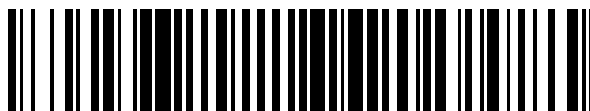


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 902**

51 Int. Cl.:

C12N 9/20 (2006.01)
C11C 3/02 (2006.01)
C11C 3/10 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)
C12R 1/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2007 E 07743186 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2013 EP 2019135**

54 Título: **Método de recuperación de la actividad de la lipasa**

30 Prioridad:

11.05.2006 JP 2006132639

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

10.05.2013

73 Titular/es:

**THE NISSHIN OILLIO GROUP, LTD. (100.0%)
23-1, SHINKAWA 1-CHOME, CHUO-KU
TOKYO 104-8285, JP**

72 Inventor/es:

**NEGISHI, SATOSHI;
SUZUKI, JUNKO y
YAMAUCHI, YOSHIE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 402 902 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

Método de recuperación de la actividad de la lipasa.

Campo Técnico de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos de recuperación de la actividad de la lipasa tales como varias capacidades de esterificación o transesterificación de una lipasa inmovilizada específica o composición de polvo de lipasa. La presente invención se refiere también a reacciones de esterificación o métodos de transesterificación de aceites y grasas en los que se usa una lipasa inmovilizada o composición de polvo de lipasa recuperada.

Antecedentes de la invención

10 La lipasa se usa generalmente en la reacción de esterificación entre varios ácidos carboxílicos tales como ácidos grasos y alcoholes tales como monoalcoholes y polialcoholes, o en la reacción de transesterificación entre múltiples ésteres carboxílicos. Entre ellas, una reacción de transesterificación es una tecnología importante para modificar grasas y aceites animales y vegetales, y para producir ésteres de varios ácidos grasos, ésteres de azúcar y esteroides. Cuando la lipasa, que es una hidrolasa de grasas y aceites, se usa como catalizador de estas reacciones, la reacción de transesterificación se puede efectuar en las suaves condiciones de temperatura ambiente a 70°C. De este modo, comparado con las reacciones químicas convencionales, la lipasa no solo inhibe las reacciones secundarias y disminuye los costes de energía sino que también tiene alta seguridad dado que la lipasa como catalizador es un producto natural. Adicionalmente, los compuestos objetivo se pueden producir efectivamente debido a la especificidad por el sustrato y a su especificidad por el sitio. Sin embargo, aunque se usa polvo de lipasa directamente en la reacción de transesterificación, la actividad de la lipasa generalmente no se expresa suficientemente. Además, es difícil dispersar uniformemente lipasa que es básicamente soluble en agua en una materia prima basada en aceite, y también es difícil recogerla. Por consiguiente, es común que la lipasa esté inmovilizada sobre cierto soporte tal como una resina de intercambio aniónico (Bibliografía de patentes 1), una resina de absorción fenólica (Bibliografía de patentes 2), un soporte hidrófobo (Bibliografía de patentes 3), una resina de intercambio catiónico (Bibliografía de patentes 4) y una resina de quelato (Bibliografía de patentes 5), y se use en una reacción de esterificación o transesterificación.

25 Sin embargo, dado que la actividad de la lipasa disminuye cuando la lipasa está inmovilizada sobre un soporte, se han desarrollado varias tecnologías que usan polvo de lipasa.

30 Más específicamente, se propone el método que comprende las etapas de dispersar polvo de lipasa en una materia prima que contiene un(unos) éster(es) en presencia o ausencia de un disolvente orgánico inactivo de modo que 90% o más del tamaño de partícula de las partículas de polvo de lipasa dispersadas se mantiene entre 1 y 100 µm en la reacción de transesterificación, y a continuación efectuar la reacción de transesterificación (Bibliografía de patentes 6). Adicionalmente, también se propone usar polvo enzimático que se obtiene secando una disolución enzimática que contiene un(unos) fosfolípido(s) y vitamina(s) soluble(s) en agua (Bibliografía de patentes 7).

35 Mientras tanto, dado que la lipasa, que es una enzima, es cara, se recoge después de la finalización de la reacción y se usa repetidamente, y se desecha primero cuando la actividad de la lipasa disminuye considerablemente. Sin embargo, si se puede recuperar la actividad disminuida de la lipasa, la usabilidad de la lipasa mejoraría de manera espectacular. De este modo, desde el punto de vista industrial, se ha deseado desarrollar un método efectivo de recuperación de la actividad de la lipasa.

Bibliografía de patentes 1: JP-A 60-98984

40 Bibliografía de patentes 2: JP-A 61-202688

Bibliografía de patentes 3: JP-A 2-138986

Bibliografía de patentes 4: JP-A 3-61485

Bibliografía de patentes 5: JP-A 1-262795

Bibliografía de patentes 6: JP-B 2668187

45 Bibliografía de patentes 7: JP-A 2000-106873

Descripción de la invención

El objetivo de la presente invención es proporcionar métodos para ser capaces de recuperar la actividad disminuida de la lipasa.

50 El objetivo adicional de la presente invención es proporcionar métodos de esterificación o métodos de transesterificación cada uno de los cuales comprende la etapa de usar una lipasa inmovilizada o composición de polvo de lipasa cada una de las cuales tiene la actividad de la lipasa recuperada.

La presente invención se ha completado basada en el hallazgo de que, en una lipasa inmovilizada específica o composición de polvo de lipasa que combina un producto triturado de la lipasa inmovilizada específica con una ayuda de filtro, cuando se lava dicha lipasa o composición de polvo de lipasa, cuya actividad de la lipasa ha disminuido, con triacilglicerol, se puede recuperar la actividad original de la lipasa.

5 A saber, la presente invención proporciona un método de recuperación de la actividad de la lipasa que comprende las etapas de usar una lipasa derivada de *Thermomyces* sp. e inmovilizada sobre un soporte, o una composición de polvo de lipasa que comprende una ayuda de filtro y la lipasa derivada de *Thermomyces* sp. e inmovilizada sobre un soporte que se tritura hasta un tamaño medio de partícula de 1 μm o mayor y menor de 300 μm en una reacción de esterificación o transesterificación que usa un triacilglicerol; separar dicha lipasa de la mezcla de reacción y lavar dicha lipasa o composición de polvo de lipasa con triacilglicerol.

10 La presente invención proporciona también una reacción de esterificación o transesterificación que comprende las etapas de usar una lipasa derivada de *Thermomyces* sp. e inmovilizada sobre un soporte, o una composición de polvo de lipasa que comprende una ayuda de filtro y la lipasa derivada de *Thermomyces* sp. e inmovilizada sobre un soporte que se tritura hasta un tamaño medio de partícula de 1 μm o mayor y menor de 300 μm en una reacción de esterificación o transesterificación que usa un triacilglicerol; separar dicha lipasa de la mezcla de reacción y lavarla con triacilglicerol para recuperar su actividad de la lipasa, y a continuación, efectuar una reacción de esterificación o transesterificación usando la lipasa inmovilizada o composición de polvo de lipasa resultantes.

Breve descripción de los dibujos

20 La Figura 1 muestra la disminución de la actividad de transesterificación con el tiempo cuando se usa una composición de polvo de lipasa en la reacción de transesterificación (Ejemplo 1(3)).

La Figura 2 muestra que la actividad de transesterificación se recupera lavando la composición de polvo de lipasa cuya actividad de transesterificación disminuyó según la presente invención (Ejemplo 1(4)).

La Figura 3 muestra que la actividad de transesterificación se recupera lavando la lipasa inmovilizada cuya actividad de transesterificación disminuyó, según la presente invención (Ejemplo 3(3 2)).

25 Mejor modo de llevar a cabo la invención

La lipasa usada en la presente invención se deriva de *Thermomyces* sp. y está inmovilizada sobre un soporte, preferentemente un soporte de sílice. En la presente invención, es posible usar dicha lipasa directamente o usar dicha lipasa que se tritura con un tamaño medio de partícula de 1 μm o mayor y menor de 300 μm . Más específicamente, es preferible que el tamaño medio de partícula de dicha lipasa inmovilizada sobre un soporte de sílice sea de alrededor de 300 a 1000 μm . Tal lipasa inmovilizada se puede obtener, por ejemplo, como Lipozyme TL-IM producida por Novozymes A/S.

30 Cuando se tritura tal lipasa inmovilizada, es preferible usar un molino normal y triturarla hasta el tamaño medio de partícula de 1 μm o mayor y menor de 300 μm , preferentemente de 1 a 200 μm , más preferentemente de 1 a 100 μm , y particular y preferentemente de 20 a 100 μm . Los ejemplos de molino incluyen un mortero, un molino de barras, un molino de cuchillas, una piedra de molino (*Mycolloider*, *Masscolloider*), un molino de café, un molino eléctrico, un molino de púas, un molino de impacto (un molino de martillo, un molino de bolas), un molino de rodillo, un molino de corriente, un homogeneizador, y un molino ultrasónico.

35 Cuando la lipasa deseada en la presente invención es el anterior producto triturado, es preferible usarlo en combinación con una ayuda de filtro. Los ejemplos de ayudas de filtro incluyen ayudas de filtro inorgánicas tales como celite y ayudas de filtro orgánicas tales como fibras, por ejemplo, celulosa y sus productos triturados. Entre ellas, son preferibles las ayudas de filtro orgánicas especialmente las ayudas de filtro orgánicas poliméricas, y son particularmente preferibles celulosa y similares. Sus ejemplos preferibles incluyen el nombre comercial KC Flock producido por Nippon Paper Chemicals Co., Ltd. Es preferible que la ayuda de filtro sea también en polvo y tenga de 10 a 90 μm de tamaño medio de partícula.

40 La relación en masa del anterior producto de lipasa triturado a la ayuda de filtro es preferentemente de 1/10 a 10/1, y particularmente preferible de 1/7 a 2/1.

Aunque la anterior lipasa inmovilizada o composición de polvo de lipasa usada en la presente invención se puede usar directamente en una reacción de esterificación o transesterificación de aceites y grasas, se pueden purificar poniéndolas en contacto con un triglicérido de ácido graso de cadena larga y un triglicérido de ácido graso de cadena media, y recogerlas a continuación. Al mismo tiempo, es posible mejorar su actividad de la lipasa.

50 Como triglicérido de ácido graso de cadena larga y triglicérido de ácido graso de cadena media usado aquí, es preferible usar aquellos mencionados en la siguiente sección sobre lavado de una lipasa inmovilizada o composición de polvo de lipasa.

Se prefiere usar un triglicérido de ácido graso de cadena larga y un triglicérido de ácido graso de cadena media con

una relación de masa de 95:5 a 50:50, y es preferible poner en contacto de 2 a 100 veces la masa de triglicérido para la masa total de lipasa.

5 La reacción de esterificación que usa la lipasa inmovilizada o la composición de polvo de lipasa es preferiblemente el método que comprende las etapas de esterificar grasas y aceites en presencia de la lipasa inmovilizada o composición de polvo de lipasa; a continuación recoger la lipasa inmovilizada o composición de polvo de lipasa y reciclarlas.

10 Especialmente, dado que la actividad y usabilidad de la lipasa en una reacción de esterificación o transesterificación de la anterior composición de polvo de lipasa se mejoran lo suficiente para ser reciclada y usada en estas reacciones, es posible usar apropiadamente la composición en la modificación de grasas y aceites por la transesterificación de grasas y aceites a escala industrial.

Sin embargo, cuando se recicla repetidamente y usa tal composición de polvo de lipasa o lipasa inmovilizada en una reacción de esterificación o transesterificación, su actividad de la lipasa tal como las capacidades de esterificar o transesterificar disminuye correspondiendo al número de usos.

15 La presente invención hace posible que cuando tal lipasa inmovilizada o composición de polvo de lipasa cada una de cuyas actividades de lipasa disminuyeron se lavan en unas condiciones específicas, su actividad de lipasa mejora y, en la composición de polvo de lipasa, la actividad de lipasa mejorada y la usabilidad se mantienen durante un largo periodo.

20 En la presente invención, la lipasa inmovilizada o composición de polvo de lipasa cada una de cuyas actividades de lipasa disminuyeron puede incluir aquellas en las que la actividad de lipasa original incluso disminuyó ligeramente. Sin embargo, con respecto al aspecto industrial, es preferible apuntar a aquellas en las que la actividad de lipasa original (100%) disminuyó hasta de 70 a 50%.

25 Mientras tanto, es preferible que el triacilglicerol usado para lavar una lipasa inmovilizada o composición de polvo de lipasa sea líquido a temperatura ambiente. Es particularmente preferible usar una mezcla de un triglicérido de ácido graso de cadena larga y un triglicérido de ácido graso de cadena media, cada uno de los cuales se usa para purificar la composición de polvo de lipasa.

Como triglicérido de ácido graso de cadena larga usado aquí, es preferible un triglicérido cuyo constituyente ácido graso tiene de 14 a 24 átomos de carbono, y es particularmente preferible un aceite vegetal seleccionado del grupo que consiste en aceite de canola, aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cártamo y aceite de maíz.

30 Como triglicérido de ácido graso de cadena media usado aquí, es preferible un triglicérido cuyo constituyente ácido graso tiene de 6 a 12 átomos de carbono. Es posible producir tal triglicérido de ácido graso por un método conocido públicamente o usar uno de sus productos comercializados. Los ejemplos de producto comercializado incluyen el nombre comercial ODO producido por The Nisshin Oil Group, Ltd.

35 Es preferible usar un triglicérido de ácido graso de cadena larga y un triglicérido de ácido graso de cadena media con una relación de masa de 95:5 a 50:50, y es preferible poner en contacto de 2 a 100 veces la masa, y más preferentemente de 5 a 50 veces la masa de triglicérido para una masa total de lipasa.

Particularmente, el triacilglicerol usado para lavar es preferentemente el aceite materia prima para la transesterificación.

40 Es preferible que una lipasa inmovilizada o composición de polvo de lipasa se lave de modo que la anterior lipasa o una lipasa en la anterior composición de lipasa puedan entrar en contacto suficientemente con el anterior triacilglicerol. Más específicamente, el lavado se lleva a cabo preferentemente agitando y dispersando una lipasa inmovilizada o composición de polvo de lipasa usada en una reacción de esterificación o transesterificación en triacilglicerol, y separarlas del triacilglicerol

45 El contacto, más específicamente agitando se realiza preferentemente a de 10 a 45°C y particularmente preferible a temperatura ambiente, y preferentemente durante 2 horas o más, más preferentemente durante 10 horas o más, y particularmente preferible durante 12 a 48 horas. Si se desea, se puede realizar durante 48 horas o más.

El agitador usado para agitar no está particularmente limitado, y es preferible usar un mezclador de propulsor, un agitador magnético, Threone motor, o similares.

50 De este modo, una lipasa inmovilizada o una lipasa en una composición de polvo de lipasa se pone en contacto suficientemente con triacilglicerol; se filtra según el método ordinario para separar la lipasa inmovilizada o la composición de polvo de lipasa del triacilglicerol, y a continuación se usa de nuevo en una reacción de esterificación o transesterificación.

Hasta ahora, una lipasa cuya actividad de lipasa disminuyó debido a su uso en varias reacciones ha sido desechada. Sin embargo, según el método de la presente invención, dado que se puede recuperar la actividad de la

lipasa, se puede extender la duración de uso de la lipasa y puede disminuir el coste de los productos que se producen usando la lipasa. De este modo, la presente invención tiene muchas ventajas desde el punto de vista industrial.

A continuación, los Ejemplos ilustrarán adicionalmente la presente invención.

5 Ejemplo 1

(1) Se trituró 1 kg de Lipozyme TL-IM de Novozymes A/S que tiene un tamaño medio de partícula de 800 µm en un molino de púas (Fine impact mil 100 UPZ) de Hosokawa Micron Corporation a 17600 rpm. El tamaño de partícula de la lipasa triturada se midió usando un analizador de distribución de tamaño de partícula LA-500 de HORIBA Ltd., y su tamaño medio de partícula era de 13,8 µm. Se añadió 1 kg de polvo de celulosa de Nippon Paper Chemicals Co., Ltd. que tiene un tamaño medio de partícula de 30 µm como ayuda de filtro al polvo de lipasa para preparar una composición de polvo de lipasa.

(2) Se añadieron 90 g de aceite de canola blanqueado y 10 g de ODO (un triglicérido de ácido graso de cadena media) de The Nisshin OilliO Group, Ltd. a 5 g de la composición de lipasa obtenida de este modo, y se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se filtró para recoger la composición de lipasa. A continuación, se midió la actividad transesterificante de esta composición de lipasa por el siguiente método, y su actividad relativa era 714 cuando se define la actividad de Lipozyme TL-IM antes de triturar como 100.

Método de medida de la actividad de la lipasa

La composición de lipasa se añadió al aceite en el que se mezclan trioleina y tricaprilina 1:1(peso) y se hizo reaccionar a 60°C. Se tomaron 10 µl de ella como muestra con el tiempo, se diluyó con 1,5 ml de hexano y a continuación, se tomó como muestra una disolución en la que se filtró la composición de lipasa para cromatografía de gases (GC). La disolución se analizó por GC (columna DB-1ht) y se calculó la velocidad de reacción con la siguiente fórmula. Las condiciones de la GC son: temperatura de la columna: comienzo a 150°C, elevación de la temperatura 15°C/min, y temperatura final de 370°C.

Velocidad de reacción (%) = {área de C34/(área de C24 + área de C34)} x 100

en la que, C24 es tricaprilina; C34 es tricaprilina en la que un ácido graso es remplazado por un ácido oleico; y área es cada una de sus áreas. Basado en la velocidad de reacción de cada tiempo, se calculó la constante K de la velocidad de reacción por medio de un software de análisis (origin ver. 6.1).

La actividad de lipasa se representó por la actividad relativa cuando se define el valor K de la Lipozyme TL-IM como 100.

(3) Se añadió 1% en peso de la composición de lipasa obtenida en el (2) anterior a 85 g de aceite de canola blanqueado de The Nisshin OilliO Group, Ltd., y 15 g de ODO de The Nisshim OilliO Group, Ltd., y se agitó durante 19 horas a 60°C para efectuar una reacción de transesterificación. Se calculó la velocidad de transesterificación con el tiempo, y se confirmó la progresión de la reacción. Con respecto a la reacción de transesterificación, se analizó la composición de glicérido usando cromatografía de gases, y se calculó la proporción de reactante de transesterificación en una muestra medida.

Después de la reacción, se filtró y recogió la composición de lipasa, y la composición de lipasa recogida se usó repetidamente en la reacción de transesterificación. La reacción se efectuó adicionalmente varias veces. El cambio de la velocidad de reacción representado por la velocidad relativa se muestra en la Figura 1.

De los resultados de la Figura 1, estaba claro que, cuando el tiempo total de reacción llega a alrededor de 82 horas, la actividad de lipasa de la composición de lipasa disminuye hasta alrededor de 60%.

(4) En el (3) anterior, la composición de lipasa cuya actividad de lipasa disminuyó hasta alrededor de 60% se filtró y se recogió. La composición de lipasa recogida de este modo se añadió a 18 g de aceite de canola blanqueado de The Nisshin OilliO Group, Ltd. y 2g de ODO de The Nisshin OilliO Group, Ltd., y se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente con una agitador magnético. Después de que la composición de lipasa se recogió por filtración, la transesterificación se efectuó repetidamente como se mencionó en el (3) anterior. El cambio de la velocidad de reacción representado por la velocidad relativa se muestra en la Figura 2.

De los resultados de la Figura 2, estaba claro que la actividad de lipasa se recupera a la actividad original de 100% lavando y agitando la composición de lipasa cuya actividad disminuyó y que tal composición de lipasa se puede reciclar y usar varias veces.

50 Ejemplo 2

(2-1) Se añadieron 90 g de aceite de canola blanqueado y 10 g de ODO de The Nisshin OilliO Group, Ltd. a 5 g de la composición de lipasa obtenida en (1) del Ejemplo 1, y se agitó durante 2 horas a 60°C. A continuación, la mezcla se filtró para recoger la composición de lipasa. La actividad de transesterificación de esta composición de lipasa se

midió por el mismo método que el del Ejemplo 1, y su actividad relativa era 557.

- 5 (2-2) Se añadió 1,2% en peso de la composición de lipasa obtenida en el (2-1) anterior a 100 g de aceite de soja y 25 g de aceite de soja totalmente hidrogenado de Yokozeki Fat & Oil Corporation, y se agitó durante 120 horas a 70°C. A continuación, la composición de lipasa se recogió por filtración. La actividad de lipasa de una parte de la composición de lipasa recogida se midió con el mismo método que el del Ejemplo 1 (2-2a). La composición de lipasa previamente recogida se dispersó en acetona y se filtró. Su torta de filtrado se recogió de nuevo y se dispersó en 50 g de mezcla de aceite de canola blanqueado : ODO de The Nisshin OilliO Group, Ltd. = 9:1 (peso). A continuación, la mezcla se filtró a temperatura ambiente para lavar y sustituirla, y se recogió la composición de lipasa. La actividad de transesterificación de esta composición de lipasa se midió por el mismo método que el del Ejemplo 1 (2-2b).
10 Cada actividad obtenida se mostró como valor relativo en la Tabla 1.

Tabla 1

| | Actividad relativa de transesterificación para una masa de una preparación de lipasa |
|---------------------------|--|
| Antes de triturar (TL-IM) | 100 |
| (2-1) | 557 |
| (2-2a) | 11 |
| (2-2b) | 200 |

Ejemplo 3

- 15 Se añadió 5% en peso de Lipozyme TL-IM (lipasa inmovilizada) de Novozymes A/S a 85 g de aceite de canola blanqueado de The Nisshin OilliO Group, Ltd. y 15 g de ODO de The Nisshin OilliO Group, Ltd., y se agitó durante 19 horas a 60°C para efectuar una reacción de transesterificación. Se calculó la velocidad de transesterificación con el tiempo, y se confirmó la progresión de la reacción. Por lo que respecta a la reacción de transesterificación, la composición de glicérido se analizó usando cromatografía de gases, y se calculó la proporción del reactante de transesterificación en una muestra medida.
- 20 Después de la reacción, la anterior lipasa inmovilizada se filtró y recogió, y la lipasa inmovilizada recogida se usó repetidamente en la reacción de transesterificación. La reacción se efectuó adicionalmente varias veces. El cambio de la velocidad de reacción representado por la velocidad relativa se muestra en la Figura 3 (3-1).
- 25 Se filtró y recogió la lipasa inmovilizada anterior cuya actividad relativa disminuyó hasta alrededor de 60%. La lipasa inmovilizada recogida de este modo se añadió a 18 g de aceite de canola blanqueado de The Nisshin OilliO Group, Ltd., y 2 g de ODO de The Nisshin OilliO Group, Ltd. y se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente. Después de que la lipasa inmovilizada se recogió por filtración, se efectuó repetidamente la transesterificación como se mencionó en el (3-1) anteriormente. El cambio temporal de la velocidad de reacción representado por la velocidad relativa se muestra en la Figura 3 (3-2).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de recuperación de la actividad de la lipasa, que comprende las etapas de usar una lipasa derivada de *Thermomyces* sp. e inmovilizada sobre un soporte, o una composición de polvo de lipasa que comprende una ayuda de filtro y la lipasa derivada de *Thermomyces* sp. e inmovilizada sobre un soporte que se tritura hasta un tamaño medio de partícula de 1 µm o mayor y menor de 300 µm en una reacción de esterificación o transesterificación que usa un triacilglicerol; separar dicha lipasa de la mezcla de reacción y lavar dicha lipasa o composición de polvo de lipasa con triacilglicerol.
2. El método según la reivindicación 1, en el que el triacilglicerol es líquido a temperatura ambiente.
- 10 3. El método según la reivindicación 1, en el que el triacilglicerol incluye un(unos) triglicérido(s) de ácido graso de cadena media.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el triacilglicerol es el aceite materia prima para la transesterificación.
- 15 5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el lavado se efectúa por las etapas de agitar y dispersar la lipasa inmovilizada o la composición de polvo de lipasa usada en la reacción de esterificación o transesterificación en triacilglicerol; y separar la lipasa o la composición de polvo de lipasa del triacilglicerol.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el soporte es sílice.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el tamaño medio de partícula del producto triturado es de 1 a 200 µm.
- 20 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la ayuda de filtro es celulosa.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la ayuda de filtro está en polvo y su tamaño medio de partícula es de 10 a 90 µm.
- 25 10. Un método de una reacción de esterificación o transesterificación que comprende las etapas de usar una lipasa derivada de *Thermomyces* sp. e inmovilizada sobre un soporte, o una composición de polvo de lipasa que comprende una ayuda de filtro y la lipasa derivada de *Thermomyces* sp. e inmovilizada sobre un soporte que se tritura hasta un tamaño medio de partícula de 1 µm o mayor y menor de 300 µm en una reacción de esterificación o transesterificación que usa un triacilglicerol; separar la lipasa o composición de polvo de lipasa del sistema de reacción y lavarla con triacilglicerol para recuperar su actividad de lipasa; y a continuación, efectuar la reacción de esterificación o transesterificación usando la lipasa inmovilizada o composición de polvo de lipasa resultante y un
30 triacilglicerol.

FIG. 1

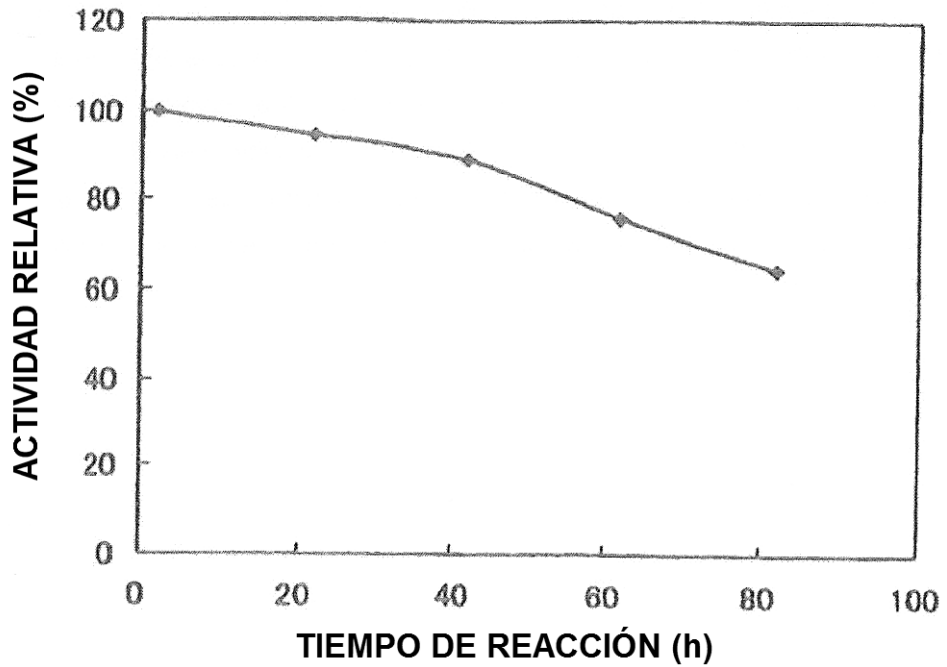


FIG. 2

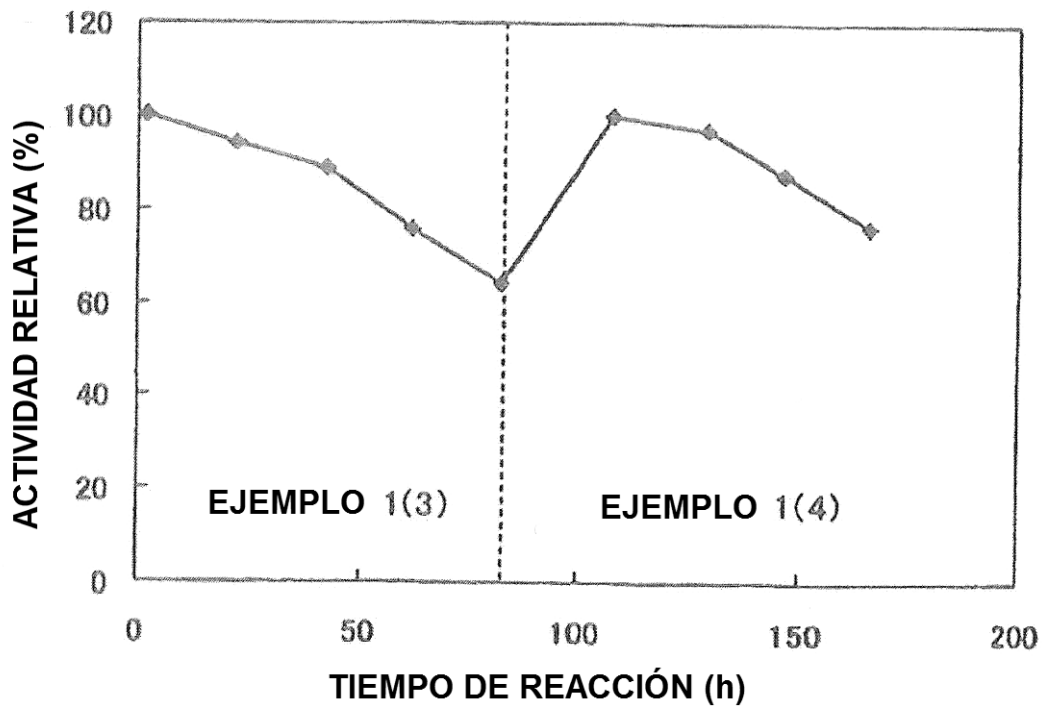


FIG. 3

