

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 447 540**

51 Int. Cl.:

C12P 7/62 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2008 E 08738332 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2013 EP 2152866**

54 Título: **Enzimas modificadas inmovilizadas con una elevada tolerancia frente a sustratos hidrófilos en medios orgánicos**

30 Prioridad:

09.05.2007 IL 18308407

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

12.03.2014

73 Titular/es:

**TRANSBIODIESEL LTD. (100.0%)
REGIONAL R&D CENTER
20200 SHFARAM, IL**

72 Inventor/es:

BASHEER, SOBHI

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 447 540 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 modificadas inmovilizadas con una elevada tolerancia frente a sustratos hidrófilos en medios orgánicos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a enzimas interfaciales inmovilizadas, particularmente a lipasas y a fosfolipasas, así como a otras hidrolasas, con una actividad y una estabilidad mejoradas frente a alcoholes, en particular alcoholes de cadena corta, así como otras sustancias hidrófilas. La invención también se refiere a procedimientos de preparación de dichas enzimas, y a sus diversos usos industriales y de investigación, particularmente para la producción de ésteres metílicos de ácidos grasos, típicamente usados como biodiésel.

Antecedentes de la invención

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

15 Las lipasas y las fosfolipasas son las enzimas interfaciales más familiares que expresan su actividad catalítica una vez presentes en un sistema interfacial. Las lipasas (hidrolasa de triacilglicerol 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 las enzimas hidrolíticas, sin embargo escinden favorablemente y específicamente el enlace éster de los 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 las fosfolipasas están ampliamente distribuidas en animales, plantas y microorganismos. El interés en la aplicación industrial de las lipasas y de las fosfolipasas ha crecido rápidamente durante las últimas dos décadas. Se ha averiguado que en una actividad con poca agua, esta clase de enzimas cataliza su reacción de hidrólisis inversa. La actividad catalítica inversa de las lipasas y las fosfolipasas ha sido ampliamente explotada para la síntesis de valiosos compuestos que contienen enlaces éster y amida u otros compuestos químicos relacionados que contienen grupos funcionales tales como hidroxilo, carboxílico y grupos amino. En particular, las lipasas y las fosfolipasas se han utilizado para la reformulación de grasas, aceites, ceras, fosfolípidos y que esfingolípidos para obtener unas nuevas propiedades funcionales deseadas, y para separar compuestos ópticamente activos a partir de sus mezclas racémicas. Es de particular interés el uso de enzimas interfaciales para la síntesis de ésteres alquílicos de cadena corta (biodiésel), desvelados en este documento.

25 Actualmente existen más de 40 lipasas y fosfolipasas diferentes disponibles comercialmente, aunque sólo unas pocas de ellas están preparadas en cantidades comerciales. Algunas de las enzimas interfaciales más prometedoras industrialmente derivan 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.

30 La inmovilización de las enzimas ha sido descrita por un amplio número de técnicas que aspiran básicamente a reducir el coste de la contribución de las enzimas en el procedimiento global, facilitando la recuperación de las enzimas a partir de los productos y permitiendo una operación continua del procedimiento. Las técnicas de inmovilización se dividen en general según lo siguiente:

1. Adsorción física de enzimas en soportes sólidos, tales como sílice y polímeros insolubles.
2. Adsorción en resinas de intercambio iónico.
3. Unión covalente de las enzimas sobre un material de soporte sólido, tal como un soporte inorgánico epoxidado o polimérico.
- 45 4. Atrapamiento de las enzimas en un polímero en crecimiento.
5. Confinamiento de las enzimas en un reactor de membrana o en geles semipermeables.
6. Reticulación de cristales (CLECS's) o de agregados enzimáticos (CLEAS's).

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

- 50 1. Disolver la enzima en un sistema tamponante apropiado con respecto al pH, la temperatura, el tipo de sal tamponante y la fuerza iónica.
2. Añadir el soporte sólido a la disolución de la enzima y mezclar durante un tiempo hasta que las moléculas de enzima estén inmovilizadas sobre el soporte sólido.
3. Filtrar el soporte sólido que contiene la enzima inmovilizada.
- 55 4. Lavar el soporte con un tampón apropiado para eliminar las moléculas de enzima unidas débilmente y después secar el soporte sólido.

Las enzimas interfaciales, en su mayor parte lipasas, han sido inmovilizadas siguiendo las técnicas mencionadas anteriormente. Estas preparaciones de enzima inmovilizada ofrecidas poseen una baja actividad sintética y/o un tiempo de semivida operativa corto. En un intento de aumentar la actividad sintética de las lipasas movilizadas y de otras enzimas interfaciales se han aplicado diferentes procedimientos de activación. Estos procedimientos incluyen:

- 5 1. Unir los grupos funcionales de la superficie de las enzimas con residuos hidrófobos tales como ácidos grasos o polietilenglicol.
2. Recubrir la superficie de las enzimas con tensioactivos, tales como ésteres de ácidos grasos de polioliol.
3. Poner en contacto las enzimas con soportes hidrófobos, típicamente polipropileno, que han sido pretratados con disolventes hidrófilos, tales como etanol o isopropanol.
- 10 4. Añadir activadores enzimáticos, tales como disolución salina, glicerol, etc. a una baja concentración, típicamente por debajo del 1 %, al sistema de reacción.

15 Ninguno de los procedimientos mencionados anteriormente produjo unos resultados satisfactorios con respecto a la activación, la estabilización y la rentabilidad de las enzimas interfaciales inmovilizadas con objeto de llevar a cabo conversiones enzimáticas inversas en cantidades industriales. También se ha informado de que la mayoría de las enzimas, cuando son inmovilizadas según el procedimiento mencionado anteriormente, bien pierden una porción significativa de su actividad sintética, o bien no muestran el rendimiento completo de su actividad debido a ciertas limitaciones impuestas por el procedimiento de inmovilización. Por ejemplo, el recubrimiento de lipasas y de fosfolipasas con ésteres de ácidos grasos de polioliol suponía un importante reto cuando las moléculas de lipasa no estaban completamente recubiertas con el activador; por lo tanto, aquellas moléculas de enzima que no estuvieran en contacto con el activador, permanecían inactivas.

20 El documento WO 00/75295 A1 describe enzimas lipolíticas que están modificadas químicamente mediante una unión covalente de uno o más grupos hidrófobos a la molécula de la enzima. El documento WO 99/15689 A1 describe un complejo de lipasa recubierto con un tensioactivo inmovilizado sobre una matriz insoluble.

25 Pavlenko I M y col. (Russian Journal of Bioorganic Chemistry, Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers, NE, vol. 31, nº 6, 1 de noviembre de 2005 (2005-11-01), páginas 535 - 542) describe la hidrofobización de una lipasa mediante su modificación química con palmitato de N-succinidimilo.

El documento WO 99/33964 A1 describe un procedimiento para la producción de una preparación enzimática inmovilizada para su uso en un medio fundamentalmente orgánico desprovisto de agua libre que comprende un lecho fluido.

30 Otro importante inconveniente de las lipasas y de las fosfolipasas es su baja tolerancia frente a sustratos hidrófilos, particularmente alcoholes de cadena corta y ácidos grasos de cadena corta (por debajo de C4). Se ha observado en muchos estudios de investigación que los alcoholes de cadena corta y los ácidos grasos de cadena corta, tales como metanol y ácido acético, son responsables del desprendimiento de moléculas de agua esenciales desde la estructura cuaternaria de estas enzimas, dando lugar a su desnaturalización y a la consecuente pérdida de su actividad catalítica. Este inconveniente ha prohibido la aplicación de las lipasas para la producción de cantidades comerciales de ésteres metílicos de ácidos grasos "biodiésel" mediante el uso de aceites de triglicérido y metanol como sustratos.

35 Es por lo tanto un objeto de la presente invención proporcionar un nuevo procedimiento para obtener enzimas interfaciales muy activas e inmovilizadas de forma estable, en particular lipasas y fosfolipasas, para aplicaciones sintéticas. Es de particular interés el uso de estas enzimas para la síntesis de ésteres alquílicos de ácidos grasos de cadena corta para su uso como "biodiésel".

Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar enzimas interfaciales muy activas, estables, inmovilizadas, que poseen una elevada tolerancia frente a alcoholes de cadena corta, tales como metanol, etanol y glicerol, y ácidos grasos de cadena corta, tales como ácido acético.

45 Estos y otros objetos de la invención serán apreciables según avance la descripción.

Sumario de la invención

La invención se refiere a una enzima interfacial modificada inmovilizada sobre un soporte sólido hidrófobo, en la que la enzima es una lipasa, una esterasa o una fosfolipasa, y en la que dicha enzima está recubierta con grupos lipídicos unidos covalentemente, rodeada así por un microentorno hidrófobo y protegida de la desactivación y/o de la agregación en presencia de agentes, sustratos y/o productos de reacción hidrófilos, en la que dicho recubrimiento con grupos lipídicos se consigue uniendo covalentemente epóxidos lipídicos a grupos funcionales de la superficie de la enzima a través de su grupo epoxi original.

La invención también se refiere a un procedimiento para la preparación de una enzima interfacial modificada que comprende las etapas de:

- 55 (a) proporcionar un sistema formado por una disolución tamponante acuosa y al menos un disolvente orgánico

que contiene un epóxido lipídico;

(b) mezclar dicha enzima interfacial con el sistema bisolvente proporcionado en la etapa (a);

(c) añadir dicho soporte a la mezcla de la etapa (b) y mezclar;

(d) aislar de la mezcla obtenida en la etapa (c) la enzima interfacial inmovilizada sobre dicho soporte.

- 5 La invención también se refiere adicionalmente a un procedimiento para la preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos (biodiésel) que comprenden la etapa de: la adición poco a poco de metanol a un aceite de una planta, de un animal, de un alga o de pescado, o a una mezcla de al menos dos de estos aceites que contiene una lipasa según se define en este documento, o preparada mediante el procedimiento inventivo, y permitir que la reacción avance en unas condiciones adecuadas hasta que dichos aceites de triglicéridos se conviertan en ésteres metílicos de ácidos grasos.

La presente invención se refiere a una enzima interfacial modificada inmovilizada sobre un soporte sólido, en la que dicha enzima está rodeada por un microentorno hidrófobo, y así está protegida de la desactivación y/o de la agregación en presencia de agentes, sustratos y/o productos de reacción hidrófilos.

- 15 La enzima interfacial modificada inmovilizada de la invención puede ser protegida mediante el recubrimiento con grupos lipídicos unidos covalentemente.

- Dicho soporte puede ser capaz de unir dicha enzima mediante adsorción o mediante la unión covalente a grupos funcionales. Más específicamente, dicho soporte puede ser orgánico o inorgánico, y preferiblemente se selecciona de entre el grupo que consiste en un soporte inorgánico tal como soportes basados en sílice y en alúmina, soportes orgánicos tales como un soporte basado en polímeros, en los que dicho soporte puede contener grupos funcionales activos tales como grupos epoxi o aldehído y grupos iónicos, o dicho soporte es una resina de intercambio iónico.

Dicho epóxido lipídico puede seleccionarse de entre ácidos grasos, ésteres alquílicos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de azúcares, glucósidos alquílicos de cadena media y larga, fosfolípidos, derivados de polietilenglicol y sales de amonio cuaternario.

- 25 En este documento se describe adicionalmente una enzima interfacial modificada que es protegida mediante su inmovilización o su inclusión en un soporte sólido hidrófobo que proporciona el microentorno hidrófobo.

La enzima puede ser una lipasa, una esterasa o una fosfolipasa. Más específicamente, la enzima puede derivar de uno cualquiera de *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus niveus*, *Mucor miehei*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium camembertii*, *Alcaligenes sp.*, *Burkholderia sp.*, *Thermomyces lanuginosa*, *Chromobacterium viscosum*, semillas de papaya y pancreatina.

- 30 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de una enzima interfacial modificada inmovilizada sobre un soporte insoluble, que está protegida de la desactivación y/o de la agregación en presencia de agentes, sustratos y/o productos de reacción hidrófilos, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar un sistema formado por una disolución tamponante acuosa y al menos un disolvente orgánico que contiene un epóxido lipídico;

- 35 (b) mezclar dicha enzima interfacial con el sistema bisolvente proporcionado en la etapa (a);

(c) añadir dicho soporte a la mezcla de la etapa (b) y mezclar;

(d) aislar de la mezcla obtenida en la etapa (c) la enzima interfacial inmovilizada sobre dicho soporte.

- 40 En una forma de realización, dicho soporte es un soporte poroso que puede ser orgánico, preferiblemente seleccionado de entre el 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 polímeros, en los que dicho soporte puede contener opcionalmente grupos funcionales activos tales como grupos epoxi o aldehído, y grupos iónicos.

En otra forma de realización, dicho disolvente orgánico se elige de entre alcanos (tal como octano), un éter (tal como diisopropil éter), alcoholes (tal como n-octanol), aldehídos (tal como decanaldehído) y cetonas (tal como 2-octanona) y cualquier mezcla de los mismos.

- 45 En una forma de realización adicional, dicho epóxido lipídico se elige de entre ácidos grasos, ésteres metílicos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de azúcares, glucósidos alquílicos de cadena media y larga, fosfolípidos, derivados de polietilenglicol y sales de amonio cuaternario.

- 50 En otro aspecto más, la presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de una enzima interfacial modificada inmovilizada sobre un soporte, en el que dicha enzima está rodeada por un microentorno hidrófobo, por lo tanto protegida de la desactivación y/o de la agregación en presencia de sustratos y/o productos de reacción hidrófilos, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar un sistema bifásico formado por una disolución tamponante acuosa y al menos un disolvente orgánico que contiene un epóxido lipídico, particularmente un epóxido de ácido graso o un epóxido de triglicérido;

(b) mezclar dicha enzima interfacial con el sistema bifásico, con un gran exceso del epóxido, proporcionado en la

etapa (a) para hacer reaccionar los grupos reactivos de la superficie nucleófila de la enzima, particularmente los grupos amino, con el grupo epóxido, para producir una enzima recubierta covalentemente con ácidos grasos o con triglicéridos (Figura 1);

(c) añadir dicho soporte a la mezcla de la etapa (b) y mezclar;

- 5 (d) aislar de la mezcla obtenida en la etapa (c) el complejo de lípido-enzima interfacial inmovilizado sobre dicho soporte.

Antes de mezclar con la disolución bifásica de enzima, dicho soporte se lava opcionalmente para eliminar las sales y los materiales orgánicos.

- 10 En este procedimiento de la invención, el soporte insoluble es capaz de unirse a la enzima interfacial mediante la adsorción física o mediante la unión covalente a grupos funcionales. El soporte es preferiblemente un soporte poroso que puede ser orgánico o inorgánico, preferiblemente seleccionado de entre el 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 polímeros, en los que dicho soporte puede contener opcionalmente grupos funcionales activos tales como grupos epoxi o aldehído, o grupos iónicos.

- 15 El disolvente orgánico usado en la etapa (a) del procedimiento de epoxidación de la invención puede ser, pero no se limita a, un alcano (tal como octano), un alcohol (tal como n-octanol), un aldehído (tal como decanaldehído), un éter (tal como diisopropil éter) o una cetona (tal como 2-octanona) y cualquier mezcla de los mismos.

- 20 La enzima interfacial que se va a preparar mediante el procedimiento de la invención es una lipasa, una esterasa o una fosfolipasa. Algunos ejemplos específicos no limitantes son las enzimas derivadas de *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus niveus*, *Mucor javanicus*, *Mucor miehei*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium camembertii*, *Alcaligenes sp.*, *Burkholderia sp.*, *Thermomyces lanuginosa*, *Chromobacterium viscosum*, semillas de papaya y pancreatina.

- 25 La enzima interfacial de la invención, inmovilizada sobre un soporte poroso sólido, está bloqueada en su conformación activa y esta modificada mediante el recubrimiento covalente con un gran número de moléculas de dicho lípido (unido a un grupo funcional de la superficie de la enzima a través de sus grupos epoxi originales) y se caracteriza por una alta tolerancia frente a sustratos hidrófilos, tales como alcoholes de cadena corta y ácidos grasos de cadena corta.

- 30 El soporte usado en el procedimiento de epoxidación de la invención es capaz de unir dicha enzima recubierta con lípidos mediante la adsorción física o mediante la unión covalente a grupos funcionales, y puede ser un soporte orgánico o inorgánico, preferiblemente seleccionado de entre soportes inorgánicos tales como soportes basados en sílice o en alúmina, soportes orgánicos tales como un soporte basado en polímeros, 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.

- 35 En esta preparación de enzimas recubiertas con lípidos de la invención, el lípido es preferiblemente, pero no se limita a, un ácido graso libre o un epóxido de un éster alquílico de ácido graso, un epóxido de un éster de ácido graso de azúcar, un glucósido alquílico de cadena media y larga, un fosfoepóxido lipídico, un derivado de un epóxido de polietilenglicol o un epóxido de una sal de amonio cuaternario. Los epóxidos de los sustratos lipídicos insaturados se obtienen típicamente oxidando al menos uno de los dobles enlaces a un grupo epóxido mediante una catálisis química o bioquímica, por ejemplo, mediante una lipasa en presencia de hiperóxido de hidrógeno.

- 40 En este documento se describe adicionalmente un procedimiento para preparar una enzima interfacial modificada inmovilizada sobre un soporte sólido, en el que dicha enzima está rodeada por un microentorno hidrófobo, protegida de la desactivación y/o de la agregación en presencia de sustratos y/o productos de reacción hidrófilos, que comprende las etapas de (a) proporcionar un sistema formado por (i) un tampón acuoso o (ii) un sistema bifásico formado por un tampón acuoso y un disolvente orgánico, (b) añadir a cualquiera de dichos sistemas (i) o (ii) un soporte polimérico hidrófobo; (c) añadir a una mezcla obtenida en la etapa (b) dicha enzima interfacial y mezclar; y
- 45 (d) aislar de la mezcla obtenida en la etapa (c) la enzima interfacial inmovilizada sobre dicho soporte hidrófobo.

- En este procedimiento, dicho disolvente orgánico puede ser, pero no se limita a n-octano, isooctano, n-hexano, n-octanol diisopropil éter y aceites de triglicéridos. El soporte polimérico hidrófobo puede ser, pero no se limita a, un polímero reticulado hidrófobo alifático y acrílico, o un polímero reticulado hidrófobo aromático, tal como Amberlite^R XAD 7HP y Amberlite^R XAD 1600, respectivamente.
- 50

En todos los procedimientos de la invención, la enzima puede ser una lipasa, una esterasa o una fosfolipasa, por ejemplo derivada de *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei*, *Mucor 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.

- 55 Las enzimas hidrofobizadas modificadas inmovilizadas de la invención, o preparadas mediante el procedimiento de la invención, pueden usarse ventajosamente en la producción de ésteres alquílicos de ácidos grasos para su uso como biodiésel o como intermedios en la preparación de ingredientes tensioactivos.

Por lo tanto, en este documento se proporciona un procedimiento enzimático para la preparación de lípidos estructurados que comprende la etapa de hacer reaccionar una fuente de ácidos grasos, tal como un ácido graso libre, un triglicérido, ésteres de ácidos grasos, glicéridos parciales, fosfolípidos o cualquier otro derivado de un ácido graso con un alcohol, tal como metanol, en presencia de una enzima inmovilizada modificada de la invención o preparada mediante el procedimiento de la invención.

En otra forma de realización más, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos (biodiésel) que comprende la adición poco a poco de metanol a una fuente de ácidos grasos obtenida a partir de un aceite de una planta, de un animal, de un alga o de pescado, o a una mezcla de al menos dos de estos aceites que contiene una lipasa de acuerdo con la invención o preparada mediante un procedimiento de la invención, y permitir que la reacción avance en unas condiciones adecuadas, hasta que dichos grupos acilo grasos o ácidos grasos se conviertan en ésteres metílicos de ácidos grasos. En este procedimiento, el aceite vegetal puede ser, pero no se limita a, aceite de semilla de soja, aceite de colza, aceite de oliva, aceite de ricino, aceite de palma, aceite de girasol, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de *Jatropha*, aceite de desecho de cocina o cualquier aceites de triglicéridos derivado de fuentes vegetales no comestibles.

La invención se describirá con más detalle con referencia a las siguientes figuras.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: una ilustración esquemática del procedimiento para el recubrimiento covalente de la enzima con epóxidos de ácidos grasos.

Figura 2A: actividad hidrolítica de la lipasa inmovilizada de *Mucor miehei* (*M. miehei*) de la invención, comparada con la actividad hidrolítica de la misma enzima, inmovilizada y con un recubrimiento tensioactivo lipídico no covalente, en una disolución tamponante.

Figura 2B: actividad sintética de la lipasa inmovilizada de *M. miehei* de la invención, comparada con la actividad hidrolítica de la misma enzima, inmovilizada y con un recubrimiento tensioactivo lipídico no covalente, en una disolución tamponante.

Figura 3A: actividad hidrolítica de la lipasa inmovilizada de *M. miehei* de la invención, comparada con la actividad hidrolítica de la misma enzima, inmovilizada y con un recubrimiento tensioactivo lipídico no covalente, en acetona.

Figura 3B: actividad sintética de la lipasa inmovilizada de *M. miehei* de la invención, comparada con la actividad hidrolítica de la misma enzima, inmovilizada y con un recubrimiento tensioactivo lipídico no covalente, en acetona.

Figura 4A: actividad hidrolítica de la lipasa inmovilizada de *M. miehei* de la invención, comparada con la actividad hidrolítica de la misma enzima, inmovilizada y con un recubrimiento tensioactivo lipídico no covalente, en n-hexano.

Figura 4B: actividad sintética de la lipasa inmovilizada de *M. miehei* de la invención, comparada con la actividad hidrolítica de la misma enzima, inmovilizada y con un recubrimiento tensioactivo lipídico no covalente, en n-hexano.

Figura 5: reacción de conversión (en %) en ésteres metílicos de ácidos grasos mediante el uso de lipasa de *Thermomyces lanuginose* inmovilizada en diversas matrices mediante el uso del mismo lote de biocatalizador en reacciones de transesterificación consecutivas.

Condiciones de la reacción: se mezclaron aceite de semilla de soja (2,5 g), metanol (0,3 g añadido en tres porciones con una diferencia de una hora) y lipasa inmovilizada (250 mg) en un agitador termostatzado a 30 °C durante 4 horas.

Figura 6: reacción de conversión (en %) en ésteres metílicos de ácidos grasos mediante el uso de lipasa de *Candida antarctica* B inmovilizada en diversas matrices mediante el uso del mismo lote de biocatalizador en reacciones de transesterificación consecutivas. Las condiciones de reacción eran como en la Figura 5.

Figura 7: reacción de conversión (en %) en ésteres metílicos de ácidos grasos mediante el uso de lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada en diversas matrices mediante el uso del mismo lote de biocatalizador en reacciones de transesterificación consecutivas. Las condiciones de reacción eran como en la Figura 5.

Figura 8: reacción de conversión (en %) en ésteres metílicos de ácidos grasos mediante el uso de lipasa de *Alcaligenes sp.* inmovilizada en diversas matrices mediante el uso del mismo lote de biocatalizador en reacciones de transesterificación consecutivas. Las condiciones de reacción eran como en la Figura 5.

Descripción detallada de la invención

En la búsqueda de nuevas enzimas muy activas e inmovilizadas de forma estable, en particular lipasas y fosfolipasas, con una elevada tolerancia frente a sustratos hidrófilos, tales como alcoholes de cadena corta y ácidos grasos de cadena corta, el presente inventor averiguó que un microentorno hidrófobo de un medio de reacción de transesterificación en las proximidades del sitio activo de la enzima puede servir como un medio para mejorar la actividad de las lipasas y para aumentar su resistencia a alcoholes y ácidos hidrófilos de cadena corta, así como otros agentes hidrófilos que puedan estar presentes en la mezcla de reacción.

El inventor desarrolló adicionalmente diferentes preparaciones enzimáticas en las que la enzima está inmovilizada en una matriz insoluble, y por lo tanto se hace hidrófoba. La enzima puede hacerse hidrófoba directamente, según se muestra a continuación, por ejemplo, mediante la unión de residuos lipófilos, por ejemplo, mediante la epoxidación con epóxidos lipídicos. En este documento también se describe una enzima que se hace hidrófoba mediante su inmovilización sobre una matriz hidrófoba, que aporta el microentorno hidrófobo por el que está rodeado la enzima, o en el que la enzima está incluida. En este trabajo se ha demostrado que un microentorno hidrófobo en las proximidades del sitio activo de la enzima actúa como una región tampón que es capaz de proteger la enzima de su exposición a concentraciones inhibitoras de sustratos y productos con fracciones hidrófilas. El microentorno hidrófobo proporcionado para la enzima es responsable de controlar el acceso de unos intervalos de concentraciones no inhibitoras de alcoholes de cadena corta al sitio activo de la enzima, y también es responsable de la eliminación de los productos hidrófilos de la reacción, formados en las proximidades del sitio activo de la enzima en el medio de reacción.

Por lo tanto, según un aspecto de la invención, la enzima hidrófoba inmovilizada puede prepararse mediante una técnica en dos etapas, sustancialmente como sigue:

Etapa 1: forzar todas las moléculas de enzimas interfaciales a que adopten su conformación activa haciéndolas reaccionar con un epóxido lipídico en un sistema bifásico formado por una fase acuosa y una fase orgánica que contiene el epóxido lipídico (véase la Fig. 1). El epóxido lipídico está presente en un gran exceso, y por lo tanto la molécula de la enzima está recubierta covalentemente por un gran número de moléculas lipídicas.

Etapa 2: añadir un soporte adecuado al sistema bifásico que ya contiene la enzima recubierta covalentemente.

En estas condiciones, las moléculas de enzimas recubiertas covalentemente con residuos o complejos lipídicos que están ubicadas en la interfase bifásica, pueden ser fácilmente inmovilizadas sobre el soporte mediante una simple adsorción física, una unión covalente con resinas activadas que contienen grupos funcionales tales como grupos epoxi o aldehído, o mediante su adsorción en resinas de intercambio iónico.

Esta técnica en dos etapas se emplea en la preparación de enzimas interfaciales modificadas activas inmovilizadas de acuerdo con la invención.

De acuerdo con este aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para preparar enzimas interfaciales estables, muy activas, modificadas, inmovilizadas, particularmente lipasas, esterases y fosfolipasas, en el que se proporciona un sistema bifásico formado por una disolución tamponante acuosa y al menos un disolvente orgánico que contiene un epóxido lipídico; la enzima interfacial se mezcla con un gran exceso del sistema bifásico; se añade un soporte sólido a la mezcla; y se aísla la enzima interfacial recubierta covalentemente con lípidos inmovilizada sobre el soporte.

El soporte sólido es preferiblemente un soporte poroso que puede ser orgánico o inorgánico, particularmente seleccionado de entre el grupo que consiste en soportes inorgánicos porosos tales como soportes basados en sílice o en alúmina, soportes orgánicos tales como un soporte basado en polímeros, en los que dicho soporte puede contener grupos funcionales activos tales como grupos epoxi o aldehído, o grupos iónicos. Algunos soportes específicos se proporcionan en los Ejemplos, a continuación, particularmente en la Tabla 1.

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

La enzima inmovilizada de la invención, o preparada mediante el anterior procedimiento de epoxidación de la invención, es muy activa, y particularmente estable y con una elevada tolerancia frente a sustratos hidrófilos, tales como alcoholes de cadena corta y ácidos grasos de cadena corta. Se conserva aproximadamente el 90 % de la actividad después de incluso 10 ciclos de reacción. Esta estabilidad es de una importancia económica primordial.

En este documento también se describe un procedimiento alternativo para la hidrofobización de la lipasa, que evita la necesidad de una epoxidación y del recubrimiento de la enzima con fracciones lipídicas. Las enzimas inmovilizadas unidas físicamente con un microentorno hidrófobo se produjeron mediante el contacto de matrices poliméricas porosas hidrófobas con una disolución acuosa o con un sistema bicapa de agua-disolvente orgánico [también denominado bifásico] que contiene diferentes lipasas. Las enzimas inmovilizadas así producidas se ensayaron en una reacción de transesterificación entre triglicéridos de aceite y metanol, para la producción de

biodiésel y glicerol, reacción de transesterificación que se usó como un modelo de reacción en este trabajo. Sin querer ceñirnos a ninguna teoría, se sugiere que la naturaleza hidrófoba del microentorno es responsable de disminuir las concentraciones de las sustancias hidrófilas en las proximidades de las moléculas de enzima. Estas sustancias hidrófilas pueden ser bien el (los) sustrato(s) activo(s) usado(s) en la reacción, o bien los productos formados por la reacción. Dicho biocatalizador "hidrofobizado" aseguró unas concentraciones controladas de los alcoholes hidrófilos de cadena corta y de los ácidos reactivos que alcanzan las proximidades de la enzima, y/o una rápida eliminación de cualquier sustancia hidrófila formada en las proximidades de las moléculas de enzima. Como resultado principal, las moléculas de enzima están protegidas de los sustratos y de los productos hidrófilos mediante el control de las concentraciones de reactivos que alcanzan las proximidades de la enzima inmovilizada, así como la rápida eliminación de los productos hidrófilos una vez formados por una reacción. Esta sugerencia se ensayó con cuatro lipasas diferentes, cada una inmovilizada por separado sobre cuatro soportes que difieren con respecto a su hidrofobicidad, según se muestra en el Ejemplo Comparativo 5.

En una forma de realización adicional, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos (biodiésel). En general, en este procedimiento se añade en primer lugar metanol poco a poco a una fuente de ácidos grasos, tal como a un aceite de una planta, de un animal, de un alga o de pescado, o a una mezcla de al menos dos de estos aceites. Se añade una lipasa modificada inmovilizada sobre un soporte sólido que está recubierta covalentemente con un lípido, preparado, por ejemplo, mediante el procedimiento de la invención, o una lipasa inmovilizada sobre una matriz hidrófoba de acuerdo con la invención, a la mezcla de metanol/fuente de ácidos grasos, y la reacción se deja avanzar hasta que la fuente de ácidos grasos se convierte en ésteres metílicos de ácidos grasos.

En el contexto de la presente solicitud, los términos soporte, matriz, adsorbente, se usan sinónimamente y pueden ser intercambiados.

Desvelada y descrita, debe entenderse que esta invención no está limitada a los ejemplos, etapas y materiales de procedimiento en particular desvelados en este documento, ya que dichas etapas y materiales de procedimiento pueden variar de algún modo. Debe entenderse que la terminología usada en este documento se usa únicamente con el fin de describir formas de realización en particular y no pretende ser limitante, dado que el ámbito de la presente invención está limitado únicamente por las reivindicaciones anexas y los equivalentes de las mismas.

Debe apreciarse que, según se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un", "uno/a" y "el/la" incluyen los referentes plurales salvo que el contenido lo indique claramente de otro modo.

En la presente memoria descriptiva y de las reivindicaciones que siguen, salvo que el contexto lo requiera de otro modo, se entenderá que la palabra "comprender", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", implican la inclusión de un número entero establecido o la etapa, o grupo de números enteros o de etapas, pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa, o grupo de números enteros o de etapas.

Los siguientes Ejemplos son representativos de las técnicas empleadas por los inventores para llevar a cabo la presente invención. Debería apreciarse que aunque estas técnicas son ejemplares de las formas de realización preferidas para la práctica de la invención, los expertos en la técnica, a la luz de la presente desvelación, reconocerán que pueden realizarse numerosas modificaciones sin desviarse del ámbito pretendido de la invención.

Ejemplos

40 Ejemplo 1

Preparación de lipasa inmovilizada (Lipozyme TL)

Se mezcló lipasa derivada de *Thermomyces lanuginosa* (1 ml de Lipozyme TL 100L, Novozymes, Dinamarca) en un sistema bisolvente formado por 1 ml de tampón de fosfato de 0,05 M y a pH 6,5, y 10 ml de n-hexano que contiene un epóxido lipídico. La mezcla se agitó durante 48 horas. Se añadió un soporte (1 g) en el sistema y la mezcla se agitó durante 8 horas. El soporte que contenía la enzima modificada inmovilizada se eliminó mediante filtración y se secó en un desecador durante una noche para producir la lipasa muy activa inmovilizada recubierta covalentemente con lípidos.

La Tabla 1 muestra la actividad de transesterificación relativa de Lipozyme TL 100L inmovilizada sobre diferentes soportes. Las reacciones se llevaron a cabo añadiendo la lipasa inmovilizada (0,2 g) a aceite de semilla de soja (2,5 g) y alcohol metílico (0,3 g). El sistema de reacción se mezcla magnéticamente o mediante agitación a 30 °C. La velocidad de reacción se determina midiendo los ésteres metílicos de ácidos grasos producidos después de 1 hora en las condiciones mencionadas anteriormente.

Tabla 1: velocidad de reacción mediante el uso de diferentes Lipozyme modificadas con epóxidos de ácidos grasos para la transesterificación de triglicéridos de aceite de semilla de soja para obtener ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Condiciones de reacción: se mezclan aceite de oliva (2,5 g) y metanol (0,2 g) con lipasa TL 100L modificada inmovilizada sobre diferentes soportes (0,2 g) durante 1 hora. La mezcla de reacción se agita a 300 rpm y a 30 °C.

5

Tipo de soporte	Velocidad de reacción (micromoles de FAME/min. g de biocatalizador)
Amberlite XAD 4 (Rohm & Haas, EE.UU.)	16
Amberlite XAD 16 (Rohm & Haas)	12
Amberlite XAD 7HP (Rohm & Haas)	10
Amberlite XAD 16HP (Rohm & Haas)	22
Duolite XAD 761 (Rohm & Haas)	11
Amberlite XAD 1180 (Rohm & Haas)	9
Amberlite XAD 1600 (Rohm & Haas)	8
Duolite A7 (Rohm & Haas)	12
Duolite A561 (Rohm & Haas)	10
Duolite A568 (Rohm & Haas)	12
Duolite C467 (Rohm & Haas)	6
Amberlyst A-21 (Rohm & Haas)	10
Dowex monosphere 77 (DOW, EE.UU.)	13
Dowex optipore L493 (DOW, EE.UU.)	12
Dow styrene DVB (DOW, EE.UU.)	18
MTO Dowex optipore SD-2 (DOW, EE.UU.)	10
Dowex MAC-3	9
Amberlite FPA53 (Rohm & Haas)	11
Amberlite FPC22H (Rohm & Haas)	10
Amberlite FPA40Cl (Rohm & Haas)	2
Amberlite IRC50 (Rohm & Haas)	7
Purolite A109 (Purolite, EE.UU.)	12

Ejemplo 2

Preparación de lipasa inmovilizada

Se repitió el procedimiento de inmovilización del Ejemplo 1 mediante el uso de diferentes lipasas (100 mg) y mediante el uso de epóxidos de triglicéridos. Las velocidades de reacción para la producción de los ésteres metílicos de ácidos grasos en las condiciones descritas anteriormente se describen en la Tabla 2.

10

Tabla 2: velocidad de reacción mediante el uso de diferentes lipasas modificadas con epóxidos de ácidos grasos para la transesterificación de triglicéridos de aceite de semilla de soja para obtener ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). Condiciones de reacción: se mezclan aceite de semilla de soja (2,5 g) y metanol (0,3 g) con diferentes lipasas recubiertas covalentemente con epóxidos de triglicéridos e inmovilizadas en Amberlite XAD 4 (0,2 g) durante 1 hora. La mezcla de reacción se agita a 300 rpm y a 30 °C.

Tipo de soporte	Velocidad de reacción (micromoles de FAME/min. g de biocatalizador)
<i>Candida antarctica</i>	9,6
<i>Candida rugosa</i>	7,7
<i>Rhizomucor miehei</i>	12,5
<i>Pseudomonas cepacia</i>	16,2
<i>Penicillium camembertii</i>	4,2
<i>Alcaligenes sp.</i>	12,3
<i>Rhizopus niveus</i>	3,4
<i>Mucor javanicus</i>	12,3
<i>Rhizopus oryzae</i>	14,2
<i>Aspergillus niger</i>	6,3
<i>Burkholderia sp.</i>	12,1
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	17,1
<i>Chromobacterium viscosum</i>	15,1

Ejemplo 3

Lipasas inmovilizadas para la preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos (biodiésel)

Las preparaciones de lipasa de *M. miehei* modificada inmovilizada se prepararon según el procedimiento del Ejemplo 1, mediante el uso de Amberlite XAD 8 o de celita (en polvo) como soporte, y de tampón (control) de *n*-hexano o de acetona (Ac) como disolvente orgánico.

Estas preparaciones se usaron para la preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos (biodiésel). La reacción se inicia añadiendo la lipasa inmovilizada (100 mg) y agitando el medio de reacción a 30 °C durante 6 horas.

Las actividades hidrolíticas y sintéticas de las diferentes preparaciones enzimáticas [Tampón-Epóxido-AO, en las que la enzima está recubierta covalentemente con ácido oleico, y Tampón-Epóxido-Aceite, en las que la enzima está recubierta covalentemente con un aceite (un triglicérido, por ejemplo, trioleína)] se compararon con las de la otra preparación de enzimas (que no están recubiertas covalentemente con un lípido): tampón (control) en el que la enzima está simplemente inmovilizada sobre el soporte; Tampón-Ácido oleico (Tampón-AO) en la que la enzima inmovilizada sobre el soporte está recubierta con el ácido graso; Tampón-SMO, en la que la enzima inmovilizada sobre el soporte está recubierta con monostearato de sorbitano.

Los resultados se muestran en las Figuras 2 a 4. Como puede observarse, ambas actividades hidrolítica y sintética de las enzimas de la invención, que están recubiertas covalentemente con un componente lipídico, fueron considerablemente y significativamente mayores que las de las otras preparaciones de enzimas.

Además, la mayor parte de la actividad de la enzima se conserva incluso después de 10 y más ciclos de reacción (datos no mostrados).

Las preparaciones de enzimas modificadas con epóxido de la invención muestran por lo tanto una elevada actividad y un aumento en la estabilidad.

Ejemplo Comparativo 4

Inmovilización de lipasas en tampón o en sistemas bifásicos

Se mezcló lipasa (3.000 unidades de lipasa de *Thermomyces lanuginosa*, de lipasa B de *Candida antarctica*, ambas

de Novozymes, Dinamarca, de lipasa de *Pseudomonas cepacia*, de Amano Enzyme Inc., Japón, o de lipasa de *Alcaligenes sp.*, de Meito Sangyo, Japón) en una disolución tamponante (10 ml, pH = 7) que contiene un soporte polimérico (1 g) a temperatura ambiente durante 8 horas. La enzima inmovilizada se eliminó mediante filtración y se secó sobre sílice en un desecador. Puede realizarse el mismo procedimiento en un sistema bifásico formado por
5 unos volúmenes similares de una disolución tamponante y un disolvente orgánico, por ejemplo, isooctano.

Se usaron los siguientes soportes, todos ellos elaborados por Rohm & Haas, EE.UU.:

- Amberlite XAD 1600, definido como adsorbente hidrófobo;
- Amberlite XAD 761, definido como adsorbente hidrófilo;
- Amberlite XAD7HP definido como adsorbente polar y no polar; y
- 10 - Amberlite IRA-958 definido como una resina polar de intercambio aniónico.

Ejemplo Comparativo 5

Uso de las lipasas inmovilizadas del Ejemplo 4 en la producción de biodiésel

Se evaluó la actividad de las lipasas inmovilizadas preparadas en el Ejemplo 4 mediante el uso de la transesterificación de triglicéridos de aceite y metanol para la producción de biodiésel y con glicerol como
15 subproducto. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de un 10 % p/p de lipasa inmovilizada en aceite de semilla de soja agitado magnéticamente (2,5 g) que contiene metanol (0,3 g añadidos en tres porciones con una hora de diferencia durante 4 horas).

La conversión (en %) del aceite en ésteres metílicos de ácidos grasos para las diferentes lipasas inmovilizadas sobre diversas matrices, mediante el uso del mismo lote de biocatalizador pero cambiando el medio de reacción después de 4 horas, se muestra en las Figuras 5 - 8. Las lipasas inmovilizadas sobre un soporte hidrófobo (adsorbente) tal como Amberlite^R XAD 1600 mantuvieron su actividad de transesterificación en usos repetidos durante un número mucho mayor de lotes en comparación con otras enzimas similares inmovilizadas, sin embargo, en otros tipos de soportes. También puede observarse claramente que para este tipo de reacción, que todas las lipasas inmovilizadas sobre soportes hidrófilos mostraron una baja actividad de transesterificación, así como un bajo
20 uso repetido en lotes consecutivos. Se ha apreciado que las lipasas inmovilizadas sobre soportes hidrófilos como Amberlite^R XAD761 y Amberlite^R IRA-958 formaron agregados de biocatalizadores saturados con el producto hidrófilo formado en la reacción, a saber, glicerol. Debido a la acumulación del producto formado, y también debido a la elevada concentración de metanol en las proximidades de la enzima inmovilizada, los biocatalizadores mostraron una baja actividad, así como un bajo número de usos repetidos.

30 Por el contrario, las lipasas, especialmente las lipasas de *Thermomyces lanuginose* y *Pseudomonas cepacia*, inmovilizadas sobre soportes hidrófobos como Amberlite^R XAD 1600 y Amberlite^R XAD7HP, produjeron una actividad de transesterificación mayor y también mantuvieron su actividad de transesterificación en más de 50 ciclos repetidos mediante el uso del mismo lote de biocatalizador.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una enzima interfacial modificada inmovilizada sobre un soporte sólido hidrófobo, en la que la enzima es una lipasa, una esterasa o una fosfolipasa y en la que dicha enzima está recubierta con grupos lipídicos unidos covalentemente, estando así rodeada por un microentorno hidrófobo y protegida de la desactivación y/o de la agregación en presencia de agentes, sustratos y/o productos de reacción hidrófilos, en la que dicho recubrimiento con grupos lipídicos se consigue mediante la unión covalente de epóxidos lipídicos a los grupos funcionales de la superficie de la enzima a través de su grupo epoxi original.
- 10 2. La enzima interfacial modificada de la reivindicación 1, en la que dicho soporte es capaz de unir dicha enzima mediante adsorción o mediante la unión covalente a grupos funcionales, y es un soporte poroso basado en polímeros hidrófobos, en el que dicho soporte contiene grupos funcionales activos, siendo uno cualquiera de grupos epoxi, aldehído y grupos iónicos.
- 15 3. La enzima interfacial modificada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en la que dicho lípido está seleccionado de entre ácidos grasos, ésteres alquílicos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de azúcar, glucósidos alquílicos de cadena media y larga, fosfolípidos y derivados de polietilenglicol.
- 20 4. La enzima interfacial modificada de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho soporte es un soporte basado en un polímero hidrófobo seleccionado de entre el grupo que consiste en polímeros reticulados hidrófobos alifáticos y acrílicos, o polímeros reticulados hidrófobos aromáticos.
- 5 5. La enzima de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4, en la que dicha enzima deriva del grupo que consiste en *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus niueus*, *Mucor miehei*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium camembertii*, *Alcaligenes sp.*, *Burkholderia sp.*, *Thermomyces lanuginosa*, *Chromobacterium uiscosum*, semillas de papaya y pancreatina.
- 25 6. Un procedimiento para la preparación de una enzima interfacial modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, que comprende las etapas de:
- (a) proporcionar un sistema formado por una disolución tamponante acuosa y al menos un disolvente orgánico que contiene un epóxido lipídico;
- (b) mezclar dicha enzima interfacial con el sistema bisolvente proporcionado en la etapa (a);
- (c) añadir dicho soporte a la mezcla de la etapa (b) y mezclar;
- (d) aislar de la mezcla obtenida en la etapa (c) la enzima interfacial inmovilizada sobre dicho soporte.
- 30 7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que dicho soporte es un soporte basado en un polímero hidrófobo, y en el que dicho soporte puede contener opcionalmente grupos funcionales activos, tales como grupos epoxi o aldehído, o grupos iónicos.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 6 y 7, en el que dicho epóxido lipídico está seleccionado de entre ácidos grasos, ésteres metílicos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de azúcar, glucósidos alquílicos de cadena media y larga, fosfolípidos y derivados de polietilenglicol.
- 35 9. Un procedimiento de preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos (biodiésel) que comprenden la etapa de: la adición poco a poco de metanol a un aceite de una planta, de un animal, de un alga o de pescado, o a una mezcla de al menos dos de estos aceites que contiene una lipasa según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o preparada mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, y permitir que la reacción avance en unas condiciones adecuadas hasta que dichos triglicéridos de aceite se conviertan en ésteres metílicos de ácidos grasos.
- 40 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicho aceite vegetal es de semilla de soja, de canola, de colza, de oliva, aceite de palma, aceite de girasol, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de desecho de cocina o cualquier aceite de triglicérido derivado de fuentes vegetales no comestibles.

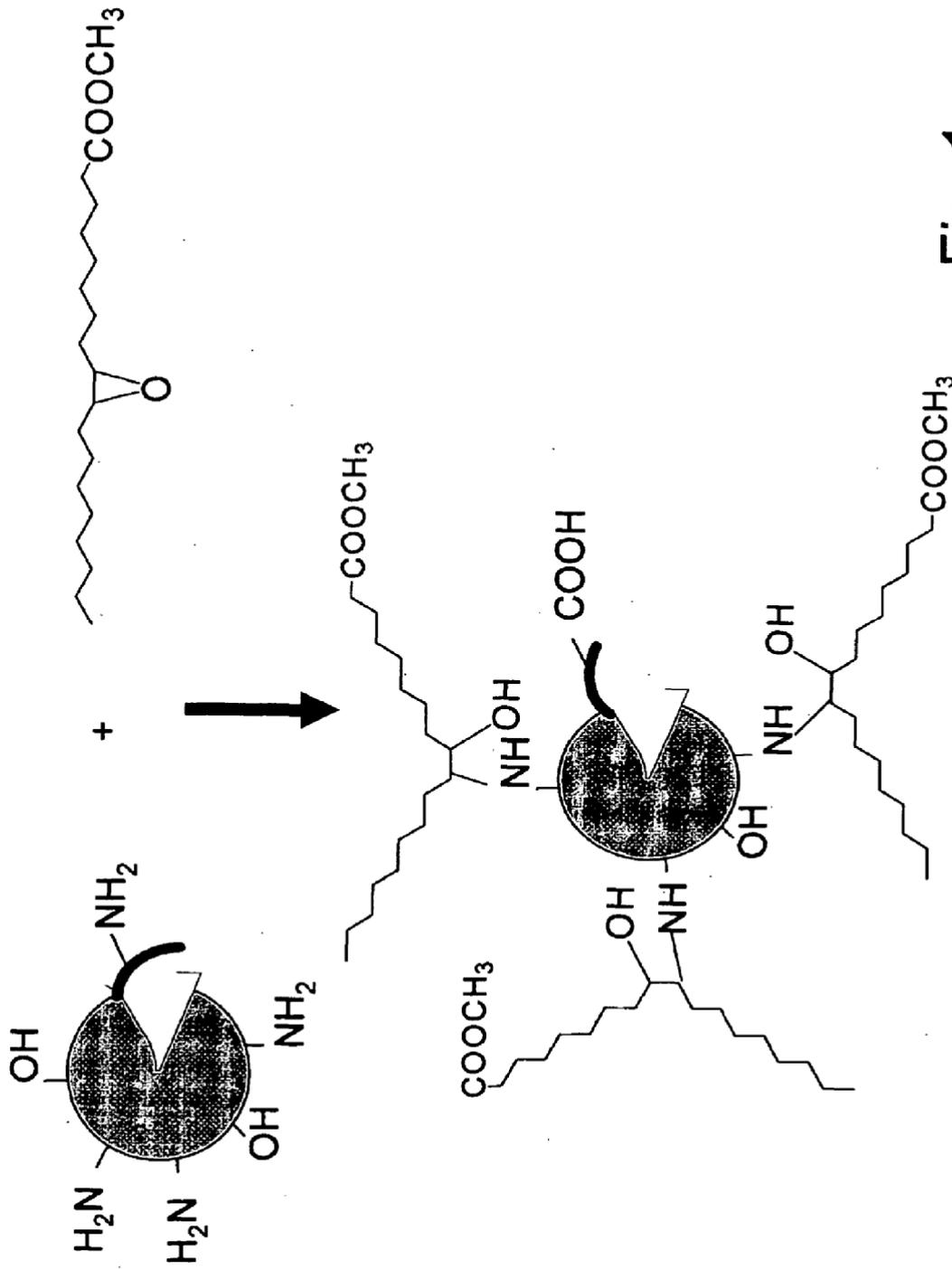


Fig. 1

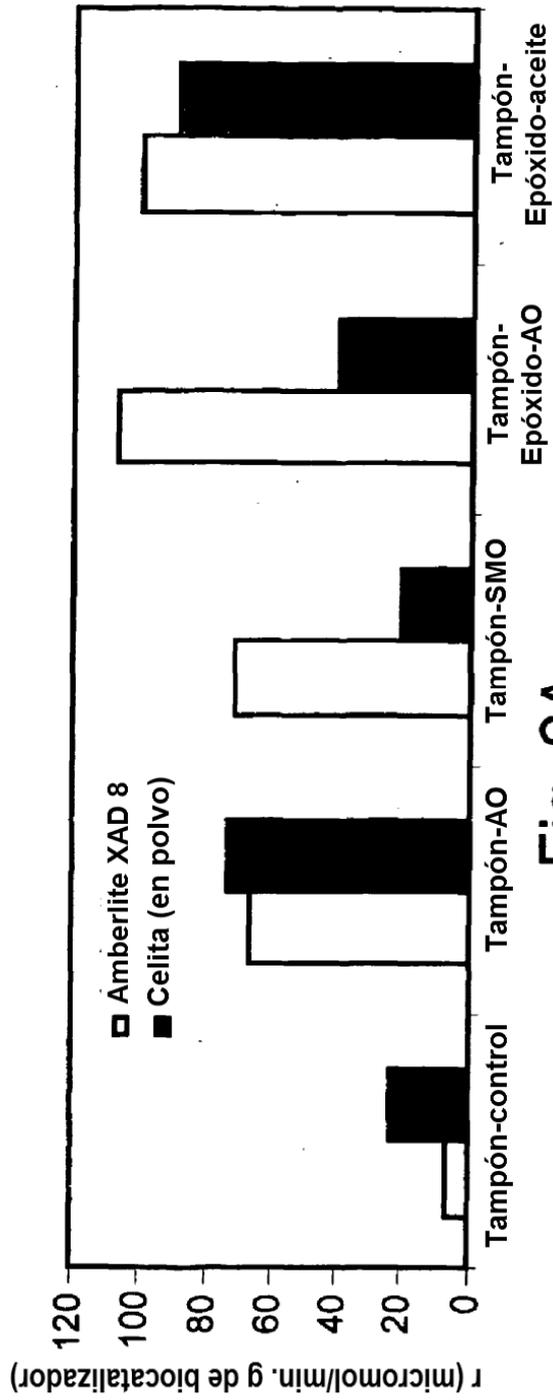


Fig. 2A

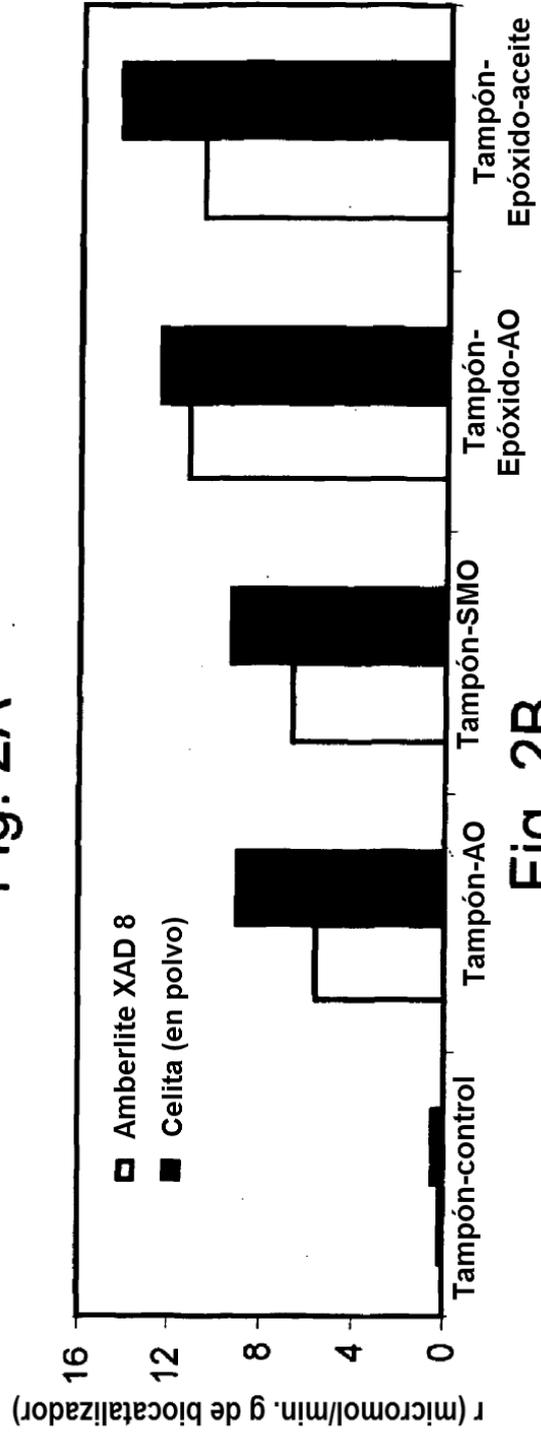


Fig. 2B

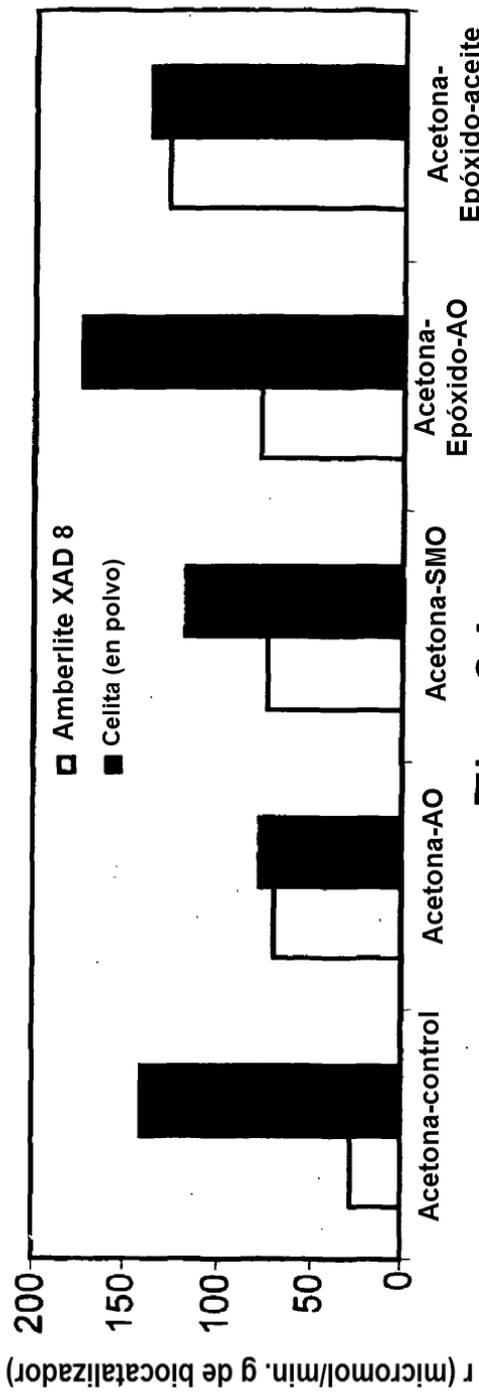


Fig. 3A

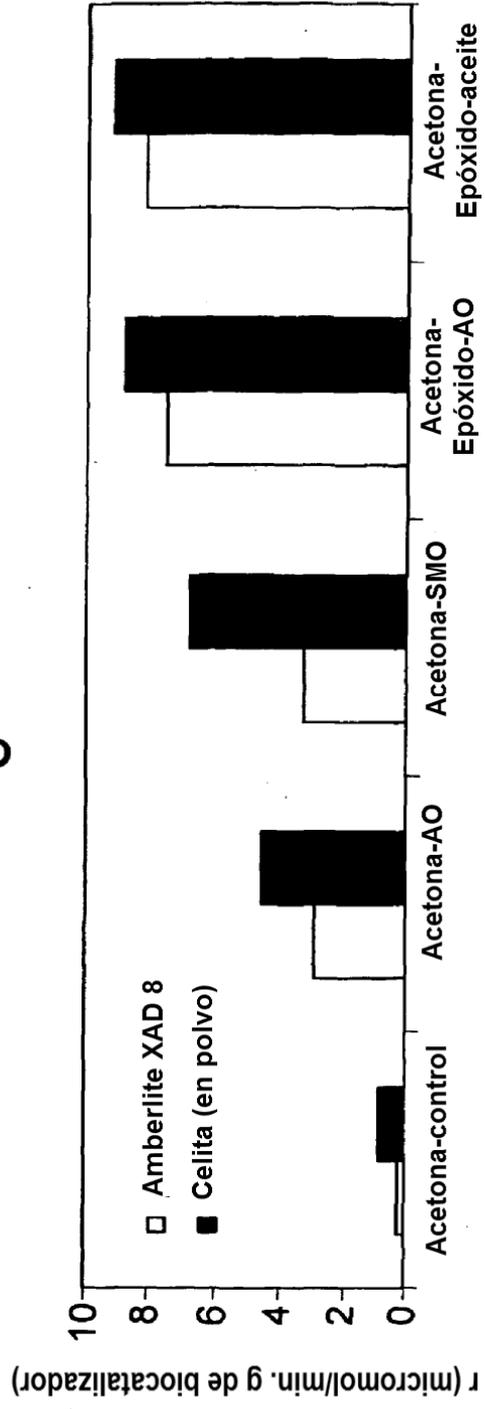


Fig. 3B

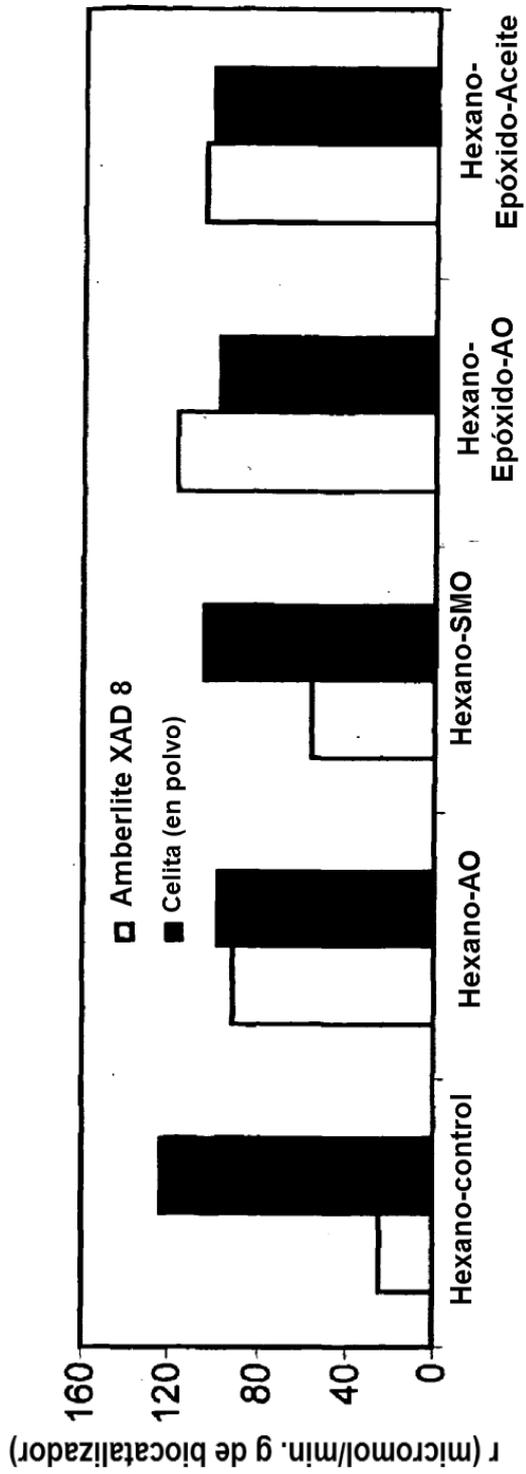


Fig. 4A

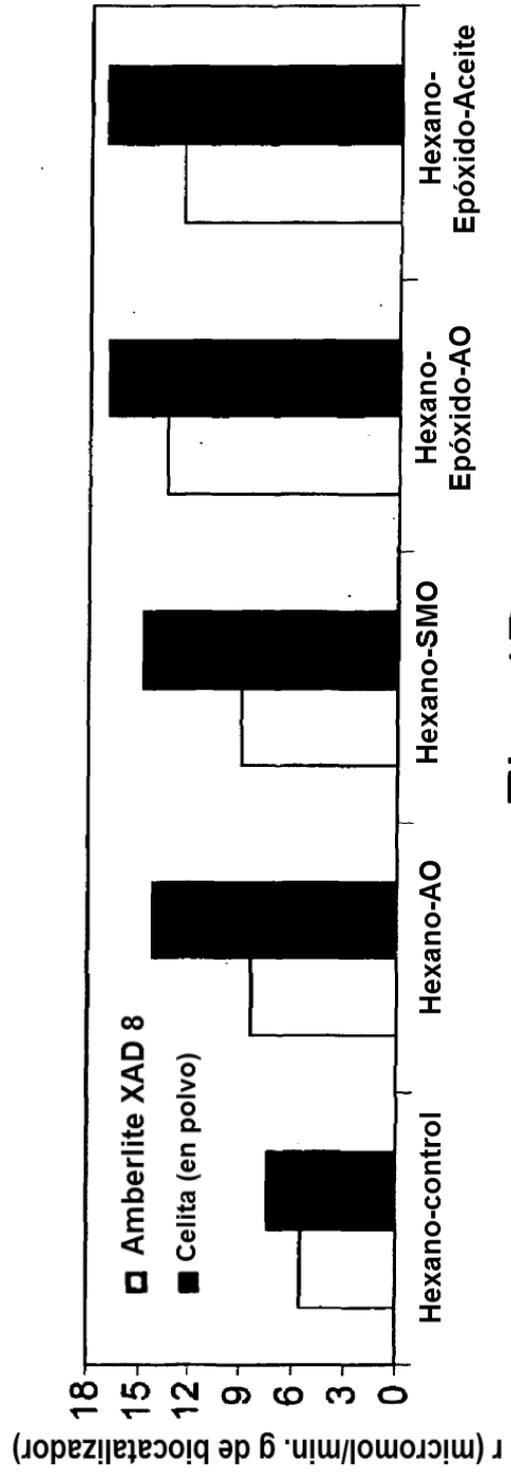


Fig. 4B

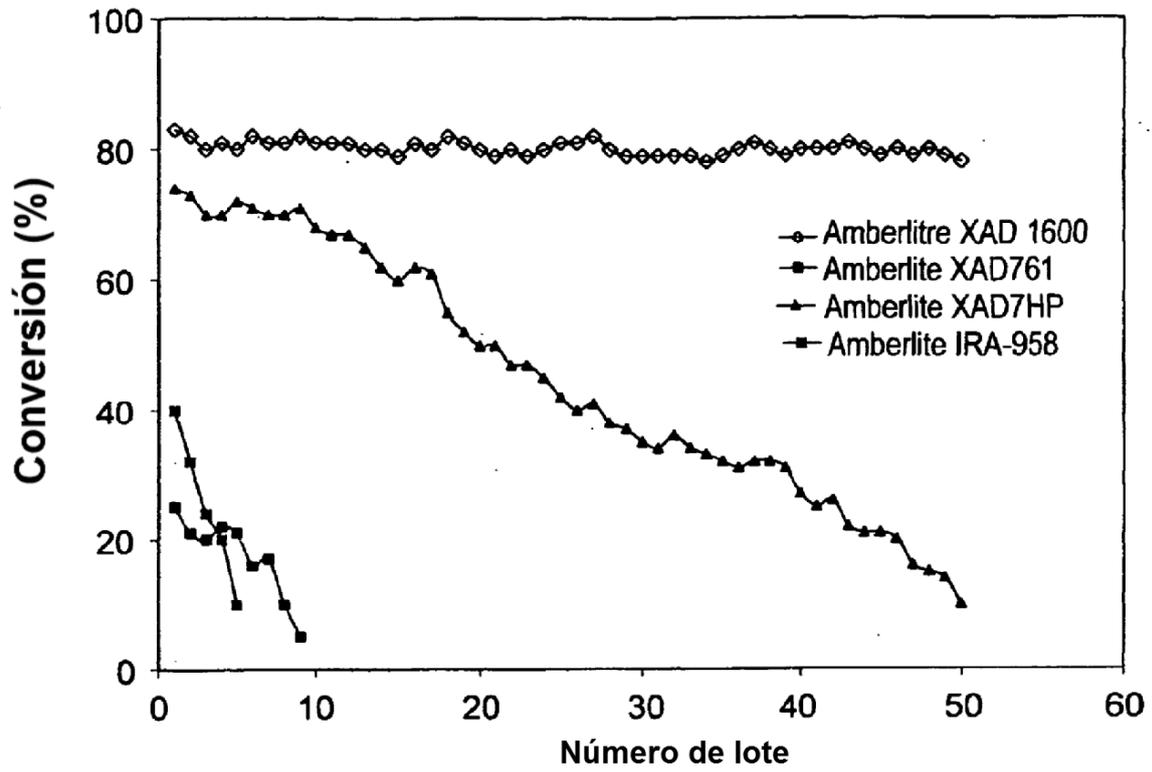


Fig. 5

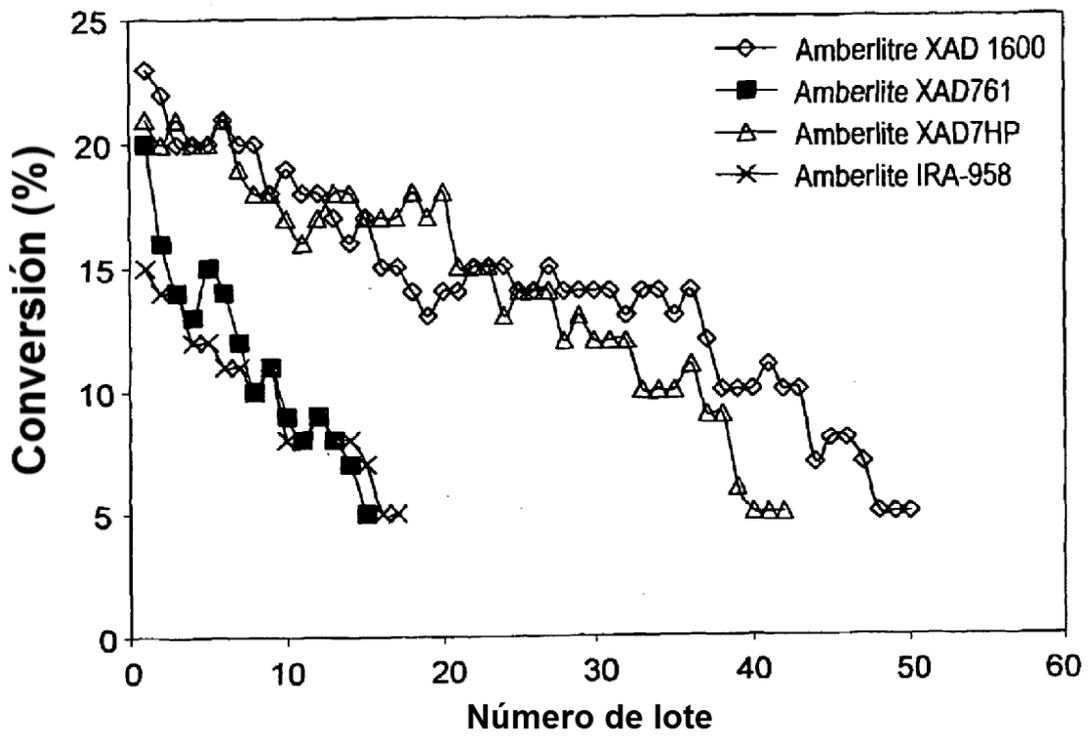


Fig. 6

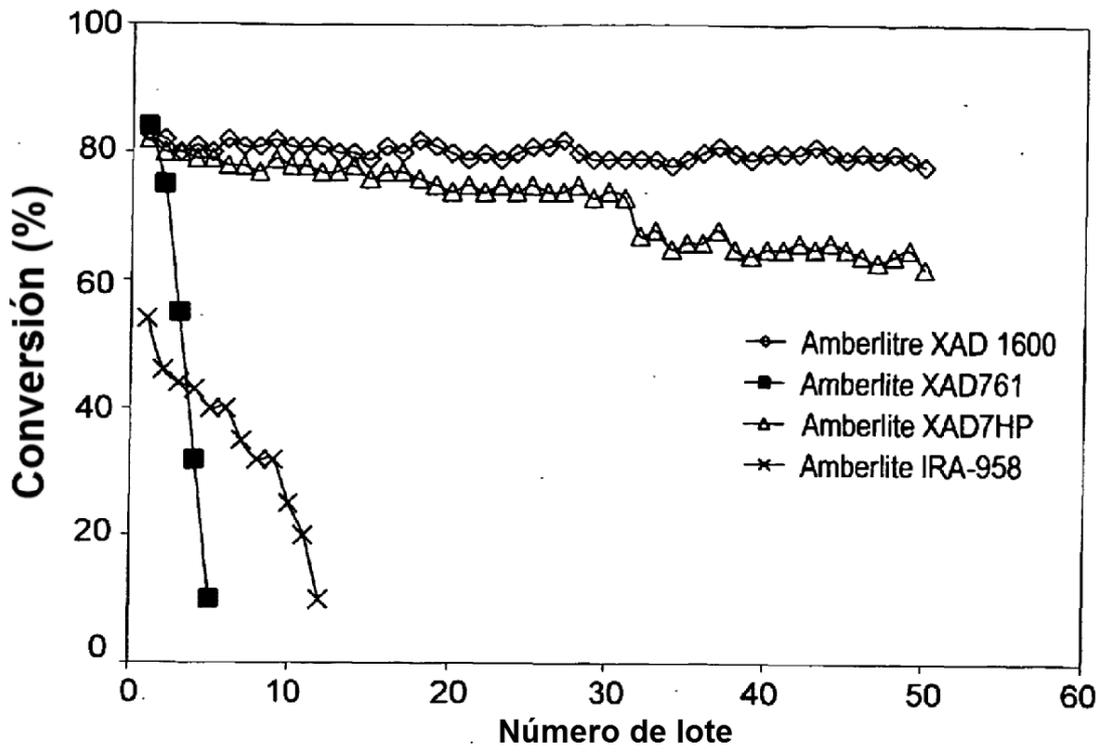


Fig. 7

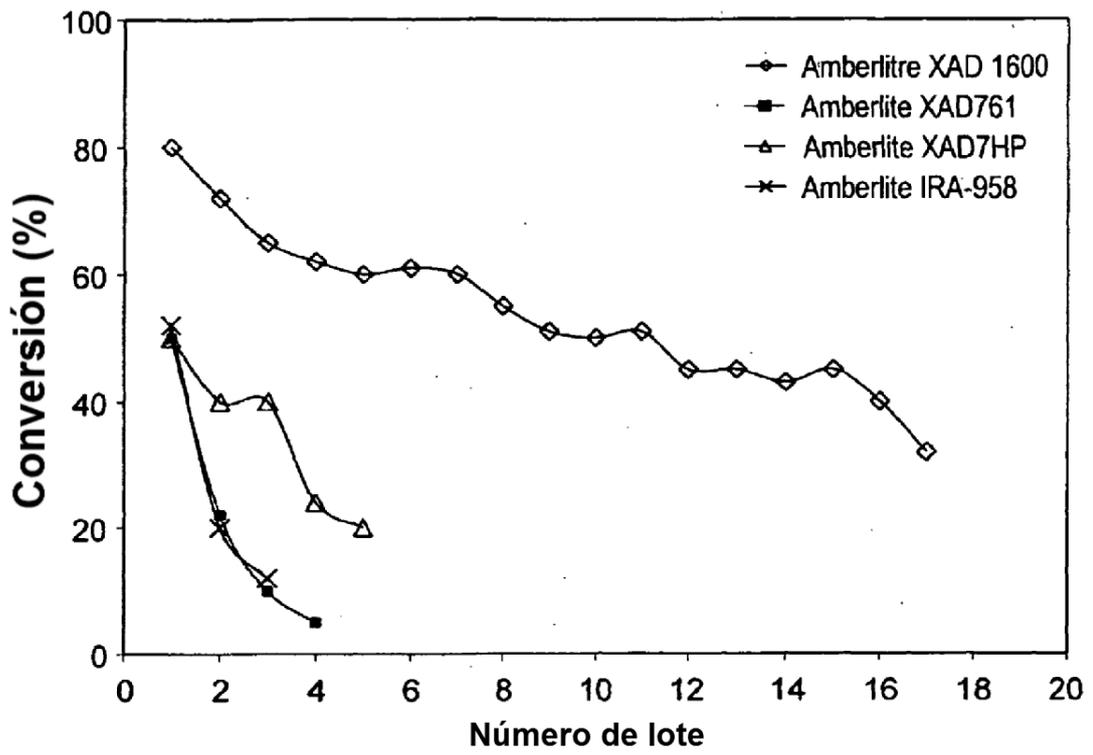


Fig. 8