones se llevaron a cabo añadiendo lipasa inmovilizada (0,5 g) a aceite de oliva (10 g) y alcohol cetílico (5,5 g) (La relación molar de triglicéridos de aceite: alcohol cetílico es 2:1). El sistema de reacción mezcla magnéticamente o mediante agitación a 60°C. La conversión de triglicéridos de aceite de oliva en ésteres cerosos se determinó después de tres horas de reacción calculando la relación de la suma de las áreas pico de los triglicéridos de aceite de oliva después de tres horas de reacción y la suma de las áreas pico de los triglicéridos de aceite de oliva a tiempo cero.

Tabla 1: La conversión (%) de triglicéridos de aceite de oliva en ésteres cerosos después de 3 horas de reacción. Condiciones de reacción: se mezclan aceite de oliva (10 g) y alcohol cetílico (5,5 g) con lipasa TL 100L inmovilizada sobre diferentes soportes (0,55 g) durante 3 horas. La mezcla de reacción se agita a 300 rpm y a 60°C.

Tipo de soporte	Conversión (%) (soporte no modificado)	Conversión (%) (soporte modificado)
Amberlite XAD 4 (Rohm&Haas, USA)	38	67
Amberlite XAD 16 (Rohm&Haas)	23	77
Amberlite XAD 7HP (Rohm&Haas)	24	66
Amberlite XAD 16HP (Rohm&Haas)	30	55
Duolite XAD 761 (Rohm&Haas)	41	55
Amberlite XAD 1180 (Rohm&Haas)	25	61

Amberlite XAD 1600 (Rohm&Haas)	23	66
Duolite A7 (Rohm&Haas)	19	52
Duolite A561 (Rohm&Haas)	18	58
Duolite A568 (Rohm&Haas)	22	51
Duolite C467 (Rohm&Haas)	12	22
Amberlyst A-21 (Rohm&Haas)	19	66
Dowex monosphere 77 (DOW, USA)	32	71
Dowex optipore L493 (DOW, USA)	21	51
Dow styrene DVB (DOW, USA)	14	8
MTO Dowex optipore SD-2 (DOW, USA)	13	18
Dowex MAC-3	13	20
Amberlite FPA53 (Rohm&Haas)	17	31
Amberlite FPC22H (Rohm&Haas)	11	22
Amberlite FPA4OCI (Rohm&Haas)	32	56
Amberlite IRC50 (Rohm&Haas)	10	44
Purolite A109 (Purolite, USA)	28	51

5 Cuando la reacción alcanza las condiciones de estado estacionario, la enzima inmovilizada se separa por filtración para obtener el producto deseado. El producto está compuesto de ésteres cerosos y monoglicéridos inherentes al aceite de oliva en una relación molar de 2:1, respectivamente. Esta relación única otorga al producto una mejor dispersabilidad en agua y, por lo tanto, se puede utilizar para la preparación de emulsiones de crema, particularmente cremas cosméticas o médicas, sin la necesidad del uso de emulsionantes externos.

Ejemplo 2 – Lipasas inmovilizadas para la preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos (biodiesel)

10 Se inmovilizan diferentes lipasas o mezclas de lipasas de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente utilizando varios soportes. Las lipasas principales que produjeron una alta actividad de trasesterificación de metanol y triglicéridos de aceite vegetal para formar ésteres metílicos de ácidos grasos incluyen la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB-L Novozymes, Dinamarca), Lipasa QLM (*Alcaligenes sp.* Meito Sangyo, Japón), *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme TL 100L, Novozymes, Dinamarca), *Pseudomonas sp.* (enzimas Lipase PS Amano, Japón).

15 Las condiciones de reacción son las siguientes: Aceite de soja (2.5 g) y metanol (0.3 ml añadidos gradualmente, 0.1 ml en cada etapa, dentro de un período de 6 horas de tiempo de reacción). La reacción se inicia añadiendo lipasa inmovilizada (100 mg) y agitando el medio de reacción a 35°C durante 6 horas. La Tabla 2 muestra la conversión de los triglicéridos de aceite de soja en ésteres metílicos de ácidos grasos después de un tiempo de reacción de 6 horas utilizando el mismo biocatalizador en 10 ciclos consecutivos.

Tabla 2: La conversión de triglicéridos de aceite de soja en ésteres metílicos de ácidos grasos después de un tiempo de reacción de 6 horas utilizando el mismo biocatalizador en 10 ciclos consecutivos.

Ciclo N°/ Conversión (%)	Lipasa TL inmovilizada sobre amberlite XAD 7 HP	Lipasa QLM inmovilizada sobre Amberlite XAD 7 HP	Lipasa PS inmovilizada Amberlite XAD 1600	CALB inmovilizada sobre Amberlite XAD 16 HP
1	90	92	95	60
2	92	94	96	65
3	90	92	95	62
4	92	90	93	67
5	90	87	92	70
6	88	90	91	65
7	87	85	87	66
8	88	82	90	66
9	90	82	92	70
10	89	82	90	67

20 Como se puede observar en la Tabla 2, se conserva la mayor parte de la actividad de la enzima incluso después de 10 ciclos de reacción.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de una enzima interfacial inmovilizada sobre un soporte insoluble, caracterizado porque comprende las etapas de:
- 5 (a) proporcionar un sistema bi-fásico que comprende una solución tampón acuosa y por lo menos un primer disolvente orgánico;
- (b) mezclar dicha enzima interfacial con el sistema bi-fásico proporcionado en la etapa (a);
- (c) añadir dicho soporte a la mezcla de la etapa (b) y mezclar; y
- (d) aislar de la mezcla obtenida en la etapa (c) la enzima interfacial inmovilizada sobre dicho soporte;
- 10 en el que, antes de añadir dicho soporte a la solución bifásica de enzima obtenida en la etapa (b), dicho soporte se trata con un tensioactivo disuelto en un segundo disolvente orgánico, obteniéndose de esta manera un soporte cubierto homogéneamente con un tensioactivo.
2. Un procedimiento para la preparación de una enzima interfacial inmovilizada sobre un soporte insoluble de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
- 15 (a) proporcionar un sistema bi-fásico que comprende una solución tampón acuosa y por lo menos un primer disolvente orgánico;
- (b) mezclar dicha enzima interfacial con el sistema bi-fásico proporcionado en la etapa (a);
- (c) añadir dicho soporte a la mezcla de la etapa (b) y mezclar; y
- (d) aislar de la mezcla obtenida de la etapa (c) la enzima interfacial inmovilizada sobre dicho soporte;
- 20 en el que, antes de añadir dicho soporte a la solución bifásica de enzima obtenida en la etapa (b), dicho soporte se trata con un tensioactivo disuelto en un segundo disolvente orgánico, obteniéndose de esta manera un soporte cubierto homogéneamente con un tensioactivo.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho soporte opcionalmente se lava para retirar sales y materiales orgánicos, y después se trata con dicho tensioactivo.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho soporte insoluble es capaz de unirse a dicha enzima mediante adsorción o mediante unión covalente a grupos funcionales.
- 25 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho soporte es un soporte poroso que puede ser orgánico o inorgánico, de preferencia seleccionado del grupo que consiste en soportes inorgánicos porosos tales como soportes basados en sílice o alúmina, soportes orgánicos tales como un soporte basado en polímero, pudiendo contener dicho soporte opcionalmente grupos funcionales activos tales como grupos
- 30 epoxi o aldehído, o grupos iónicos.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho primer disolvente orgánico se selecciona de alcanos (tales como octano), alcoholes (tales como n-octanol), aldehídos (tales como decanaldehído) y cetonas (tales como 2-octanona) y cualquier mezcla de los mismos.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho tensioactivo se selecciona de ésteres de ácidos grasos de azúcar, ésteres o éteres de ácidos grasos de azúcar de polioxietileno, alquilglucósidos de cadena media y larga, fosfolípidos, derivados de polietilenglicol y sales de amonio cuaternarias.
- 35 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho segundo disolvente orgánico se selecciona de alcanos, de preferencia n-hexano, éteres, de preferencia tales como éter dietílico, cetonas, de preferencia acetona, y alcoholes, de preferencia iso-propanol, y cualquier mezcla de los mismos.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha enzima es una lipasa o una fosfolipasa.
- 40 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicha enzima se selecciona del grupo que consiste en *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus niupsiloneus*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium camembertii*, *Alcaligenes sp.*, *Burkholderia sp.*, *Thermomyces lanuginosa*, *Chromobacterium upsiloniscosum*, semillas de papaya y pancreatina.
- 45 11. Una enzima interfacial inmovilizada sobre un soporte sólido que puede obtenerse por el procedimiento de las reivindicaciones 2 a 10, en el que dicho soporte está cubierto homogéneamente por una monocapa de un tensioactivo, y en el que dicha enzima está bloqueada en su conformación catalíticamente activa.
12. La enzima de la reivindicación 11, en la que dicho soporte es capaz de unirse a dicha enzima por adsorción o

por unión covalente a grupos funcionales.

- 5 13. La enzima de una cualquiera de las reivindicaciones 11 y 12, en la que dicho soporte es orgánico o inorgánico, de preferencia seleccionado del grupo que consiste en soportes inorgánicos tales como soportes basados en sílice y en alúmina, soportes orgánicos tales como un soporte basado en polímero, pudiendo contener dicho soporte grupos funcionales activos tales como grupos epoxi o aldehído y grupos iónicos o siendo dicho soporte una resina de intercambio iónico.
14. La enzima de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en la que dicho tensioactivo se selecciona de ésteres de ácidos grasos de azúcar, ésteres o éteres de ácidos grasos de azúcar de polioxietileno, alquil glucósidos de cadena media y larga, fosfolípidos, derivados de polietilenglicol y sales de amonio cuaternarias.
- 10 15. La enzima de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, que es una lipasa o una fosfolipasa.
16. La enzima de la reivindicación 15, en la que dicha enzima se selecciona del grupo que consiste en *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus niupsiloneus*, *Mucor jaupsilonanicus*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium*, *Alcaligenes sp.*, *Burkholderia sp.*, *Thermomyces lanuginosa*, *Chromobacterium viscosum*, semillas de papaya y pancreatina.
- 15 17. Un procedimiento enzimático para la preparación de ésteres cerosos estructurados, que comprende la etapa de hacer reaccionar una fuente de triglicéridos con un alcohol en presencia de una lipasa inmovilizada como se define en la reivindicación 15 o 16, o preparada por el procedimiento de la reivindicación 10, en el que dichos ésteres cerosos contienen un componente superficialmente activo inherente al material de partida en bruto, por lo que dichos ésteres cerosos poseen mejor dispersabilidad en agua.
- 20 18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que dicho alcohol es un alcohol C₂₋₂₂, de preferencia alcohol cetílico.
- 25 19. Un procedimiento para la preparación de ésteres alquílicos de cadena corta de ácidos grasos, de preferencia ésteres metílicos de ácidos grasos (biodiesel), que comprende la etapa de: añadir gradualmente metanol a un aceite vegetal, animal, de alga o de pescado, o una mezcla de por lo menos dos de estos aceites que contenga una lipasa como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16 o preparada por el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y dejar que proceda la reacción en condiciones adecuadas hasta que dichos triglicéridos de aceite se conviertan en ésteres metílicos de ácidos grasos.
- 30 20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que dicho aceite vegetal es aceite de soja, canola, colza, oliva, aceite de palma, aceite de girasol, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite residual de cocina o cualquier triglicérido de aceite derivado de fuentes vegetales no comestibles.

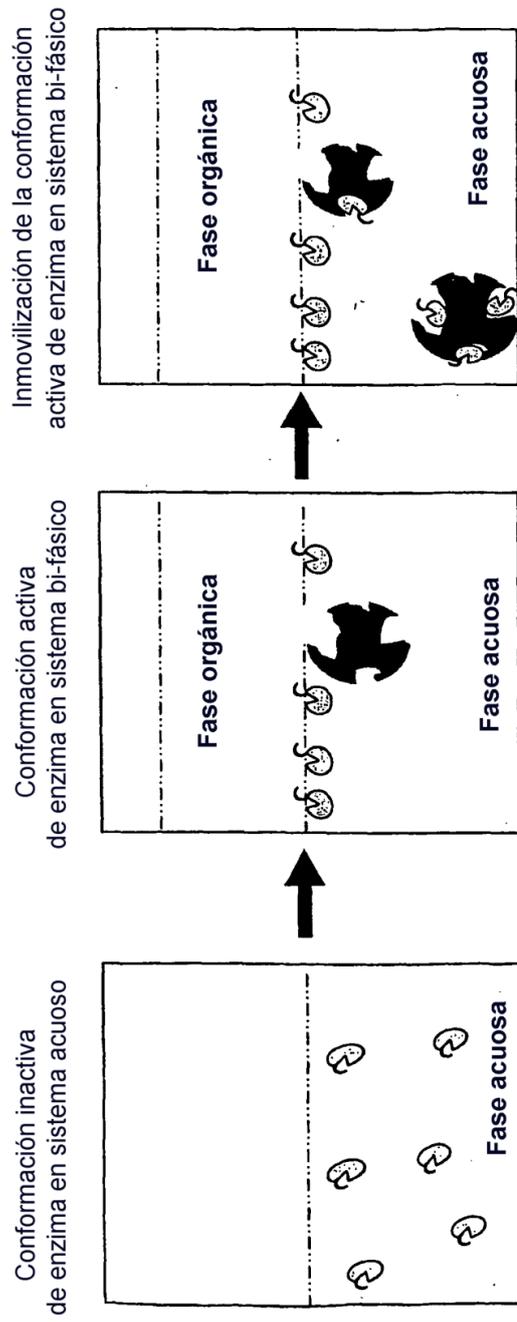


Fig. 1

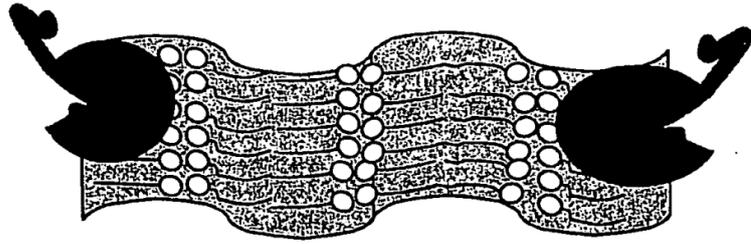


Fig. 2