

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 233**

51 Int. Cl.:
C11C 3/10 (2006.01)
C12N 9/20 (2006.01)
C12N 11/14 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06757101 .8**
96 Fecha de presentación: **07.06.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1900812**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.03.2008**

54 Título: **Composición de lipasa en polvo**

30 Prioridad:
09.06.2005 JP 2005169836

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.11.2012

73 Titular/es:
THE NISSHIN OILLIO GROUP, LTD. (50.0%)
23-1, SHINKAWA 1-CHOME, CHUO-KU
TOKYO 104-8285, JP y
NOVOZYMES A/S (50.0%)

72 Inventor/es:
NEGISHI, SATOSHI;
SUZUKI, JUNKO;
TAKAHASHI, ISAMU y
HOLM, HANS, CHRISTIAN

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 390 233 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

Composición de lipasa en polvo.

Campo técnico de la invención

5 La presente invención se refiere a un método de preparación de una composición de lipasa en polvo que se puede utilizar adecuadamente en diferentes reacciones de esterificación y reacciones de intercambio de ésteres.

Antecedentes de la invención

10 Las lipasas se utilizan ampliamente en reacciones de esterificación de diferentes ácidos carboxílicos tales como un ácido graso con alcoholes tales como monoalcoholes y polialcoholes o reacciones de intercambio de ésteres entre varios ésteres carboxílicos. Entre ellas, las reacciones de intercambio de ésteres son una importante tecnología que incluye la modificación de grasas y aceites de animales y plantas y un método para producir ésteres de diferentes ácidos grasos, ésteres de azúcar y esteroides. Cuando se utilizan las lipasas que son hidrolasas de las grasas y aceites, como un catalizador en dichas reacciones, las reacciones de intercambio de ésteres se pueden llevar a cabo en condiciones templadas desde temperatura ambiente hasta aproximadamente 70 °C. Por lo tanto, el uso de lipasas no solamente puede inhibir las reacciones secundarias y reducir los costes de energía en comparación con las reacciones químicas anteriores, sino que también su seguridad es alta porque las lipasas como catalizadores son productos naturales. Además, los compuestos objetivos se pueden producir de modo efectivo debido a su especificidad para el sustrato o especificidad posicional. Sin embargo, la actividad de lipasa no se desarrolla suficientemente cuando se utiliza la lipasa en polvo directamente en las reacciones de intercambio de ésteres. En adición a esto, es difícil que las lipasas básicamente solubles en agua se dispersen por igual en las materias primas con base de aceite y que después se puedan recoger. Por lo tanto, convencionalmente, es común que las lipasas se inmovilicen en algunos vehículos tales como resinas de intercambio aniónico (Documentación sobre patentes 1), resinas de adsorción de fenol (Documentación sobre patentes 2), vehículos hidrófobos (Documentación sobre patentes 3), resinas de intercambio catiónico (Documentación sobre patentes 4), y resinas quelatos (Documentación sobre patentes 5), y que después se usen en esterificaciones y en reacciones de intercambio de ésteres.

25 Sin embargo, puesto que la actividad de lipasa se reduce cuando se inmovilizan las lipasas sobre los vehículos, se han desarrollado varias tecnologías que utilizan lipasa en polvo.

30 Más concretamente, se ha propuesto un método que comprende las etapas de dispersar la lipasa en polvo en la materia prima que contiene uno o varios ésteres en presencia o ausencia de uno o varios disolventes orgánicos inactivos; y después llevar a cabo la reacción de intercambio de ésteres de forma que el 90 % o más de las partículas de lipasa en polvo dispersadas mantengan el diámetro de partícula de 1 a 100 µm en la reacción de intercambio de ésteres (Documentación sobre patentes 6). Además, se ha propuesto el método que utiliza el polvo enzimático obtenido mediante secado de una solución enzimática que contiene uno o varios fosfolípidos y una o varias vitaminas lipófilas (Documentación sobre patentes 7).

[Documentación sobre patentes 1] Publicación no examinada de la patente japonesa No. Sho 60-98984

35 [Documentación sobre patentes 2] Publicación no examinada de la patente japonesa No. Sho 61-202688

[Documentación sobre patentes 3] Publicación no examinada de la patente japonesa No. Hei 2-138986

[Documentación sobre patentes 4] Publicación no examinada de la patente japonesa No. Hei 3-61485

[Documentación sobre patentes 5] Publicación no examinada de la patente japonesa No. Hei 1-262795

[Documentación sobre patentes 6] Patente japonesa No. 2668187

40 [Documentación sobre patentes 7] Publicación no examinada de la patente japonesa No. 2000-106873

Descripción de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar un método de preparación de una composición de lipasa en polvo en la que la actividad y operabilidad de la lipasa están mejoradas.

45 La presente invención se ha completado basándose en el hallazgo de que los problemas anteriores se pueden resolver combinando los productos pulverizados de lipasas específicas inmovilizadas con ayudas filtrantes.

La presente invención proporciona un método para preparar una composición de lipasa en polvo que comprende una o varias ayudas filtrantes y un producto obtenido pulverizando una lipasa derivada de *Thermomyces sp.* inmovilizada en uno o varios vehículos con un tamaño de diámetro de partícula de 1 µm o más y menos de 300 µm.

Breve descripción del dibujo

La Fig. 1 presenta los cambios en las relaciones de intercambio de ésteres cuando se utiliza la composición de lipasa en polvo preparada según el método de la presente invención (Ejemplo 4) y la lipasa inmovilizada antes de la pulverización (Lipozyme TL-IM).

5 Mejor modo de realizar la invención

10 Las lipasas utilizadas en el método de la presente invención se derivan del *Thermomyces sp.* y la presente invención utiliza un producto obtenido por pulverización de las lipasas inmovilizadas sobre uno o varios vehículos de sílice con un diámetro medio de partícula de 1 μm o más y menos de 300 μm . Es preferible que el diámetro medio de partícula de las lipasas inmovilizadas en uno o varios vehículos de sílice sea de 300 a 1000 μm . Estas lipasas inmovilizadas se pueden obtener como Lipozyme TL-IM de Novozymes A/S, por ejemplo.

15 Es preferible que tales lipasas inmovilizadas se pulvericen mediante trituradores ordinarios hasta un diámetro medio de partícula de 1 μm o más y menos de 300 μm , más preferiblemente de 1 a 200 μm , también más preferiblemente de 1 a 100 μm , y en particular preferiblemente de 20 a 100 μm . Los trituradores incluyen morteros, trituradores de cizallamiento por fricción, trituradores cortadores, molinos de muelas (molinos coloidales, *mycolloiders*, *masscolloiders*), molinos de café, molinos de polvo, molinos de púas, trituradores de impacto (molinos de martillo, molinos de bolas), molinos de rodillos y molinos de flujo de aire, homogeneizadores, y trituradores ultrasónicos.

20 Además, las ayudas filtrantes usadas en la presente invención incluyen ayudas filtrantes inorgánicas tales como Celita y ayudas filtrantes orgánicas tales como fibras, por ejemplo celulosa y productos pulverizados de la misma. Entre ellas, son preferibles las ayudas filtrantes orgánicas, y especialmente las ayudas filtrantes orgánicas poliméricas. La celulosa es también más preferible entre ellas y se comercializa con el nombre de fábrica KC Flock de Nippon Paper Chemicals Co., Ltd, por ejemplo. Es preferible que las ayudas filtrantes estén en polvo y tengan un diámetro medio de partícula de 10 a 90 μm .

La relación de masas entre el producto pulverizado de lipasa y la ayuda o ayudas filtrantes es preferiblemente de 1/10 a 10/1 y más preferiblemente de 1/7 a 2/1.

25 Las composiciones de lipasa en polvo deben contener el producto pulverizado de lipasa y la ayuda o ayudas filtrantes.

30 Las composiciones de lipasa en polvo que se preparan según el método de la presente invención se pueden usar sin cambio en las reacciones de intercambio de ésteres en grasas y aceites y en las reacciones de esterificación. Además, se pueden purificar también poniendo en contacto uno o varios triglicéridos de ácidos grasos de cadena larga y uno o varios triglicéridos de cadena media y recogiendo después los mismos. Este método puede mejorar la actividad de la lipasa al mismo tiempo.

35 Según la presente invención, puesto que la facilidad de uso (operabilidad) de las composiciones de lipasa en polvo – que se preparan según el método de la presente invención – en las reacciones de esterificación y en las reacciones de intercambio de ésteres se mejora junto con la mejora de su actividad de lipasa y que dichas composiciones se pueden usar repetidamente en estas reacciones mediante reciclado, las composiciones de lipasa en polvo que se preparan según el método de la presente invención se pueden utilizar adecuadamente en la modificación de grasas y aceites por los intercambios de ésteres de los mismos y similares, a escala industrial. En adición, el sabor del aceite modificado por intercambio de ésteres se puede mejorar por las composiciones en polvo que se preparan según el método de la presente invención.

40 A continuación, los Ejemplos ilustrarán adicionalmente la presente invención.

Ejemplo 1

45 Se pulverizaron 5 g de Lipozyme TL-IM producida por Novozymes A/S con un molino coloidal, *mycolloider* tipo L fabricado por Tokushu Kika Kogyo Co., Ltd. Cuando se midieron los diámetros de partícula de la lipasa pulverizada con el analizador de la distribución del tamaño de partícula LA-500 fabricado por HORIBA, Ltd., el diámetro medio de partícula fue de 66,4 μm . Se añadieron 5 g de celulosa en polvo (Nippon Paper Chemicals Co., Ltd.: el diámetro medio de partícula era de 30 μm) como una ayuda filtrante al polvo para preparar una composición de lipasa en polvo. La actividad de intercambio de ésteres de esta composición de lipasa se determinó por el siguiente método. El resultado se muestra en la Tabla 1 como el valor relativo de la misma.

Método de medida de la actividad de lipasa

50 Se añadió la composición de lipasa al aceite en el que se mezclaron trioleína y tricaprilina en la relación de 1:1 (peso) y se hizo reaccionar a 60 °C. Se muestrearon temporalmente 10 μL del mismo. Después de diluir con 1,5 mL de hexano, se filtró la composición de lipasa, y se utilizó este filtrado como una muestra para cromatografía de gases (GC). Se analizó la muestra por GC (columna: DB-1ht), y se calculó su velocidad de reacción de acuerdo con la

siguiente fórmula. Las condiciones de GC eran: temperatura de la columna: inicio 150 °C; subida de la temperatura: 15 °C/min; y final 370 °C.

$$\text{Velocidad de reacción (\%)} = \left\{ \frac{\text{áreaC34}}{\text{áreaC24} + \text{áreaC34}} \right\} \times 100$$

5 en la que, C24 representa tricaprilina; C34 representa tricaprilina en la que un ácido graso está sustituido con un ácido oleico; y área representa las dimensiones del área de las mismas. Basándose en la velocidad de reacción en cada tiempo, se calculó la constante de velocidad de reacción K mediante el programa de análisis (original ver. 6.1).

La actividad de lipasa se presentó como la actividad relativa cuando el valor de K de la Lipozyme TL-IM era considerado como 100.

Ejemplo 2

10 Se pulverizaron 5 g de Lipozyme TL-IM producida por Novozymes A/S con un mortero. Cuando se midieron los diámetros de partícula de la lipasa pulverizada con el analizador de la distribución del tamaño de partícula LA-500 fabricado por HORIBA, Ltd., el diámetro medio de partícula fue de 52,1 µm. Se añadieron 2,5 g de celulosa en polvo (Nippon Paper Chemicals Co., Ltd) como una ayuda filtrante al polvo para preparar una composición de lipasa en polvo. La actividad de intercambio de ésteres de esta composición de lipasa se determinó por el mismo método que en el Ejemplo 1. El resultado se muestra en la Tabla 1 como el valor relativo de la misma.

Ejemplo 3

20 Se añadieron 50 g de aceite de colza a 5 g de Lipozyme TL-IM producida por Novozymes A/S y pulverizada con el homogeneizador (Multipro395) fabricado por DREMEL a 12500 rpm durante 3 minutos bajo enfriamiento con hielo. Cuando se midieron los diámetros de partícula de la lipasa pulverizada con el analizador de la distribución del tamaño de partícula LA-500 fabricado por HORIBA, Ltd., el diámetro medio de partícula fue de 91,5 µm. Se añadieron 5 g de celulosa en polvo (Nippon Paper Chemicals Co., Ltd) como una ayuda filtrante y se filtró el aceite de colza a presión reducida para obtener una composición de lipasa. La actividad de intercambio de ésteres de esta composición de lipasa se determinó por el mismo método que en el Ejemplo 1. El resultado se muestra en la Tabla 1 como el valor relativo de la misma.

25 Tabla 1

	Diámetro medio de partícula (µm)	Actividad de intercambio de ésteres con respecto a la masa de la preparación de lipasa
Antes de pulverizar (TL-IM)	800	100
Ejemplo 1	66,4	201
Ejemplo 2	52,1	304
Ejemplo 3	91,5	202

Ejemplo 4

30 Se añadieron 90 g de aceite de colza y 10 g de ODO (The Nisshin OilliO Group, Ltd.) a 5 g de la composición de lipasa obtenida en el Ejemplo 1. Se agitó la mezcla a 25 °C durante 5 horas y se filtró para recoger la composición de lipasa.

35 A continuación, se añadió el 0,5 % de la composición de lipasa pretratada con el método anterior a 150 g de ODO (The Nisshin OilliO Group, Ltd.) y 850 g de aceite de colza (The Nisshin OilliO Group, Ltd.) y se agitó a 50 °C durante 15 horas para llevar a cabo la reacción de intercambio de ésteres. Se calculó temporalmente la velocidad de intercambio de ésteres y se confirmó la marcha de la reacción. Mientras tanto, se determinó la velocidad de intercambio de ésteres analizando la composición de glicéridos con la cromatografía de gases y calculando la proporción del reactante de intercambio de ésteres en la muestra medida. La Figura 1 presenta los cambios en la velocidad de intercambio de ésteres del presente ejemplo y de la Lipozyme TL-IM (antes de triturar).

40 Después de la reacción, se filtró la composición de lipasa y se recogió. Se desacidificó el aceite obtenido, se le quitó el color y el olor por los métodos ordinarios para purificar un aceite modificado por intercambio de ésteres. El sabor del aceite obtenido modificado por intercambio de ésteres fue evaluado por un panel de expertos. Como resultado, la evaluación del mismo fue significativamente mejor que el del aceite modificado por intercambio de ésteres obtenido por el intercambio de ésteres utilizando la composición de lipasa que no fue pretratada ni con aceite de colza ni con ODO.

Además, cuando se utilizaron las enzimas recogidas para llevar a cabo la reacción de intercambio de ésteres, ellas fueron capaces de ser recicladas 10 veces sin problemas.

Ejemplo 5

5 Se pulverizó 1 kg de Lipozyme TL-IM producida por Novozymes A/S con el molino de púas fabricado por HOSOKAWAMICRON CORPORATION (Fine Impact Mill 100UPZ) a 17600 rpm. Cuando se midieron los diámetros de partícula de la lipasa triturada con el analizador de la distribución del tamaño de partícula LA-500 fabricado por HORIBA, Ltd., el diámetro medio de partícula fue de 13,8 µm. Se añadió 1 kg de celulosa en polvo (Nippon Paper Chemicals Co., Ltd.: el diámetro medio de partícula era de 30 µm) como una ayuda filtrante al polvo para preparar una composición de lipasa en polvo.

10 **Ejemplo 6**

Se añadieron 90 g de aceite de colza decolorado y 10 g de ODO (The Nisshin OilliO Group, Ltd.) a 5 g de la composición de lipasa obtenida en el Ejemplo 5. Se agitó la mezcla a 60 °C durante 2 horas y se filtró para recoger la composición de lipasa. La actividad de intercambio de ésteres de esta composición de lipasa se determinó por el mismo método que en el Ejemplo 1. El resultado se muestra en la Tabla 2 como el valor relativo de la misma.

15 **Ejemplo 7**

20 Se añadieron 90 g de aceite de colza decolorado y 10 g de ODO (The Nisshin OilliO Group, Ltd.) a 5 g de la composición de lipasa obtenida en el Ejemplo 5. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 24 horas y se filtró para recoger la composición de lipasa. La actividad de intercambio de ésteres de esta composición de lipasa se determinó por el mismo método que en el Ejemplo 1. El resultado se muestra en la Tabla 2 como el valor relativo de la misma.

Ejemplo 8

25 Se añadieron 50 g de aceite de colza decolorado y 50 g de ODO (The Nisshin OilliO Group, Ltd.) a 5 g de la composición de lipasa obtenida en el Ejemplo 5. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 24 horas y se filtró para recoger la composición de lipasa. La actividad de intercambio de ésteres de esta composición de lipasa se determinó por el mismo método que en el Ejemplo 1. El resultado se muestra en la Tabla 2 como el valor relativo de la misma.

Tabla 2

	Actividad de intercambio de ésteres con respecto a la masa de la preparación de lipasa
Antes de pulverizar (TL-IM)	100
Ejemplo 5	474
Ejemplo 6	557
Ejemplo 7	714
Ejemplo 8	600

REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de una composición de lipasa en polvo que comprende las etapas de pulverizar una lipasa derivada de *Thermomyces sp.* inmovilizada en uno o varios vehículos de sílice con un diámetro medio de partícula de 1 μm o más y menos de 300 μm y añadir una o varias ayudas filtrantes al producto resultante.
- 5 2. El método según la reivindicación 1, en el que el diámetro medio de partícula del producto pulverizado es de 1 a 200 μm .
3. El método según la reivindicación 2, en el que el diámetro medio de partícula del producto pulverizado es de 1 a 100 μm .
- 10 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la relación de masas entre el producto pulverizado y la ayuda o ayudas filtrantes es de 1/10 a 10/1.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la ayuda filtrante es celulosa.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la ayuda filtrante está en polvo.
7. El método según la reivindicación 6, en el que el diámetro medio de partícula de la ayuda filtrante es de 10 a 90 μm .

15

Figura 1

