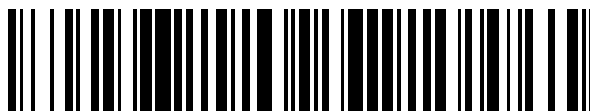


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 462 548**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)

C12M 1/40 (2006.01)

C11C 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2011** **E 11706030 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2014** **EP 2542685**

54 Título: **Un proceso para la síntesis enzimática de ésteres de alquilo de ácidos grasos**

30 Prioridad:

01.03.2010 US 309122 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.05.2014

73 Titular/es:

**TRANS BIO-DIESEL LTD. (100.0%)
Regional R&D Center, P.O. Box 437
20200 Shfaram, IL**

72 Inventor/es:

**BASHEER, SOBHI;
HAJ, MAISA;
MOHSEN, USAMA;
SHEHADEH, DOAA;
HINDAWI, AHMAD y
MASOUD, EMAD**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 462 548 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

Un proceso para la síntesis enzimática de ésteres de alquilo de ácidos grasos

5 Campo de la invención

Se desvela un proceso enzimático para la producción de ésteres de alquilo de ácidos grasos para uso en las industrias de biocombustibles, alimentos y detergentes. En este proceso, una fuente de ácidos grasos y un alcohol o
 10 dador de alcohol se hacen reaccionar en presencia de enzimas inmovilizadas en una resina hidrofóbica, en presencia de un tampón acuoso alcalino o agua. El proceso desvelado puede funcionar de forma discontinua o continua usando un tanque agitado continuo o reactores de columna de lecho empaquetado.

Antecedentes de la invención

15 La inmovilización de enzimas se ha descrito mediante un gran número de técnicas que básicamente tienen como objetivo reducir la contribución de las enzimas al coste en el proceso enzimático global; facilitar la recuperación de enzimas de los productos; y permitir el funcionamiento continuo del proceso.

En general, las técnicas de inmovilización se dividen de acuerdo con lo siguiente:

- 20
1. Adsorción física de enzimas a soportes sólidos, tales como sílice y polímeros insolubles.
 2. Adsorción sobre resinas de intercambio iónico.
 3. Unión covalente de enzimas a un material de soporte sólido, tal como soportes inorgánicos o poliméricos epoxidados.
 - 25 4. Inmovilización de enzimas en un polímero en crecimiento.
 5. Confinamiento de enzimas en un reactor de membrana o en geles semipermeables.
 6. Reticulación de cristales (CLECS) o agregados (CLEAS) de enzimas.

30 Todos los procedimientos de inmovilización de enzimas que se han mencionado anteriormente comprenden las siguientes etapas:

1. Disolver la enzima en un sistema tampón apropiado con respecto al pH, temperatura, tipo de sales tampón y fuerza iónica.
- 35 2. Añadir el soporte sólido en la solución de enzimas y mezclar durante algún tiempo hasta que las moléculas de enzimas se inmovilicen sobre el soporte sólido.
3. Separar por filtración el soporte sólido que contiene la enzima inmovilizada.
4. Lavar el soporte con un tampón apropiado para eliminar las moléculas de enzimas unidas de forma laxa y a continuación secar el soporte sólido.

40 Las enzimas interfaciales, en su mayoría lipasas, se han inmovilizado siguiendo las técnicas que se han mencionado anteriormente. Estas preparaciones de enzimas inmovilizadas ofrecidas poseen una baja actividad sintética y/o tiempo de vida media de funcionamiento corto. En un intento para aumentar la actividad sintética y la estabilidad de las lipasas inmovilizadas y otras enzimas interfaciales, se han aplicado diferentes métodos de activación. Estos métodos incluyen:

- 45
1. Unir los grupos funcionales de la superficie de las enzimas con restos hidrofóbicos tales como ácidos grasos o polietilenglicol.
 2. Revestir la superficie de las enzimas con agentes tensioactivos, tales como ésteres de ácidos grasos de poliol.
 - 50 3. Poner en contacto las enzimas con soportes hidrófobos, por lo general de polipropileno, que se han tratado previamente con disolventes hidrofílicos, tales como etanol o iso-propanol.

Ninguno de los métodos mencionados anteriormente proporcionó resultados satisfactorios con respecto a la estabilización y a la eficacia del coste de las enzimas interfaciales inmovilizadas, para realizar conversiones inversas enzimáticas en cantidades industriales. Además, se ha informado de que la mayoría de las enzimas, cuando se
 55 inmovilizan de acuerdo con los procedimientos que se han mencionado anteriormente, pierden una parte significativa de su actividad sintética o no presentan su producción de actividad completa debido a determinadas restricciones impuestas por el procedimiento de inmovilización, o debido a la presencia de determinados inhibidores de la enzima en el medio de reacción.

60 Otro inconveniente principal de lipasas y fosfolipasas es su baja tolerancia a los sustratos hidrofílicos, en particular alcoholes de cadena corta y ácidos grasos de cadena corta (por debajo de C4). En muchos estudios de investigación se ha observado que alcoholes de cadena corta y ácidos grasos de cadena corta, tales como metanol y ácido acético, respectivamente, son responsables de la separación de las moléculas de agua esenciales de la estructura cuaternaria de esas enzimas, lo que lleva a su desnaturalización y, en consecuencia, a la pérdida de su
 65 actividad catalítica. Este inconveniente ha excluido la aplicación de lipasas para la producción de cantidades

comerciales de "biodiesel" de ésteres de metilo de ácidos grasos que usan triglicéridos de aceite y metanol como sustratos.

Un inconveniente adicional del uso de lipasas inmovilizadas para la transesterificación/esterificación de una fuente de ácidos grasos con un alcohol libre es la acumulación de los productos secundarios de glicerol y agua formados en el biocatalizador y por lo tanto la exclusión de los sustratos al libre acceso al sitio activo de la enzima inmovilizada. Dichos biocatalizadores generalmente pierden su rendimiento catalítico después de unos pocos ciclos cuando se usa el mismo lote de biocatalizador.

Los presentes inventores han desarrollado preparaciones especiales de enzimas inmovilizadas, que presentan buena estabilidad a lo largo de muchos ciclos de producción, con actividad persistente. Ejemplos de dichas preparaciones de enzimas se desvelan, entre otros, en el documento WO/2008/084470, el documento WO/2008/139455 y el documento WO2009/069116.

Las condiciones en las que se realiza la reacción catalítica, pueden afectar de forma adversa a la estabilidad y a la eficacia de las preparaciones de enzimas inmovilizadas. Es importante tener preparaciones de enzimas que mantengan la estabilidad y la actividad en las condiciones de reacción.

Estos y otros objetivos de la invención serán evidentes a medida que la descripción avanza.

Sumario de la Invención

En una realización, la invención se refiere a un proceso para la transesterificación/esterificación de una fuente de ácidos grasos con un alcohol, para formar ésteres de alquilo de ácidos grasos, que comprende hacer reaccionar una fuente de ácidos grasos y un alcohol o un dador de alcohol en presencia de una preparación de lipasa inmovilizada, en el que la preparación de lipasa inmovilizada comprende al menos una lipasa inmovilizada sobre un soporte poroso hidrofóbico y el medio de reacción contiene una solución tampón alcalina acuosa.

La solución tampón alcalina acuosa mencionada puede ser una solución tampón alcalina acuosa moderada. La solución tampón alcalina acuosa mencionada puede estar contenida en la mezcla de reacción en una cantidad de hasta un 5 % en peso de la fuente de ácidos grasos. La solución tampón acuosa puede tener un pH de 7 a aproximadamente 11, por ejemplo, uno cualquiera de 7-8,5, 7-9, 7-9,5, 7-10 y 7-11. El pKa del reactivo alcalino moderado complementado que forma la solución tampón es mayor o igual que el pKa de los ácidos que forman la fuente de ácidos grasos

En otra realización, la invención se refiere a un proceso para la transesterificación/esterificación de una fuente de ácidos grasos con un alcohol, para formar ésteres de alquilo de ácidos grasos, que comprende hacer reaccionar una fuente de ácidos grasos y un alcohol en presencia de una preparación de lipasa inmovilizada, en el que la preparación de lipasa inmovilizada comprende al menos una lipasa inmovilizada sobre un soporte poroso hidrofóbico y el medio de reacción contiene agua. El agua está en forma de una solución acuosa con un pH de 3 a 11. El medio de reacción puede contener el agua o la solución acuosa a un 5 % en peso de la fuente de ácidos grasos.

En todas las realizaciones y aspectos de la invención, el alcohol puede ser un alcohol de cadena corta, por ejemplo, alcohol de alquilo C₁-C₆, más específicamente alcohol de alquilo C₁-C₄, particularmente metanol o etanol. Cuando dicho alcohol es metanol, dichos ésteres de ácidos grasos resultantes son ésteres de metilo de ácidos grasos (FAME - Biodiesel). El alcohol también puede ser un alcohol graso de cadena media (C₆-C₁₀) o alcoholes grasos de cadena larga (C₁₂-C₂₂). El dador de alcohol puede ser un éster de monoalquilo o un carbonato de dialquilo, tal como carbonato de dimetilo o carbonato de dietilo

En todas las realizaciones y aspectos de la invención, dicha lipasa inmovilizada es capaz de catalizar la esterificación de ácidos grasos libres para producir ésteres de alquilo de ácidos grasos y agua como producto secundario, y la transesterificación de triglicéridos y glicéridos parciales para producir ésteres de alquilo de ácidos grasos y glicerol como producto secundario.

En todas las realizaciones y aspectos de la invención relacionados con el uso de un tampón alcalino o solución alcalina, la cantidad de dicho tampón o solución alcalinos en el medio de reacción es de un 0,001 a un 5 % en peso de la fuente de ácidos grasos.

En todas las realizaciones y aspectos de la invención, dicha al menos una lipasa puede ser una lipasa derivada de uno cualquiera de *Rhizomucor miehei*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus niveus*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium camembertii*, *Alcaligenes sp.*, *Acromobacter sp.*, *Burkholderia sp.*, *Thermomyces lanuginosa*, *Chromobacterium viscosum*, *Candida antarctica B*, *Candida rugosa*, *Candida antarctica A*, semillas de papaya y pancreatina. La preparación de lipasa puede comprender al menos dos lipasas que se pueden inmovilizar cada una por separado sobre un soporte hidrofóbico o se pueden coinmovilizar sobre el mismo soporte hidrofóbico. Las lipasas mencionadas pueden poseer regioespecificidad idéntica o diferente. Las lipasas mencionadas son capaces catalizar de forma simultánea o consecutiva la esterificación de ácidos grasos libres para producir ésteres

de alquilo de ácidos grasos y agua como producto secundario, y la transesterificación de triglicéridos y glicéridos parciales para producir ésteres de alquilo de ácidos grasos y glicerol como producto secundario.

En todas las realizaciones y aspectos de la invención, dicho soporte puede ser uno cualquiera de soporte hidrofóbico a base de polímero alifático y soporte hidrofóbico a base de polímero aromático. El soporte de polímero hidrofóbico mencionado puede estar formado por cadenas orgánicas lineales o ramificadas. El soporte mencionado puede comprender cadenas macrorreticulares de polímero o copolímero orgánico. El soporte mencionado puede ser soporte inorgánico poroso o no poroso, que puede ser hidrofóbico o está revestido con material orgánico hidrofóbico. El material orgánico mencionado puede ser una cadena orgánica hidrofóbica lineal, ramificada, o funcionalizada.

En todas las realizaciones y aspectos de la invención en las que se usa una solución tampón alcalina, dicha solución tampón alcalina acuosa puede ser una solución de una sal alcalina inorgánica o una base orgánica. La solución tampón alcalina mencionada puede ser una solución de uno cualquiera de un hidróxido, carbonato, bicarbonato, fosfato, sulfato, acetato y citrato de metal alcalino, una amina primaria, secundaria y terciaria, y cualquier mezcla de los mismos. En realizaciones específicas, la solución tampón alcalina puede ser una solución de una base débil seleccionada entre bicarbonatos y carbonatos de sodio o de potasio. En algunas realizaciones específicas del proceso de la invención, la solución tampón alcalina mencionada se puede añadir a dicha fuente de ácidos grasos en una etapa de mezcla previa o directamente al medio de reacción.

En todas las realizaciones y aspectos de la invención en las que se usa una solución tampón alcalina, el contenido de dicha solución tampón alcalina en el medio de reacción de transesterificación/esterificación puede estar en el intervalo de un 0,001-5 % en peso de la materia prima de aceite, por ejemplo un 1-2 % en peso de la materia prima de aceite.

En algunas realizaciones de la invención, la fuente de ácidos grasos se puede mezclar primero con la solución tampón alcalina o con el agua o la solución acuosa, y la mezcla se puede tratar a continuación con dicha preparación de lipasa inmovilizada, seguido de la adición de dicho alcohol y permitiendo que la reacción evolucione en condiciones adecuadas hasta que dicha fuente de ácidos grasos se convierta en ésteres de ácidos grasos.

En todas las realizaciones y aspectos de la invención, dicha fuente de ácidos grasos puede ser una cualquiera de aceite vegetal, grasa animal, aceite de algas, aceite de pescado, aceite usado y cualquier mezcla de los mismos. La fuente de ácidos grasos mencionada puede comprender ácidos grasos libres, mono-, di- o triglicéridos, sus mezclas en cualquier proporción, en ausencia o en presencia de otros derivados de ácidos grasos secundarios tales como fosfolípidos y ésteres de esteroles. La fuente de ácidos grasos puede estar sin refinar, refinada, blanqueada, desodorizada o cualquiera de sus combinaciones.

En todas las realizaciones y aspectos de la invención, la reacción se puede realizar a una temperatura entre 10 °C y 100 °C, específicamente entre 25-30 °C.

En todas las realizaciones y aspectos de la invención, la fuente de ácidos grasos mencionada se puede mezclar previamente con dicho alcohol o dador de alcohol y con dicha agua o solución tampón mencionadas en un recipiente de preparación de la reacción previa para formar una emulsión que a continuación se puede alimentar junto con dicha preparación de lipasa inmovilizada en un recipiente de reacción de transesterificación/esterificación.

En todas las realizaciones y aspectos de la invención, dicha lipasa inmovilizada se puede usar en reactores de columna de lecho empacado que funcionan en modos discontinuo o continuo.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un sistema para la transesterificación/esterificación de un ácido graso con un alcohol, para formar ésteres de alquilo de ácidos grasos, que comprende:

un envase de reacción configurado para que reaccione en un medio de reacción que incluye un ácido graso y al menos uno de un alcohol y un dador de alcohol en presencia de una preparación de lipasa inmovilizada, en el que la preparación de lipasa inmovilizada comprende al menos una lipasa inmovilizada sobre un soporte poroso hidrofóbico y el medio de reacción contiene al menos una de una solución tampón alcalina acuosa y agua.

El sistema puede comprender una o más de las siguientes características, en cualquier combinación o permutación deseada:

A. El recipiente de reacción puede comprender la preparación de lipasa inmovilizada, al menos durante el funcionamiento de dicho sistema para la producción de dichos ésteres de alquilo de ácidos grasos.

B. Además o como alternativa a la característica A, el recipiente de reacción puede comprender el ácido graso y el al menos uno de un alcohol y un dador de alcohol, al menos durante el funcionamiento de dicho sistema para la producción de dichos ésteres de alquilo de ácidos grasos.

C. Además o como alternativa a las características A o B, dicho medio de reacción comprende una mezcla, dicho sistema comprende adicionalmente un recipiente de reacción previa en comunicación fluida selectiva con dicho recipiente de reacción, estando dicho recipiente de reacción previa configurado para la mezcla previa de al

menos el ácido graso y del al menos uno de un alcohol y un dador de alcohol para que forme dicha mezcla, para que suministre de forma selectiva dicha mezcla a dicho recipiente de reacción al menos durante el funcionamiento de dicho sistema para la producción de dichos ésteres de alquilo de ácidos grasos. El sistema puede comprender además opcionalmente una fuente de ácidos grasos en comunicación fluida selectiva con dicho recipiente de reacción previa y configurado para que suministre de forma selectiva el ácido graso a dicho recipiente de reacción previa, al menos durante dicho funcionamiento de dicho sistema, y una fuente de alcohol en comunicación fluida selectiva con dicho recipiente de reacción previa y configurado para que suministre de forma selectiva el al menos uno de un alcohol y un dador de alcohol a dicho recipiente de reacción previa al menos durante dicho funcionamiento de dicho sistema. El sistema puede comprender además opcionalmente una fuente de tampón en comunicación fluida selectiva con dicho recipiente de reacción previa y configurado para que suministre de forma selectiva la al menos una de una solución de tampón alcalina acuosa y agua a dicho recipiente de reacción previa para que se incluya en dicha mezcla al menos durante dicho funcionamiento de dicho sistema.

D. Además o como alternativa a las características A a C, el sistema se puede configurar para que suministre de forma selectiva uno o más del ácido graso y/o el al menos uno de un alcohol y un dador de alcohol y/o la al menos una de una solución tampón alcalina acuosa y agua a dicho recipiente de reacción previa, cada uno de manera continua o en lotes discontinuos, al menos durante dicho funcionamiento de dicho sistema.

E. Además o como alternativa a las características A a D, el recipiente de reacción previa se puede configurar para que suministre de forma selectiva dicha mezcla a dicho recipiente de reacción de una manera continua y/o en lotes discontinuos al menos durante dicho funcionamiento de dicho sistema.

F. Además o como alternativa a las características A a E, el sistema se puede configurar para que suministre de forma selectiva y directamente a dicho recipiente de reacción al menos uno del ácido graso; el al menos uno de un alcohol y un dador de alcohol; y la al menos una de una solución tampón alcalina acuosa y agua.

G. Además o como alternativa a las características A a F, el recipiente de reacción puede comprender un sistema de regulación térmica configurado para que mantenga el medio de reacción en dicho recipiente de reacción dentro de un intervalo de temperatura seleccionado.

H. Además o como alternativa a las características A a G, el sistema puede comprender además opcionalmente una disposición de retención configurada para que retenga la preparación de lipasa inmovilizada dentro de dicho recipiente de reacción al menos durante el funcionamiento de dicho sistema.

I. Además o como alternativa a las características A a H, el sistema comprende además un recipiente de separación del producto en una comunicación fluida selectiva con dicho recipiente de reacción, estando dicho sistema configurado para que suministre de forma selectiva una mezcla de reacción que incluye productos de reacción desde dicho recipiente de reacción a dicho recipiente de separación del producto, y en el que dicho recipiente de separación del producto está configurado para que separe de forma selectiva una producción de los ésteres de alquilo de ácidos grasos de la mezcla de reacción suministrada al mismo. Por ejemplo, el recipiente de separación del producto puede ser uno de una centrífuga y un sistema de separación por gravedad.

J. Además o como alternativa a las características A a I, el recipiente de reacción se configura para que suministre de forma selectiva dicha mezcla de reacción a dicho recipiente de separación del producto de una manera continua y/o en lotes discontinuos al menos durante dicho funcionamiento de dicho sistema.

K. Además o como alternativa a las características I a J, el sistema se configura para que suministre de forma selectiva dicha producción de ésteres de alquilo de ácidos grasos a partir de dicho recipiente de separación del producto. Por ejemplo, el sistema se configura para que suministre de forma selectiva dicha producción de ésteres de alquilo de ácidos grasos desde dicho recipiente de separación del producto de una manera continua y/o en lotes discontinuos.

L. Además o como alternativa a las características A a K, el sistema se configura para que aumente dicha producción de los ésteres de alquilo de ácidos grasos de la mezcla de reacción suministrada a dicho recipiente de separación del producto. En una configuración del sistema que tiene esta característica, el sistema se configura para que desvíe de forma selectiva dicha producción de los ésteres de alquilo de ácidos grasos a dicho recipiente de reacción para que aumente adicionalmente dicha producción de los ésteres de alquilo de ácidos grasos de la mezcla de reacción suministrada posteriormente a dicho recipiente de separación del producto. En otra configuración del sistema que tiene esta característica, el sistema se configura para que desvíe de forma selectiva dicha producción de los ésteres de alquilo de ácidos grasos a un módulo de reactor auxiliar, en el que dicho módulo de reactor auxiliar comprende un recipiente del reactor auxiliar y un recipiente de separación del producto auxiliar, en el que dicha mayor producción adicional de los ésteres de alquilo de ácidos grasos se suministra posteriormente de forma selectiva a través de dicho recipiente de separación del producto auxiliar.

Breve Descripción de las Figuras

Con el fin de entender la invención y de observar cómo se puede realizar en la práctica, a continuación se describirán realizaciones, solamente a modo de ejemplo no limitante, con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

Figura 1: La actividad de transesterificación de lipasa de *Thermomyces lanuginosa* (TL) inmovilizada sobre Amberlite XAD 1600 (Amb. XAD 1600) como una resina hidrofóbica sobre Duolite D568 (Duo D568) como una resina hidrofílica, y lipasa de *Pseudomonas sp.* (PS) inmovilizada sobre Sepabeads SP70 (SB SP70) como una resina hidrofóbica y sobre sílice porosa (Sil.) como una resina hidrofílica.

Abreviaturas: Conv. - conversión; Cic. – Ciclo.

Figura 2: La conversión de aceite de semillas de soja en biodiesel y glicerol después de 6 horas de reacción a diferentes niveles de solución 0,1 M de bicarbonato sódico usando el mismo lote de biocatalizador en experimentos con múltiples lotes. El biocatalizador fue lipasa derivada de *Thermomyces lanuginosa* inmovilizada sobre una resina hidrofóbica y porosa a base de poliestireno-divinilbenceno.

Abreviaturas: Conv. - conversión; Cic. – ciclo.

Figura 3: La conversión de aceite de semillas de soja en biodiesel y glicerol después de 6 horas de reacción a diferentes niveles de solución 0,1 M de bicarbonato sódico usando el mismo lote de biocatalizador en experimentos con múltiples lotes. El biocatalizador fue lipasa derivada de *Pseudomonas sp.* inmovilizada sobre una resina hidrofóbica y porosa a base de poliestireno-divinilbenceno.

Abreviaturas: Conv. - conversión; Cic. – ciclo.

Figura 4: La conversión de aceite de semillas de soja en biodiesel y glicerol después de 6 horas de reacción sin agua y a diferentes niveles de agua usando el mismo lote de biocatalizador en experimentos con múltiples lotes. El biocatalizador fue lipasa derivada de *Thermomyces lanuginosa* inmovilizada sobre una resina hidrofóbica y porosa a base de poliestireno-divinilbenceno.

Abreviaturas: Conv. - conversión; Cic. - ciclo; AD - agua destilada.

Figura 5: La conversión de aceite de semillas de soja en biodiesel y glicerol después de 6 horas de reacción a diferentes niveles de agua usando el mismo lote de biocatalizador en experimentos con múltiples lotes. El biocatalizador fue lipasa derivada de *Pseudomonas sp.* inmovilizada sobre una resina hidrofóbica y porosa a base de poliestireno-divinilbenceno.

Abreviaturas: Conv. - conversión; Cic. - ciclo; AD - agua destilada.

Figura 6: La conversión de una mezcla de FFA y aceite de semillas de soja en biodiesel, y productos secundarios de glicerol y agua después de 4 horas de esterificación/transesterificación a diferentes niveles de solución 0,1 M de bicarbonato sódico usando el mismo lote de biocatalizador en experimentos con múltiples lotes. El biocatalizador fue lipasa derivada de *Pseudomonas sp.* inmovilizada sobre una resina hidrofóbica y porosa a base de poliestireno-divinilbenceno.

Abreviaturas: Conv. - conversión; Cic. - ciclo; AD - agua destilada.

Figura 7: La esterificación de hidrolizado de aceite de semillas de soja en biodiesel y agua después de 4 horas de reacción en presencia de solución 0,1 M de bicarbonato sódico al 2 % usando el mismo lote de biocatalizador en experimentos con múltiples lotes. El biocatalizador fue lipasa derivada de *Pseudomonas sp.* inmovilizada sobre una resina hidrofóbica y porosa a base de poliestireno-divinilbenceno.

Abreviaturas: Ac. Val. - valor ácido; Cic. – ciclo.

Figura 8: La transesterificación de aceite de pescado con etanol después de 6 horas de reacción en presencia de solución 0,1 M de bicarbonato sódico al 1 % en peso usando el mismo lote de biocatalizador en experimentos con múltiples lotes. Los biocatalizadores fueron lipasas derivadas de *Thermomyces lanuginosa* (Lip. De TL) y de *Pseudomonas sp.* (Lip. de PS) inmovilizadas sobre Amberlite XAD 1600.

Abreviaturas: Conv. - conversión; Cic. – ciclo.

Figura 9: La transesterificación de grasa de Sebo con etanol después de 6 horas de reacción en presencia de solución 0,1 M de bicarbonato sódico al 2 % en peso usando el mismo lote de biocatalizador en experimentos con múltiples lotes. Los biocatalizadores fueron lipasas de *Thermomyces lanuginosa*, *Pseudomonas sp.* (Lip. de PS; Lip. De TL) inmovilizadas sobre Amberlite XAD 1600.

Abreviaturas: Conv. - conversión; Cic. – ciclo.

Figura 10: El tratamiento del medio de reacción de transesterificación/esterificación obtenido después de 4 horas que contiene un valor de FFA de 7 mg de KOH/1 g usando *Pseudomonas sp.* o *Thermomyces lanuginosa* inmovilizadas sobre resinas porosas hidrofóbicas con *Candida Antarctica* inmovilizada sobre una resina porosa hidrofóbica.

Abreviaturas: Ac. Val. - valor ácido; Cic. – ciclo

La Fig. 11: ilustra esquemáticamente una primera realización de un sistema para la producción de ésteres de alquilo de ácidos grasos de acuerdo con un aspecto de la invención.

La Fig. 12 ilustra esquemáticamente una segunda realización de un sistema para la producción de ésteres de alquilo de ácidos grasos de acuerdo con un aspecto de la invención.

Descripción detallada de la invención

En búsqueda de la mejora de procesos industriales catalizados enzimáticamente, en particular procesos para la transesterificación/esterificación de una fuente de ácidos grasos con un alcohol en presencia de lipasa o lipasas inmovilizadas, los presentes inventores han desarrollado condiciones específicas en las que la estabilidad de la lipasa o lipasas inmovilizadas se conserva durante las puntuaciones de los ciclos de producción.

En una realización de la invención, la invención se refiere a un proceso para la preparación de ésteres de alquilo de ácidos grasos, específicamente ésteres de alquilo de cadena corta de ácidos grasos, tales como ésteres de metilo y etilo de ácidos grasos (biodiesel) en un sistema microacuoso alcalino sin disolventes. En realizaciones específicas, el sistema microacuoso alcalino es un sistema microacuoso alcalino moderado. El proceso comprende proporcionar una fuente de ácidos grasos y hacerla reaccionar con un alcohol libre o un dador de alcohol, en presencia de una preparación de lipasa inmovilizada, bajo dichas condiciones alcalinas o alcalinas moderadas. Sin quedar ligado a la teoría, el tratamiento previo de la fuente de ácidos grasos con una solución tampón alcalina daría como resultado ácidos neutralizantes que podrían tener un efecto inhibidor sobre la enzima. La cantidad de alcohol necesario para completar la reacción hasta una conversión de un 100 % se puede añadir por etapas o en una sola etapa. Además, el alcohol puede ser alcohol de cadena corta, por ejemplo metanol o etanol. Otros dadores de alcohol se pueden usar en la reacción con la fuente de ácidos grasos en presencia de una hidrolasa y permitiendo que la reacción evolucione en condiciones adecuadas, hasta que dicha fuente de ácidos grasos se convierta en ésteres de alquilo de ácidos grasos, específicamente, ésteres de metilo de ácidos grasos (FAME) o ésteres de etilo de ácidos grasos, en el que dicha preparación de hidrolasa comprende una o más lipasas, inmovilizadas por separado o conjuntamente sobre un soporte adecuado a base de polímero poroso hidrofóbico macrorreticular.

En una realización adicional, la reacción de transesterificación/esterificación entre la fuente de ácidos grasos y el alcohol o dador de alcohol se realiza en un microentorno acuoso, con la adición de agua a la mezcla de reacción. En realizaciones específicas, se puede añadir agua de un 0,0001 a un 5 % en peso de la fuente de ácidos grasos. Por agua, tal como se usa aquí, se refiere a agua pura o destilada, y también a "soluciones acuosas", que pueden ser, pero no se limitan a, agua corriente, agua de mar o agua de cualquier otro recurso o depósito natural de agua, agua desalinizada, agua purificada o tratada química o enzimáticamente, y cualquier otra solución acuosa. El pH del sistema de reacción o de la solución acuosa puede variar, y puede ser, por ejemplo, aproximadamente 3-11, por ejemplo, 4-10, 5-10, 5-9, 6-10, 6-9, o 7-9.

El proceso de la invención se puede realizar mientras se retira continuamente el glicerol formado y cualquier exceso de agua de la mezcla de reacción. La conversión de los grupos acilo de ácidos grasos o ácidos grasos libres, comprendidos en dicha fuente de ácidos grasos, en alquilo de ácidos grasos, específicamente ésteres de metilo se puede controlar en diversos puntos temporales durante la reacción. El medio de reacción se puede retirar por medios adecuados en cualquier punto temporal deseado durante la reacción, deteniendo de este modo la reacción, y los ésteres de metilo de ácidos grasos formados y opcionalmente el glicerol formado se aíslan del medio de reacción. La reacción se puede detener específicamente cuando la conversión de los grupos acilo de ácidos grasos o ácidos grasos libres comprendidos en dicha fuente de ácidos grasos en ésteres de metilo de ácidos grasos ha alcanzado al menos un 70 %, por ejemplo al menos un 85 %, o al menos un 90 %.

El sistema de reacción puede ser similar al que se describe en el documento WO2009/069116 en trámite junto con la presente. Por ejemplo, el sistema de producción puede usar un reactor de tanque agitado con un filtro de vidrio de fondo sinterizado o de acero inoxidable que retiene el biocatalizador en el reactor, sin embargo permite que el medio de reacción penetre a través del reactor. Dicha configuración de reactor permite que los productos secundarios, específicamente glicerol y agua, que se auto-desorben de la enzima inmovilizada, se hundan hasta la parte inferior del reactor, y penetren a través del filtro. El resultado es la retirada continua de glicerol formado desorbido y también del exceso de agua, fuera del medio de reacción, lo que conduce a la conversión de la reacción hacia la síntesis, alcanzando de este modo conversiones superiores a un 98 %. El biocatalizador usado en este reactor puede estar compuesto por un solo tipo o múltiples tipos de lipasas, considerando su especificidad posicional, así como su origen, tal como se describe en el presente documento. Como alternativa, se pueden usar dos reactores de tanque agitado consecutivos con un filtro en la parte inferior. Un tanque de sedimentación o de centrífuga se puede usar entre los dos reactores. El primer reactor puede contener un biocatalizador inmovilizado compuesto por un solo tipo o múltiples tipos de lipasas. El papel del tanque de sedimentación o de centrífuga entre ambos reactores es retirar el glicerol formado y el exceso de agua del medio de reacción, lo que conduce a un aumento en la conversión de las materias primas en sus correspondientes ésteres de alquilo de ácidos grasos por encima de un 98 % en el segundo reactor en un tiempo de reacción razonable. Algunos sistemas y métodos de reacción específicos se describen a continuación.

En el presente documento, las expresiones "mezcla de reacción", "sistema de reacción" y "medio de reacción" se pueden usar como sinónimos.

El uso de lipasas inmovilizadas sobre resinas hidrofóbicas en presencia de solución tampón alcalina o agua, tal como en realizaciones del proceso de la invención, asegura una alta estabilidad de la enzima y también evita la acumulación de sustancias hidrofílicas, tales como agua y el producto secundario de glicerol formado, sobre el biocatalizador. En realizaciones específicas, el proceso de la invención usa una solución tampón alcalina o alcalina moderada al 0,001-5 %, por ejemplo al 0,01-5 %, al 0,05-5 %, al 0,1-5 %, al 0,5-5 %, tal como al 0,001 %, al 0,01 %, al 0,05 %, al 0,1 %, al 0,5 %, al 0,75 %, al 1 %, al 1,5 %, al 2 %, al 2,5 %, al 3 %, al 3,5 %, al 4 %, al 4,5 % o al 5 %.

En realizaciones específicas del proceso de la invención en las que se usa agua, el agua se usa en niveles de un 0,0001-5 % de agua, por ejemplo un 0,001-5 %, un 0,01-5 %, un 0,05-5 %, un 0,1-5 %, un 0,5-5 %, tal como un 0,0001 %, un 0,001 %, un 0,01 %, un 0,05 %, un 0,1 %, un 0,5 %, un 0,75 %, un 1 %, un 1,5 %, un 2 %, un 2,5 %, un 3 %, un 3,5 %, un 4 %, un 4,5 % o un 5 %. Tal como se ha mencionado, cuando se usa solución alcalina, esta puede neutralizar o producir ácidos presentes por lo general en la fuente de ácidos grasos debido a reacciones secundarias. La retirada activa continua de estos productos secundarios puede incluso aumentar la eficacia del proceso. El glicerol aislado se puede usar industrialmente.

La fuente de ácidos grasos usada en el proceso de la invención puede comprender al menos uno de aceite de semillas de soja, aceite de canola, aceite de algas, 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 maíz crudo, aceite de pescado, grasa derivada de animales, aceite de cocina usado, grasa quemada, triglicéridos de aceite derivados de fuentes vegetales no comestibles, glicéridos parciales y ácidos grasos libres derivados de esos aceites o cualquier mezcla de al menos dos de los mismos, en cualquier relación deseada.

En todos los procesos de la invención, los ésteres de alquilo de cadena corta de ácidos grasos formados mediante la reacción son específicamente ésteres de metilo, etilo, *iso*-propilo o butilo de ácidos grasos (biodiesel). Otros alcoholes grasos de cadena media (C₆-C₁₀) y alcoholes grasos de cadena larga (C₁₂-C₂₂) también se podrían usar en el proceso de producción de la presente invención. Estos alcoholes más largos pueden ser específicamente adecuados en la producción de ceras, por ejemplo para productos cosméticos.

Las lipasas pueden ser lipasas derivadas de *Thermomyces lanuginose*, *Rhizomucor miehei*, *Mucor miehei*, *Pseudomonas* sp., *Rhizopus* sp., *Mucor javanicus*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger*, *Chromobacterium viscosum*, *Acromobacter* sp., *Burkholderia* sp., *Candida antarctica* A, *Candida antarctica* B, *Candida rugosa*, *Alcaligenes* sp., *Penicillium camembertii*, semillas de papaya y pancreatina, pero no se limitan a las mismas.

Las lipasas se pueden inmovilizar en conjunto sobre un soporte adecuado, específicamente un soporte a base de polímero alifático hidrofóbico o un soporte de polímero aromático hidrofóbico. Cada una de dichas lipasas se puede inmovilizar sobre un soporte adecuado, en el que los soportes sobre los que dichas lipasas se inmovilizan son idénticos o diferentes. Las lipasas usadas pueden ser *regio*-específicas a sus sustratos, o aleatorias. Cuando se usa más de una lipasa, las lipasas se pueden inmovilizar sobre el mismo soporte o sobre diferentes soportes hidrofóbicos. Las lipasas coinmovilizadas sobre el mismo soporte pueden presentar selectividades o *regio*-especificidades al sustrato idénticas o diferentes o a sus sustratos.

Las lipasas pueden ser regioespecíficas (o específicas de sitios), cada una usada sola o en combinación con lipasas de especificidad de sitio igual o diferente. Cuando se hace referencia a las posiciones sn-1, sn-2- o sn-3, estas son posiciones en la cadena principal de glicerol de los diversos glicéridos. Por lo tanto, las lipasas usadas en el proceso de la invención pueden poseer selectividad hacia la posición sn-2 mayor que la de las lipasas aleatorias, es decir, se favorecen catalizando la reacción entre el alcohol o el dador de alcohol con el grupo acilo graso de la posición sn-2, mientras que las lipasas aleatorias presentan la misma actividad de transesterificación para grupos acilo graso en todas las tres posiciones de la cadena principal de glicerol. Algunas lipasas presentan únicamente actividad posicional en la posición sn-2, especialmente en condiciones específicas determinadas por los sustratos, productos, etc. Otras lipasas usadas en el proceso de la invención son específicas de la posición sn-1,3. Estas se pueden usar solas o junto con una lipasa aleatoria, específicamente lipasa que tiene afinidad a glicéridos parciales, y opcionalmente una tercera lipasa con una afinidad elevada por la posición sn-2.

El soporte es específicamente un soporte poroso hidrofóbico y macroreticular, que puede ser orgánico o inorgánico. Ejemplos de soportes son soportes inorgánicos porosos, tales como, pero no limitados a sílice hidrofobizada y/o soportes a base de alúmina, y soportes orgánicos hidrofóbicos tales como, pero no limitados a soporte polimérico o a base de polímero. Los soportes pueden contener opcionalmente grupos funcionales activos seleccionados entre grupos epoxi y/o aldehído, o grupos iónicos.

El soporte insoluble usado en los procesos de la invención es específicamente un soporte a base de polímero alifático o aromático poroso hidrofóbico y reticular, tal como Amberlite[®] XAD 1600 y Sepabeads[®] SP70, ambos formados por resina microreticular porosa preparada a partir de divinilbenceno o a partir de una mezcla de divinilbenceno y poliestireno, Amberlite[®] XAD 7HP formado por polímero acrílico alifático microreticular, y polímero alifático poroso tal como polipropileno poroso (Accurel[®]).

El soporte puede ser un polímero hidrofóbico reticular formado por divinilbenceno, o una mezcla de divinilbenceno y estireno, y polímero alifático hidrofóbico reticular formado por polímeros acrílicos alifáticos o polialqueno, tal como polipropileno. Los soportes específicos son matrices porosas, de tamaño de poro en el intervalo de 25-1000 Å, y más específicamente en el intervalo de 80-200 Å. El soporte también puede ser sílice porosa hidrofóbica en polvo o granular u otros óxidos inorgánicos. El soporte también puede ser sílice hidrofobizada porosa en polvo o granular u otros óxidos inorgánicos. En realizaciones específicas, el área superficial de las resinas de soporte es mayor que 100m²/g.

La cantidad de la solución acuosa alcalina o alcalina moderada a complementar en la reacción de transesterificación/esterificación catalizada por lipasas entre la fuente de ácidos grasos y el alcohol está generalmente por debajo de un 5 % en peso del medio de reacción. Esta solución alcalina se prepara, por ejemplo, a partir de una base o sal alcalina inorgánica o a partir de una base orgánica. Las bases y sales inorgánicas son, por ejemplo, hidróxidos, carbonatos, bicarbonatos, fosfatos, sulfatos, acetatos y citratos de metal alcalino. Las bases orgánicas pueden ser, por ejemplo, aminas primarias, secundarias o terciarias. Además, se contemplan mezclas de estos agentes alcalinos. En el proceso de acuerdo con la invención, el pH del microentorno de la enzima inmovilizada se mantiene en valores alcalinos o alcalinos moderados. Mientras que la adición de agua destilada al sistema de reacción mejora el rendimiento de las lipasas inmovilizadas sobre soporte hidrofóbico (resinas), tal como se ilustra en las Figuras 4 y 5, la adición de diversos tampones alcalinos, con diferentes valores de pH dependiendo del tipo de base usada, dio como resultado una estabilización adicional de las lipasas inmovilizadas sobre soportes hidrofóbicos (resinas), tal como se muestra, por ejemplo, en las Figuras 2 y 3. Los tampones de carbonato y bicarbonato son ejemplos de bases moderadas que son eficaces para aumentar la estabilidad de las lipasas inmovilizadas sobre soportes hidrofóbicos. En el presente documento se describen otras bases adecuadas. Generalmente, el pKa del reactivo alcalino complementado o alcalino moderado formado por la solución tampón es igual o mayor que el pKa de los ácidos que comprenden la fuente de ácidos grasos. La solución alcalina moderada tal como se usa en el presente documento es generalmente una solución con un pH de 7 a aproximadamente 11, por ejemplo, 7-8,5, 7-9, 7-9,5, 7-10 o 7-11. Generalmente, la cantidad de solución acuosa alcalina o alcalina moderada usada se expresa en porcentajes en peso (% en peso) en base a la cantidad de aceite usado en la reacción.

El uso de lipasas inmovilizadas sobre soportes a base de polímero poroso hidrofóbico (resinas) en presencia de una solución alcalina o alcalina moderada, por ejemplo en presencia de una cantidad de un 0,01-5 % en peso, 0,05-5 % en peso, 0,05-4 % en peso, 1-5 % en peso, o 1-4 % en peso, da como resultado la estabilización de la actividad de los biocatalizadores en las reacciones de transesterificación/esterificación entre la fuente de ácidos grasos y el alcohol. Esto se muestra en los Ejemplos siguientes.

La fuente de ácidos grasos es al menos una de triglicéridos, glicéridos parciales, ácidos grasos libres, fosfolípidos, ésteres y amidas de ácidos grasos o una mezcla formada por al menos dos de dichas fuentes.

La producción de ésteres de alquilo de ácidos grasos se realiza por transesterificación o esterificación, simultánea o secuencialmente. Bajo dicho sistema de reacción, la actividad del biocatalizador se mantiene sin pérdidas significativas de actividad en múltiples usos y también evita la acumulación de productos secundarios de glicerol y agua u otros compuestos hidrofílicos en el biocatalizador.

La presente invención proporciona procesos que usan enzimas interfaciales inmovilizadas específicas que retienen actividad y estabilidad elevadas durante muchos ciclos de producción. Específicamente, la preparación de lipasas y fosfolipasas se usa en reacciones de transesterificación/esterificación. Estas reacciones se pueden usar en la producción de artículos de alimentación, cosméticos y biocombustibles ("biodiesel"). De interés particular, estas enzimas se pueden usar para la síntesis de ésteres de alquilo de cadena corta de ácidos grasos para uso como "biodiesel".

La presente invención usó enzimas interfaciales inmovilizadas estables, de alta tolerancia hacia alcoholes de cadena corta, tales como metanol, etanol y glicerol, así como ácidos grasos de cadena corta, tales como ácido acético. El uso de estas preparaciones de enzimas también evita la acumulación en el biocatalizador inmovilizado de sustancias hidrofílicas, en particular glicerol y agua.

En una realización de la invención se proporciona un proceso para reacciones de transesterificación/esterificación simultáneas o secuenciales de una fuente de ácidos grasos con un alcohol usando uno o más tipos de lipasas, inmovilizadas sobre un soporte hidrofóbico (resina), en presencia de una solución acuosa alcalina o alcalina moderada, para obtener el producto deseado, es decir, ésteres de alquilo de ácidos grasos, con conversiones de casi completas a completas durante un tiempo de reacción razonable, por lo general inferior a 5 horas. Una solución alcalina moderada, por ejemplo una solución 0,001 M, 0,1 M, 0,5 M o 1 M de bicarbonato sódico, puede estar presente en el sistema de reacción en una cantidad inferior a aproximadamente un 5 % en peso o aproximadamente un 4 % en peso de la cantidad del aceite usado en la reacción.

Tal como se muestra en los Ejemplos siguientes, el tiempo de vida útil de las lipasas también se puede ampliar mediante el uso de soporte de resina hidrofóbica para la inmovilización de lipasas en combinación con el uso de una solución tampón alcalina o alcalina moderada, por ejemplo en el intervalo de un 0,001-5 % en peso en el medio de reacción de transesterificación/esterificación. Tal como se muestra adicionalmente en los Ejemplos siguientes, el contenido de agua de la mezcla de reacción puede aumentar independientemente del valor del pH. Por lo tanto, en otra realización, la estabilidad del biocatalizador aumenta con el aumento del contenido de agua del sistema de reacción mediante la adición de agua, por ejemplo a un 0,0001-5 % en peso de la fuente de ácidos grasos, o cualquiera de los subintervalos específicos que se han definido anteriormente. Los resultados muestran que la adición de una solución alcalina en el intervalo de un 0,0001-5 % en peso de la fuente de ácidos grasos (Figuras 2 y 3) o agua a un 0,001-4 % de la fuente de ácidos grasos (Figuras 4 y 5) da como resultado el mantenimiento de la actividad y estabilidad enzimática durante muchos ciclos de la reacción.

El alcohol o dador de alcohol usado en los procesos de la invención puede ser un alcohol de alquilo de cadena corta, específicamente alcohol de alquilo C₁-C₆, más específicamente alcohol de alquilo C₁-C₄, y particularmente metanol o etanol o el dador de alcohol puede ser éster de monoalquilo o carbonato de dialquilo, tal como carbonato de dimetilo. Un dador de alcohol tal como, por ejemplo, carbonato de dialquilo también puede servir como una fuente para alcalinidad o alcalinidad moderada del sistema de reacción.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un sistema para la producción de ésteres de alquilo de ácidos grasos. Haciendo referencia a la Fig. 11, una primera realización de dicho sistema, generalmente designado con el número de referencia 100, comprende un recipiente del reactor 120, un recipiente de preparación de la reacción previa 140, y un recipiente de separación del producto 160.

El recipiente de preparación de la reacción previa 140 se configura para recibir materiales de materia prima y tampón (y/o agua), para formar una emulsión adecuada a partir de los mismos, y para alimentar la emulsión preparada PE (también denominada en el presente documento materia prima emulsificada) al recipiente del reactor 120. En particular, dichos materiales de materia prima pueden incluir ácido graso FA (por ejemplo aceite de cocina usado) a partir de una fuente de ácidos grasos 182, y alcohol AL (por ejemplo metanol) a partir de una fuente de alcohol 184, y tampón (y/o agua) BU a partir de una fuente de tampón/agua 186, proporcionados a través de las líneas de suministro adecuadas 152, 154, 156, respectivamente, en comunicación fluida con dicho recipiente de preparación de la reacción previa 140 a través de las entradas en el recipiente 172, 174, 176, respectivamente y válvulas adecuadas (no se muestran).

El recipiente de preparación de la reacción previa 140 define un volumen interno V1 en el que la mezcla de reacción, incluyendo materiales de materia prima y tampón/agua, proporcionados en el mismo a través de entradas en el recipiente 172, 174, 176, se mezclan en conjunto por medio de un sistema de agitación adecuado 142, dirigido con una fuente de potencia (no se muestra), para formar emulsión PE. El recipiente de preparación de la reacción previa 140 comprende una camisa externa 149 a través de la que un fluido de trabajo adecuado puede circular para mantener el volumen V1 a una temperatura deseada en estado estacionario. Por ejemplo, el fluido de trabajo puede ser aceite o agua, calentado o enfriado en un recipiente diferente (no se muestra) y bombeado a través de la camisa 149 a través de puertos de entrada y salida adecuados (no se muestran). En variaciones alternativas de esta realización, el recipiente de preparación de la reacción previa 140 puede comprender un sistema de elementos de calentamiento y/o enfriamiento, por ejemplo elementos de calentamiento y/o enfriamiento accionados eléctricamente, en lugar de o además de la camisa 149.

El recipiente del reactor 120 se configura para recibir la emulsión preparada PE desde el recipiente de preparación de la reacción previa 140, para hacer reaccionar los materiales de materia prima en el mismo en presencia de un biocatalizador adecuado BC para producir productos de reacción RP, y para alimentar los productos de reacción RP de la mezcla de reacción al recipiente de separación del producto 160. La línea de salida 148 proporciona comunicación fluida selectiva entre el recipiente de preparación de la reacción previa 140 y el recipiente del reactor 120 a través de válvulas adecuadas (no se muestran) y permite que la emulsión preparada PE preparada mediante el recipiente de preparación de la reacción previa 140 se alimente en el recipiente del reactor 120 si se desea.

El recipiente de reacción 120 define un volumen interno V2 en el que la emulsión preparada PE en la mezcla de reacción, proporcionada en el mismo a través de la entrada en el recipiente 122, se hace reaccionar, y la mezcla de reacción se puede agitar por medio de un sistema de agitación adecuado 124, accionado mediante una fuente de potencia (no se muestra) para formar los productos de reacción RP. El biocatalizador BC puede comprender una enzima adecuada y se proporciona en forma de perlas de enzima inmovilizada que permanecen en el recipiente del reactor 120 hasta que se hacen ineficaces o no son lo suficientemente eficaces, después de lo cual se pueden retirar y reemplazar con nuevo biocatalizador BC. Por ejemplo, el biocatalizador BC puede comprender lipasa derivada de *Thermomyces lanuginosa* inmovilizada sobre una resina hidrofóbica y porosa a base de poliestireno-divinilbenceno.

El recipiente del reactor 120 comprende un sistema de regulación térmica en forma de una camisa exterior 129 a través de la que un fluido de trabajo adecuado puede circular para mantener el volumen V2 a una temperatura deseada en el estado estacionario. Por ejemplo, el fluido de trabajo puede ser aceite o agua, calentado o enfriado en un recipiente diferente (no se muestra) y bombeado a través de la camisa 129 a través de puertos de entrada y salida adecuados 123. En variaciones alternativas de esta de realización, el sistema de regulación térmica

comprende un sistema de elementos de calentamiento y/o enfriamiento, por ejemplo elementos de calentamiento y/o enfriamiento accionados eléctricamente, en lugar de o además de la camisa 129.

5 La parte inferior del recipiente del reactor 120 comprende una salida 127, y se proporciona un dispositivo de retención adecuado en forma de filtro 125 corriente arriba de la salida 127 configurado para filtrar la mezcla de reacción, en particular los productos de reacción RP antes de que sean retirados del recipiente del reactor 120, y para evitar que el biocatalizador BC sea retirado con los productos de reacción RP.

10 El recipiente de separación del producto 160 se configura para retirar por separación los productos de reacción RP, el producto deseado P (éster de alquilo de ácidos grasos), a partir de productos secundarios que incluyen exceso de agua y glicerol G. La línea de salida 147 proporciona comunicación fluida selectiva entre el recipiente de separación del producto 160 y el recipiente del reactor 120 a través de válvulas adecuadas (no se muestran) y permite que los productos de reacción RP se alimenten en el recipiente de separación del producto 160 desde el recipiente del reactor 120 si se desea. En esta realización, el recipiente de separación del producto 160 comprende un sistema de separación por centrifuga o gravedad para realizar la separación que se ha mencionado anteriormente, e incluye una primera salida 162 para la salida del producto P, y una segunda salida 164 para recoger el exceso de agua y glicerol G. El producto P se puede recoger a través de la llave 163.

20 Por lo tanto, el sistema puede funcionar en un modo continuo de producción, en el que la emulsión preparada PE se alimenta en el recipiente del reactor 120, y el producto deseado P se recoge en una manera continua a través de la llave 163. La emulsión PE se puede preparar y suministrar de una manera continua al recipiente del reactor 120 para completar el volumen de reactivo en el mismo a la misma velocidad que los productos de reacción RP se están retirando desde la salida 127. Como alternativa, la emulsión PE se puede preparar y suministrar en lotes al recipiente del reactor 120 para completar el volumen de reactivo en la mezcla de reacción a intervalos distintos siempre que el nivel de los reactivos en el recipiente del reactor 120 se reduzca a un nivel mínimo en particular después de la retirada continua de los productos de reacción RP a través de la salida 127. Por supuesto, también es posible que el sistema 100 funcione para proporcionar el producto deseado P de forma discontinua en lugar de en forma continua.

30 Como alternativa, el sistema 100 puede funcionar en modo de rendimiento potenciado, en el que el producto P se redirige, en lugar de ser recogido inmediatamente a través de la llave 163, al recipiente del reactor 120 a través de un sistema de redireccionamiento opcional, que incluye la línea 165, la entrada en el recipiente 121 y la válvula 166, en el que la válvula 166 puede funcionar selectivamente para desviar el producto P desde la llave 163. Cuando se redirige al recipiente del reactor 120, el producto P puede reaccionar adicionalmente en el mismo con alcohol AL, proporcionado a través de una línea separada (no se muestra) desde la fuente 184, a partir de una fuente de alcohol diferente (no se muestra), o a partir de una fuente 184 a través del recipiente de preparación de la reacción previa 140, para producir un rendimiento mayor del producto P, que de nuevo se puede retirar por separación a partir de los productos secundarios usando el recipiente de separación del producto 160. Cuando se proporciona el alcohol a través del recipiente de preparación 140, este último se vacía primero de la emulsión preparada PE, y válvulas adecuadas evitan que los ácidos grasos FA y opcionalmente tampón/agua que se están proporcionando mediante las respectivas fuentes 182 y 186. Se pueden proporcionar suministros de bombas o gravedad y válvulas que se pueden controlar para transportar de forma selectiva los materiales respectivos a través de las respectivas líneas 152, 154, 156, 148, 147, 165, y un controlador adecuado (no se muestra) supervisa y controla el funcionamiento del sistema.

45 En al menos algunas variaciones alternativas de la primera realización, el recipiente de preparación de la reacción previa 140 puede ser integral con el recipiente del reactor 120. Por ejemplo, los respectivos volúmenes internos V1 y V2 se pueden separar mediante una pared que tiene un dispositivo de apertura que corresponde a la línea 148. Como alternativa, los respectivos volúmenes internos V1 y V2 pueden ser contiguos, pero el volumen interno V1 está lo suficientemente espaciado del biocatalizador BC para proporcionar un tiempo suficiente para que la emulsión PE se forme antes de que alcance el biocatalizador BC.

50 En variaciones alternativas de la primera realización, uno, dos o todos los ácidos grasos FA, alcohol AL, y tampón/agua BU se pueden proporcionar directamente al recipiente del reactor 120, bordeando el recipiente de preparación de la reacción previa 140. Por ejemplo, uno o más de la fuente de ácidos grasos 182, fuente de alcohol 184, y fuente de tampón/agua 186, pueden estar en comunicación fluida selectiva directamente con el recipiente del reactor 120 a través de líneas de suministro adecuadas (no se muestran) que bordean el recipiente de preparación de la reacción previa 140.

60 Se observará que todos los componentes del sistema 100 de acuerdo con la primera realización, o variaciones alternativas de la misma, son de una forma adecuada y se preparan a partir de materiales adecuados tal como se conoce en la técnica, de modo que permitan que cada componente realice las funciones respectivas en las condiciones respectivas, que incluyen temperatura, presión, pH, etc.

65 Haciendo referencia a la Fig. 12, una segunda realización del sistema, designada con el número de referencia 200, comprende todos los elementos y características de la primera realización, incluyendo variaciones alternativas de la

misma, incluyendo todos los componentes numerados del mismo modo que en la Fig. 11, cambiando lo que se deba cambiar, con algunas diferencias. Por ejemplo, al sistema 200 también comprende: un recipiente del reactor 120, un recipiente de preparación de la reacción previa 140, un recipiente de separación del producto 160, fuente de ácidos grasos 182, fuente de alcohol 184, fuente de tampón/agua 186, líneas de suministro 152, 154, 156, entradas en el recipiente 172, 174, 176, sistema de agitación 142, camisa exterior 149, línea de salida 148, entrada en el recipiente 122, sistema de agitación 124, biocatalizador BC, camisa exterior 129, puertos de entrada y salida 123, salida 127, filtro 125, línea de salida 147, primera salida 162, segunda salida 164; tal como se desvela para la primera realización, cambiando lo que se deba cambiar.

Sin embargo, en la segunda realización, la línea 165, la llave 163 y la válvula 166 de la primera realización se omiten, y en su lugar un módulo de reactor auxiliar 300 se conecta de forma operativa a la primera salida 162 del recipiente de separación del producto 160.

El módulo de reactor auxiliar 300 comprende un recipiente del reactor auxiliar 220 y un recipiente de separación del producto auxiliar 260, que en esta realización son, respectivamente, básicamente similares al recipiente del reactor 120 y el recipiente de separación del producto 160, cambiando lo que se deba cambiar. Cuando está en funcionamiento, el producto deseado P desde el recipiente de separación del producto 160 se dirige al recipiente del reactor auxiliar 220 a través de la línea 266, válvula 267 y entrada en el recipiente 221. Cuando se dirige al recipiente del reactor auxiliar 220, el producto P se puede hacer reaccionar en el mismo adicionalmente con alcohol AL, proporcionado a través de una línea separada (no se muestra) desde la fuente 184 o desde una fuente de alcohol diferente (no se muestra), para producir productos adicionales reaccionados FRP. La línea 249 permite que los productos adicionales relacionados FRP se transporten al recipiente de separación del producto auxiliar 260, que funciona a continuación para separar un mayor rendimiento del producto P a partir de los productos secundarios.

El sistema 200 puede funcionar de una manera similar a la del 100, cambiando lo que se deba cambiar.

Desvelado y descrito, se debe entender que la presente invención no se limita a los ejemplos, etapas del proceso, y materiales en particular que se desvelan en el presente documento, de modo que etapas del proceso y materiales pueden variar en cierto modo. También se debe entender que la terminología usada en el presente documento se usa con el fin de describir solamente realizaciones en particular y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención se verá limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

Se debe indicar que, tal como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno" y "el" incluyen referentes en plural a menos que el contenido lo indique claramente de otro modo.

A lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen a continuación, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, se entenderá que el verbo "comprender", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas indicados pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

Los Ejemplos siguientes son representativos de técnicas usadas por los inventores la realización de aspectos de la presente invención.

Ejemplos

General

Todos los experimentos se realizaron en tubos de vidrio de 30 ml de volumen de fondo redondo con un filtro de vidrio centrado o en reactores agitados mecánicamente de 500 ml de volumen de fondo redondo con un filtro de vidrio sinterizado con una porosidad de 150-250 μm . El medio de reacción habitual contenía fuente de ácidos grasos, alcohol, normalmente, metanol o etanol en una base molar a 1:1 en relación con el ácido graso independientemente de estar libres o unidos en la cadena principal de glicerol (para ácidos grasos libres y monoglicéridos 1:1, para diglicéridos 1:2, y para triglicéridos 1:3 a favor del alcohol). La fuente de ácidos grasos se mezcló previamente con diferentes cantidades de tampón alcalino, en realizaciones específicas con bicarbonato sódico. Las reacciones comenzaron mediante la adición de lipasa inmovilizada sobre una resina hidrofóbica (10-15 % en peso) y el medio de reacción se agitó mecánicamente o se agitó a 30 °C. La cantidad de alcohol se añadió igualmente en tres etapas cada una con una hora de diferencia, a menos que se indicara de otro modo. Las conversiones de la reacción fueron seguidas por toma de muestras a partir del medio de reacción a diferentes intervalos de tiempo y por análisis de componentes de ácidos grasos. La conversión en biodiesel se calculó como: 100* del área del pico del éster de alquilo de ácidos grasos/suma de todas las áreas de los picos.

Inmovilización de lipasas: Las lipasas se inmovilizaron siguiendo procedimientos convencionales en los que la lipasa derivada de un determinado microorganismo se solubiliza en solución tampón de 0,1 M a un valor de pH determinado, por ejemplo 7,5. Una resina de polímero orgánico o inorgánico se introdujo en la solución de lipasa. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 8 horas. Opcionalmente, se añadió acetona fría en la mezcla para

aumentar la precipitación de enzimas de proteína sobre la resina. La mezcla se filtró y las perlas de enzimas se secaron para reducir el contenido de agua hasta menos de un 5 %.

Se usaron diferentes resinas incluyendo resinas de polímero hidrofóbico en base a poliestireno/divinilbenceno, parafina o cualquiera de sus combinaciones, para obtener resinas de características hidrofóbicas. Las resinas hidrofóbicas habituales usadas incluían Amberlite^R XAD 1600 (Rohm y Haas, USA) y Sepabeads^R SP70 (Resindion, Italia). Las resinas hidrofílicas habituales usadas incluían Duolite^R D568 (Rohm y Haas) y gel de sílice poroso. Las lipasas se pueden inmovilizar separadamente sobre una resina o diferentes lipasas se coinmovilizan sobre la misma resina.

Ejemplo 1

La actividad de transesterificación de lipasa derivada de *Thermomyces lanuginosa* inmovilizada sobre Amberlite^R XAD 1600 como una resina hidrofóbica y sobre Duolite^R D568 como una resina hidrofílica, y lipasa derivada de *Pseudomonas sp.* inmovilizada sobre Sepabeads^R SP70 como una resina hidrofóbica y sobre sílice porosa como una resina hidrofílica.

Condiciones de reacción: Aceite de semillas de soja refinado y blanqueado (20 g) que contiene un 1 % en peso de solución 0,1 M de bicarbonato sódico. Se añadió metanol (2,5 ml) en etapas en tres lotes equivalentes cada uno con una hora de diferencia. El medio de reacción que contenía preparación de lipasa al 10 % en peso se agitó a 300 rpm y 30 °C. Los resultados se muestran en la Figura 1.

Los resultados presentados en la Figura 1 muestran que las lipasas tanto de *Thermomyces lanuginosa* como de *Pseudomonas sp.* inmovilizadas sobre diferentes resinas en presencia de solución de bicarbonato sódico al 1 % en peso mostraron alta actividad de transesterificación durante los primeros 5 ciclos usando el mismo lote de enzimas. Se observó que después del 5º lote, cuando se usó el mismo lote de enzimas, la filtración del medio de reacción a partir del sistema se hizo difícil debido a la formación de depósitos de tipo gel alrededor de las perlas de ambas lipasas inmovilizadas sobre resinas hidrofílicas, es decir Duolite^R D568 y sílice porosa. La actividad de interesterificación de ambas lipasas inmovilizadas sobre resinas hidrofílicas disminuyó drásticamente en lotes adicionales consecutivos, y se hicieron inactivas después del 10º ciclo. Como contraste, la lipasa de *Pseudomonas sp.* inmovilizada sobre la resina hidrofóbica, Sepabeads^R SP70, retuvo más de un 80 % de su actividad inicial después de 70 ciclos, mientras que la lipasa de *Thermomyces lanuginosa* inmovilizada sobre resina hidrofóbica, Amberlite^R XAD1600, retuvo más de un 20 % de su actividad inicial después de más de 70 ciclos.

Ejemplo 2

A. La conversión de aceite de semillas de soja en biodiesel y glicerol después de 6 horas de reacción usando el mismo lote de biocatalizador en experimentos con múltiples lotes.

Condiciones de reacción: Aceite de semillas de soja refinado y blanqueado (20 g) que contiene diferentes concentraciones de solución 0,1 M de bicarbonato sódico. Se añadió metanol (2,5 ml) en etapas en tres lotes equivalentes cada uno con una hora de diferencia. Se usó la lipasa derivada de *Thermomyces lanuginosa* inmovilizada sobre una resina hidrofóbica y porosa a base de poliestireno-divinilbenceno (10 % en peso). El medio de reacción se agitó a 300 rpm y 30 °C. Los resultados se muestran en la Figura 2.

B. La conversión de aceite de semillas de soja en biodiesel y glicerol después de 6 horas de reacción usando el mismo lote de biocatalizador en experimentos con múltiples lotes.

Condiciones de reacción: Aceite de semillas de soja refinado y blanqueado (20 g) que contiene diferentes concentraciones de solución 0,1 M de bicarbonato sódico. Se añadió metanol (2,5 ml) en etapas en tres lotes equivalentes cada uno con una hora de diferencia. Se usó la lipasa derivada de *Pseudomonas sp.* inmovilizada sobre una resina hidrofóbica y porosa a base de poliestireno-divinilbenceno (10 % en peso). El medio de reacción se agitó a 300 rpm y 30 °C. Los resultados se muestran en la Figura 3.

Las Figuras 2 y 3 muestran que la cantidad de carbonato sódico en el medio de reacción tiene un papel principal en la vida útil de las lipasas de *Thermomyces lanuginosa* y de *Pseudomonas sp.* inmovilizadas sobre resinas hidrofóbicas. En las Figuras 2 y 3 se puede observar que en ausencia de una solución alcalina, ambas lipasas inmovilizadas pierden drásticamente su actividad después de unos pocos ciclos, mientras que las mismas lipasas inmovilizadas mantienen su actividad de transesterificación a través de múltiples usos en presencia de solución de bicarbonato sódico como una base en el sistema de reacción. Los resultados para ambas enzimas inmovilizadas muestran que el aumento de la cantidad de solución de bicarbonato sódico en el medio de reacción en el intervalo de un 0 – 4 % en peso da como resultado la disminución de la pérdida de actividad enzimática en múltiples usos del mismo lote de enzima inmovilizada.

Ejemplo 3

A. La conversión de aceite de semillas de soja en biodiesel y glicerol después de 6 horas de reacción usando el mismo lote de biocatalizador en experimentos con múltiples lotes.

Condiciones de reacción: Aceite de semillas de soja refinado y blanqueado (20 g) que contiene diferentes concentraciones de agua destilada. Se añadió metanol (2,5 ml) en etapas en tres lotes equivalentes cada uno con una hora de diferencia. Se usó la lipasa derivada de *Thermomyces lanuginosa* inmovilizada sobre una resina hidrofóbica y porosa a base de poliestireno-divinilbenceno (10 % en peso). El medio de reacción se agitó a 300 rpm y 30 °C. Los resultados se muestran en la Figura 4.

B. La conversión de aceite de semillas de soja en biodiesel y glicerol después de 6 horas de reacción usando el mismo lote de biocatalizador en experimentos con múltiples lotes.

Condiciones de reacción: Aceite de semillas de soja refinado y blanqueado (20 g) que contiene diferentes concentraciones de agua destilada. Se añadió metanol (2,5 ml) en etapas en tres lotes equivalentes cada uno con una hora de diferencia. Se usó la lipasa derivada de *Pseudomonas sp.* inmovilizada sobre una resina hidrofóbica y porosa a base de poliestireno-divinilbenceno (10 % en peso). El medio de reacción se agitó a 300 rpm y 30 °C. Los resultados se muestran en la Figura 5.

Las Figuras 4 y 5 muestran que la actividad de transesterificación usando el mismo lote de lipasas de *Thermomyces lanuginosa* y de *Pseudomonas sp.* inmovilizadas sobre resinas hidrofóbicas en múltiples experimentos también se ve afectada por la cantidad de agua en el sistema de reacción. Se puede observar que el aumento de la cantidad de agua desde ninguno (cero) a un 4 % en peso dio como resultado el mantenimiento de una actividad de transesterificación residual mayor del biocatalizador cuando se usa en ciclos consecutivos. Los resultados presentados en las Figuras 2 a 5 muestran de forma evidente que el uso una base moderada, tal como solución de bicarbonato sódico en las reacciones de transesterificación es favorable para mantener la actividad de las lipasas inmovilizadas sobre resinas hidrofóbicas cuando se usa en ciclos consecutivos.

Ejemplo 4

La conversión de una mezcla de ácidos grasos libres (FFA) y aceite de semillas de soja en biodiesel, y productos secundarios de glicerol y agua después de 4 horas de esterificación/transesterificación usando el mismo lote de biocatalizador en experimentos con múltiples lotes.

Condiciones de reacción: Una mezcla de hidrolizado de semillas de soja de ácidos grasos (50 % en peso) y aceite de semillas de soja (50 % en peso) con un valor de FFA inicial de 72 mg de KOH/1 g que contiene diferentes cantidades de solución 0,1 M de bicarbonato sódico. Se añadió metanol (4,5 ml) en etapas en tres lotes equivalentes cada uno con una hora de diferencia. Se usó la lipasa derivada de *Pseudomonas sp.* inmovilizada sobre una resina hidrofóbica y porosa a base de poliestireno-divinilbenceno (20 % en peso). El medio de reacción se agitó a 300 rpm y 30 °C. Los resultados se muestran en la Figura 6.

La Figura 6 muestra que la cantidad de solución de base diferente tiene un efecto principal sobre la reacción de esterificación simultánea de FFA presente en la mezcla de reacción formada por proporciones equivalentes de hidrolizados de aceite de semillas de soja y triglicéridos de aceite de semillas de soja. Se puede observar que la lipasa de *Pseudomonas sp.* inmovilizada sobre una resina hidrofóbica perdió su actividad de esterificación cuando no se añadió solución alcalina en el sistema de reacción de esterificación/transesterificación, mientras que el mismo biocatalizador ha mantenido su actividad en ciclos consecutivos cuando un 1 y un 2 % en peso de soluciones 0,1 M de bicarbonato sódico se añadieron separadamente en los sistemas de reacción. Los resultados presentados en la Figura 6 muestran que el uso de lipasa de *Pseudomonas sp.* inmovilizada sobre una resina hidrofóbica redujo el contenido de FFA en presencia de un 1 % y un 2 % en peso de solución 0,1 M de bicarbonato sódico de un valor inicial de 72 mg de KOH/1 g a inferior a 8 y 6 mg de KOH/1 g como promedio, respectivamente, y mantuvo esta actividad en 22 ciclos posteriores.

Ejemplo 5

La esterificación de hidrolizado de aceite de semillas de soja en biodiesel y agua después de 4 horas de reacción usando el mismo lote de biocatalizador en experimentos con múltiples lotes.

Condiciones de reacción: Hidrolizado de semillas de soja de ácidos grasos libres (20 g) con un valor de FFA de 150 mg de KOH/1 g que contiene solución 0,1 M de bicarbonato sódico al 1 % en peso. Se añadió metanol (2 ml) en el medio de reacción en un lote. Se usó la lipasa derivada de *Pseudomonas sp.* inmovilizada sobre una resina hidrofóbica y porosa a base de poliestireno-divinilbenceno (10 % en peso). El medio de reacción se agitó a 300 rpm y 30 °C. Los resultados se muestran en la Figura 7.

La Figura 7 muestran que la lipasa de *Pseudomonas sp.* inmovilizada sobre una resina hidrofóbica también es capaz de catalizar la esterificación de ácidos grasos libres para formar éster de metilo de ácidos grasos y agua como producto secundario. Los resultados muestran que la preparación de la lipasa mantuvo su actividad de

esterificación/transesterificación en un medio que contenía una solución 0,1 M de bicarbonato sódico al 1 % durante más de 25 ciclos usando el mismo lote de biocatalizador sin la observación de ninguna pérdida de actividad significativa.

5 Ejemplo 6

La transesterificación de aceite de pescado con etanol después de 6 horas de reacción usando el mismo lote de biocatalizador en experimentos con múltiples lotes. *Condiciones de reacción:* Aceite de pescado refinado (20 g) que contiene una solución 0,1 M de bicarbonato sódico al 1 %. Se añadió etanol (2,5 ml) en etapas en tres lotes equivalentes cada uno con una hora de diferencia. Las lipasas derivadas de *Thermomyces lanuginosa* y de *Pseudomonas sp.* inmovilizadas sobre Amberlite[®] XAD 1600, se usaron separadamente (10 % en peso). El medio de reacción se agitó a 300 rpm y 30 °C. Los resultados se muestran en la Figura 8.

La Figura 8 muestra que ambas lipasas derivadas de *Thermomyces lanuginosa* y de *Pseudomonas sp.* inmovilizadas sobre resinas hidrofóbicas también son capaces de catalizar la transesterificación de triglicéridos de aceite de pescado con etanol para formar éster de etilo de ácidos grasos y glicerol como producto secundario. Los resultados también muestran que ambas preparaciones de biocatalizador mantuvieron su actividad de transesterificación en presencia de solución de bicarbonato sódico al 1 % sin pérdidas de actividad significativas durante más de 20 ciclos usando el mismo lote de biocatalizador.

20 Ejemplo 7

La transesterificación de grasa de Sebo con etanol después de 6 horas de reacción usando el mismo lote de biocatalizador en experimentos con múltiples lotes.

Condiciones de reacción: Grasa de Sebo (16 g) que contienen éster de etilo de ácidos grasos de de grasa de sebo (4 g) y solución 1 M de carbonato potásico al 1 %. Se añadió etanol (2,5 ml) en etapas en tres lotes equivalentes cada uno con una hora de diferencia. Las lipasas derivadas de *Thermomyces lanuginosa*, *Pseudomonas sp.* inmovilizadas sobre Amberlite[®] XAD 1600 (10 % en peso) se usaron separadamente o en combinación en una relación equivalente. El medio de reacción se agitó a 300 rpm y 37 °C. Los resultados se muestran en la Figura 9.

La Figura 9 muestra que ambas lipasas derivadas de *Thermomyces lanuginosa* y de *Pseudomonas sp.*, separadamente o en combinación, inmovilizadas sobre resinas hidrofóbicas también son capaces de catalizar la transesterificación de triglicéridos de grasa de sebo con etanol para formar éster de etilo de ácidos grasos y glicerol como producto secundario. La materia prima del medio de reacción estaba formada por grasa de sebo (80 %) y ésteres de etilo de ácidos grasos derivados de grasa de sebo para disminuir el punto de fusión del medio de reacción. Los resultados presentados en la Figura 9 muestran que todos los biocatalizadores conservaron más de un 80 % de su actividad inicial en presencia de solución alcalina moderada, tal como carbonato potásico 1 M, cuando se usó el mismo lote de biocatalizadores en 100 ciclos consecutivos.

40 Ejemplo 8

El tratamiento de del medio de reacción de transesterificación/esterificación obtenido después de 4 horas que contiene un valor de FFA de 7 mg de KOH/1 g usando lipasa de *Pseudomonas sp.* o lipasa de *Thermomyces lanuginosa* inmovilizadas sobre resinas porosas hidrofóbicas con lipasa de *Candida Antarctica B* inmovilizada sobre una resina porosa hidrofóbica y metanol (relación de 1:10 en base molar entre FFA y metanol, respectivamente) usando el mismo lote de biocatalizador (10 % en peso) en experimentos con múltiples lotes. El medio de reacción se agitó a 300 rpm y 30 °C. Los resultados se muestran en la Figura 10.

La Figura 10 muestra que el medio de reacción de transesterificación obtenido después del tratamiento con lipasa de *Thermomyces lanuginosa* o con lipasa de *Pseudomonas sp.* como se ha descrito anteriormente, que por lo general contiene valores de FFA de 3-7 mg de KOH/1 g, se puede tratar con lipasa de *Candida antarctica B* inmovilizada sobre soporte hidrofílico o hidrofóbico, da como resultado la reducción del valor de FFA a menos de 2 mg de KOH/1 g. La lipasa inmovilizada puede mantener su actividad en más de 100 ciclos.

55 Ejemplo 9

Transesterificación/esterificación de aceite de cocina usado que contiene FFA al 10 % con metanol para formar biodiesel, agua y glicerol usando la primera realización del sistema ilustrado en la Figura 11.

Condiciones de reacción: En primer lugar se mezcló previamente aceite de cocina usado (1100 g) que contiene un 2 % de solución 0,1 M de bicarbonato sódico y metanol (140 g) en el recipiente de preparación de la reacción previa 140 para formar una emulsión, que se introdujo a continuación en el recipiente del reactor 120 que tiene un volumen interno V2 de aproximadamente 2 litros. La mezcla de reacción se mezcló en el recipiente del reactor 120 con una lipasa derivada de *Thermomyces lanuginosa* inmovilizada sobre una resina hidrofóbica y porosa a base de poliestireno-divinilbenceno (30 % en peso del aceite) durante 6 horas a 30 °C. La mezcla de reacción se retiró por

- filtración a través del filtro 125 y se alimentó al recipiente de separación del producto 160. El glicerol y el exceso de agua se retiraron de la mezcla de reacción en el recipiente de separación del producto 160. La fase superior que contiene los ésteres de metilo de ácidos grasos y los glicéridos sin reaccionar se volvieron a introducir en el recipiente del reactor 120 a través de la línea de redireccionamiento 165, y la agitación en el recipiente del reactor 120 se reanudó después de la adición de metanol (110 g) en el medio de reacción en el recipiente del reactor 120. La conversión en éster de metilo después de 2 horas fue de un 98 %. Un medio de reacción emulsificado (emulsión preparada) que contiene aceite de cocina usado (83 % en peso), metanol (15 %) y solución 0,1 M de bicarbonato sódico (2 %) se alimentó continuamente en el recipiente del reactor 120 a un caudal de aproximadamente 30 ml/min. La conversión en ésteres de metilo de ácidos grasos se mantuvo hasta más de 3 meses sin pérdidas significativas de actividad cuando se usa el mismo lote de biocatalizador derivado de lipasa de *Thermomyces lanuginosa* inmovilizada sobre una resina hidrofóbica macroporosa.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso seleccionado entre:

- 5 (A) un proceso para la transesterificación/esterificación de una fuente de ácidos grasos con un alcohol, para formar ésteres de alquilo de ácidos grasos, que comprende hacer reaccionar la fuente de ácidos grasos mencionada y un alcohol o un dador de alcohol en presencia de una preparación de lipasa inmovilizada, en el que la preparación de lipasa inmovilizada comprende al menos una lipasa inmovilizada sobre un soporte poroso hidrofóbico y el medio de reacción contiene una solución tampón alcalina acuosa; y
- 10 (B) un proceso para la transesterificación/esterificación de una fuente de ácidos grasos seleccionada entre triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos y una mezcla de los mismos, comprendiendo además dicha mezcla opcionalmente ácidos grasos libres, con un alcohol, para formar ésteres de alquilo de ácidos grasos, que comprende hacer reaccionar la fuente de ácidos grasos mencionada y un alcohol en presencia de una preparación de lipasa inmovilizada, en el que la preparación de lipasa inmovilizada comprende al menos una lipasa inmovilizada sobre un soporte poroso hidrofóbico y en el que se añade agua a dicha fuente de ácidos grasos o al medio de reacción.
- 15
2. El proceso de la reivindicación 1, que es el proceso (A) y en el que la solución tampón acuosa tiene un pH de 7 a aproximadamente 11.
- 20
3. El proceso de la reivindicación 1, que es el proceso (B) y en el que el agua está en forma de una solución acuosa con un pH de 3 a 11.
- 25
4. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho alcohol es un alcohol de cadena corta; o en el que dicho dador de alcohol es un éster de monoalquilo, tal como acetato de metilo o un carbonato de dialquilo, tal como carbonato de dimetilo, que también sirve como una fuente de reactivo alcalino moderado en el medio de reacción.
- 30
5. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha al menos una lipasa es una lipasa derivada de una cualquiera de *Rhizomucor miehei*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus niveus*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium camembertii*, *Alcaligenes sp.*, *Acromobacter sp.*, *Burkholderia sp.*, *Thermomyces lanuginosa*, *Chromobacterium viscosum*, *Candida antarctica B*, *Candida rugosa*, *Candida antarctica A*, semillas de papaya y pancreatina.
- 35
6. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha al menos una lipasa inmovilizada es capaz de catalizar la esterificación de ácidos grasos libres para producir ésteres de alquilo de ácidos grasos y agua como producto secundario, y la transesterificación de triglicéridos y glicéridos parciales para producir ésteres de alquilo de ácidos grasos y glicerol como producto secundario.
- 40
7. El proceso de la reivindicación 1 o 2, en el que proceso es el proceso (A), o el proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que dicha preparación de lipasa comprende al menos dos lipasas que pueden estar cada una inmovilizada separadamente sobre un soporte hidrofóbico o coinmovilizada sobre el mismo soporte hidrofóbico, y en el que dichas al menos dos lipasas poseen regioespecificidad idéntica o diferente.
- 45
8. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho soporte es uno cualquiera de soporte a base de polímero alifático hidrofóbico y soporte a base de polímero aromático hidrofóbico.
- 50
9. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho soporte es soporte inorgánico poroso o no poroso, que puede ser hidrofóbico o está revestido con material orgánico hidrofóbico.
- 55
10. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que dicha fuente de ácidos grasos es una cualquiera de aceite vegetal, grasa animal, aceite de algas, aceite de pescado, aceite usado, grasa quemada y cualquier mezcla de los mismos.
- 60
11. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha fuente de ácidos grasos comprende ácidos grasos libres, mono-, di- o triglicéridos, sus mezclas en cualquier relación, ésteres de ácidos grasos y amidas, en ausencia o presencia de otros derivados de ácidos grasos secundarios tales como fosfolípidos y ésteres de esteroles, dicha fuente de ácidos grasos está sin refinar, refinada, blanqueada, desodorizada o cualquiera de sus combinaciones.
12. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho alcohol es metanol y dichos ésteres de ácidos grasos resultantes son ésteres de metilo de ácidos grasos (FAME - Biodiesel), o en el que dicho alcohol es un alcohol graso de cadena media (C₆-C₁₀) o alcohol graso de cadena larga (C₁₂-C₂₂).

13. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha lipasa inmovilizada se usa en reactores de tanque agitado continuo o en reactores de columna de lecho empacado que funcionan en modos discontinuo o continuo.

5 14. Un sistema que es:

(A) un sistema para la transesterificación/esterificación de una fuente de ácidos grasos con un alcohol, para formar ésteres de alquilo de ácidos grasos, que comprende:

10 un recipiente de reacción para hacer reaccionar un medio de reacción que incluye la fuente de ácidos grasos mencionada y al menos uno de un alcohol y un dador de alcohol en presencia de una preparación de lipasa inmovilizada, en el que la preparación de lipasa inmovilizada comprende al menos una lipasa inmovilizada sobre un soporte poroso hidrofóbico y el medio de reacción contiene una solución tampón alcalina acuosa; o

15 (B) un sistema para la transesterificación/esterificación de una fuente de ácidos grasos seleccionada entre triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos y cualquier mezcla de los mismos, comprendiendo además dicha mezcla opcionalmente ácidos grasos libres, con un alcohol, para formar ésteres de alquilo de ácidos grasos, que comprende:

20 un recipiente de reacción para hacer reaccionar un medio de reacción que incluye la fuente de ácidos grasos mencionada y al menos uno de un alcohol y un dador de alcohol en presencia de una preparación de lipasa inmovilizada, en el que la preparación de lipasa inmovilizada comprende al menos una lipasa inmovilizada sobre un soporte poroso hidrofóbico y en el que se añade agua a dicha fuente de ácidos grasos o al medio de reacción.

25 15. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, realizado en un sistema tal como se define en la reivindicación 14.

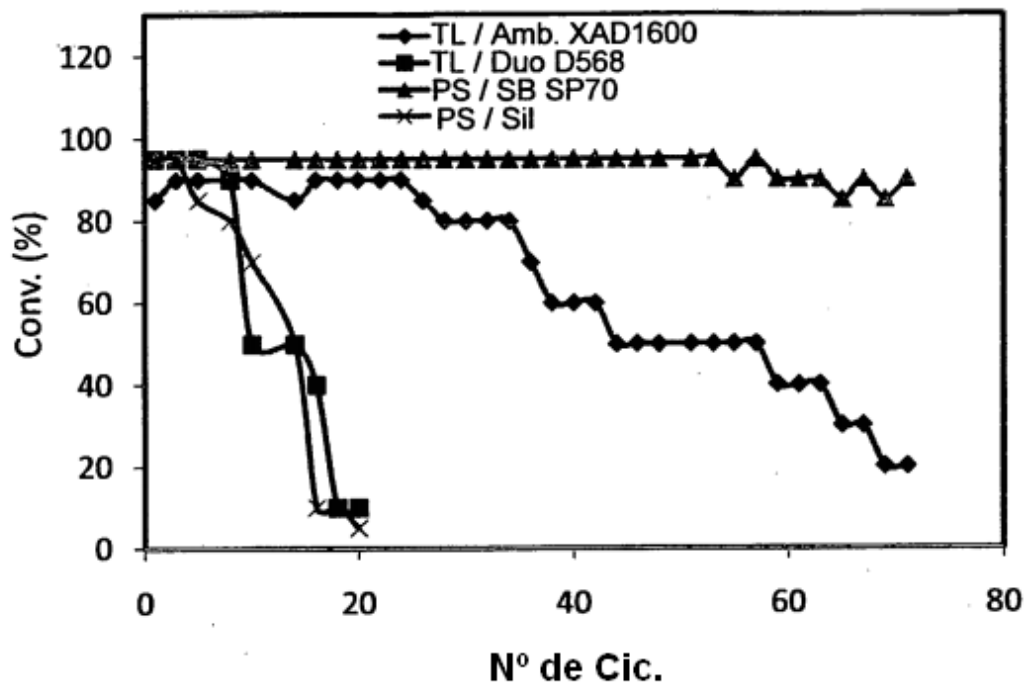


Figura 1

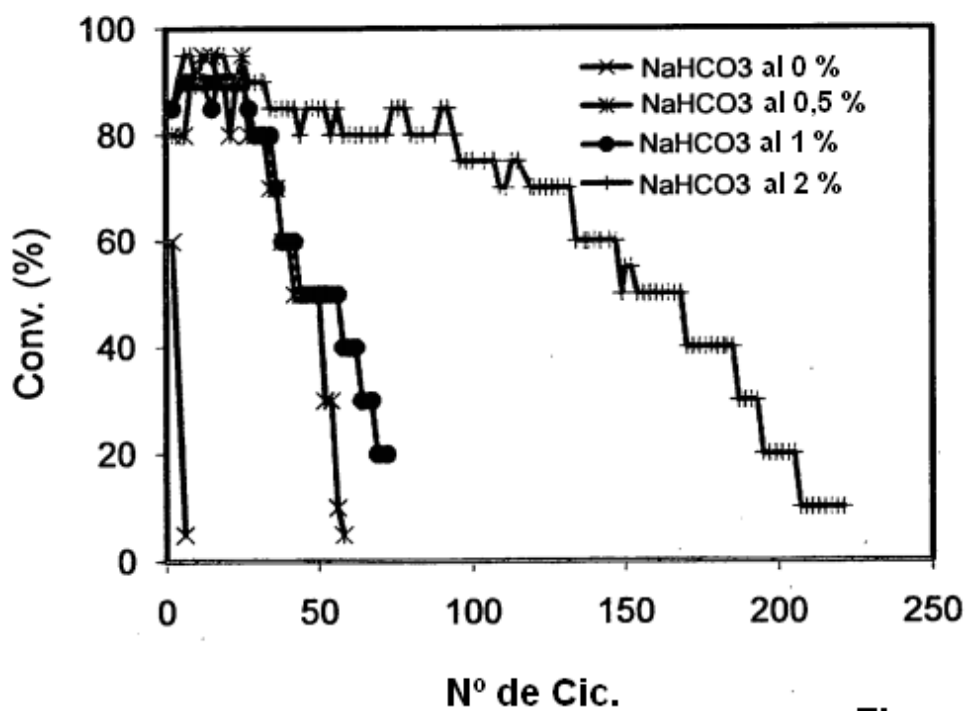


Figura 2

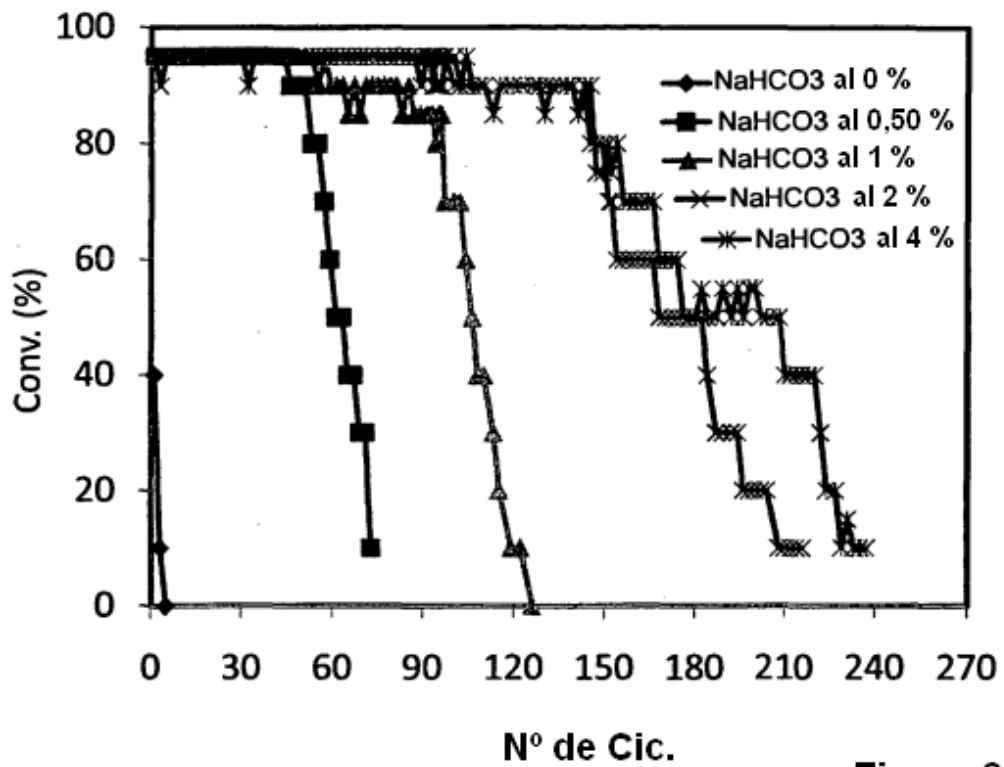


Figura 3

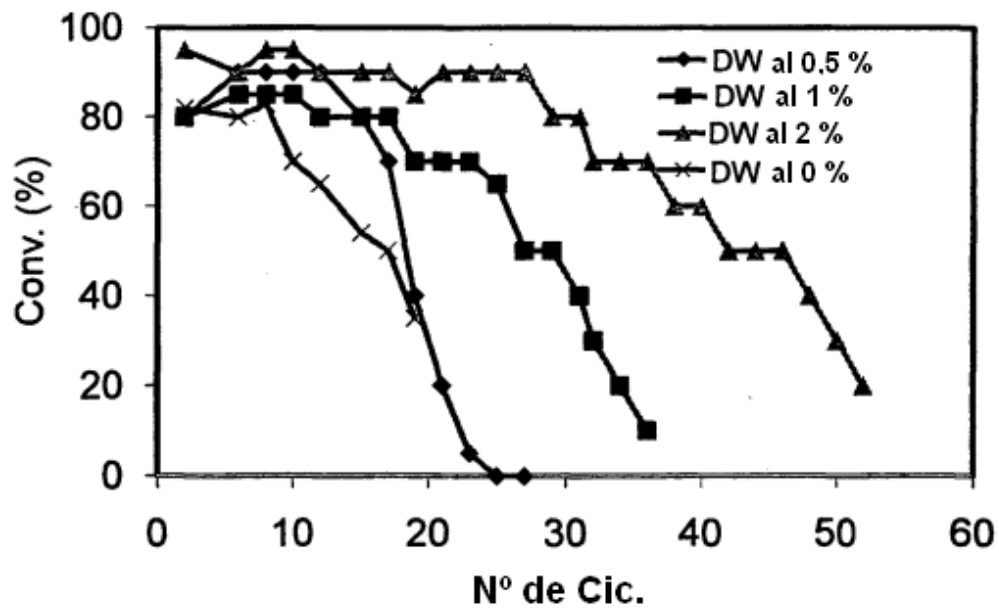


Figura 4

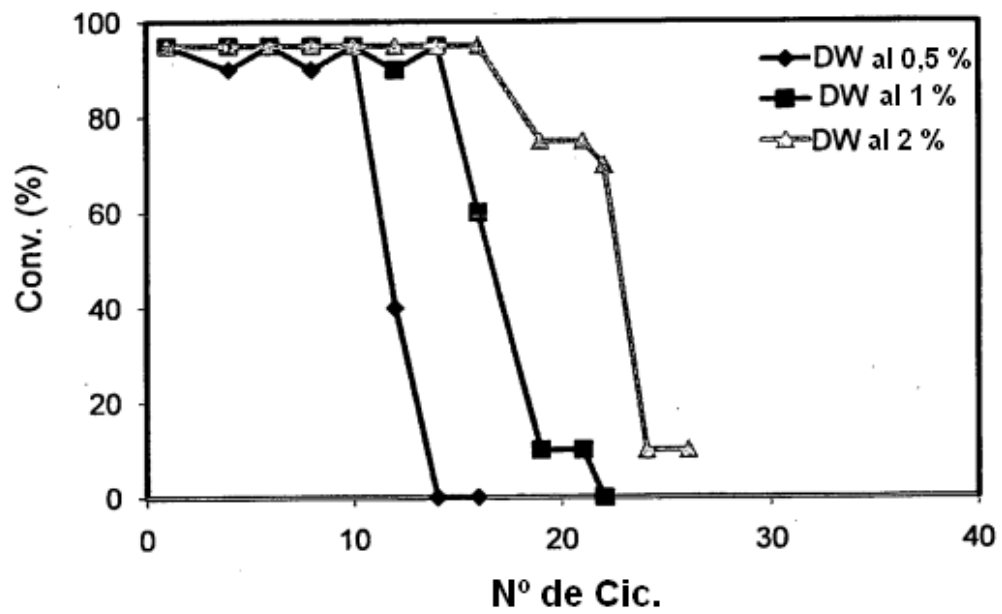


Figura 5

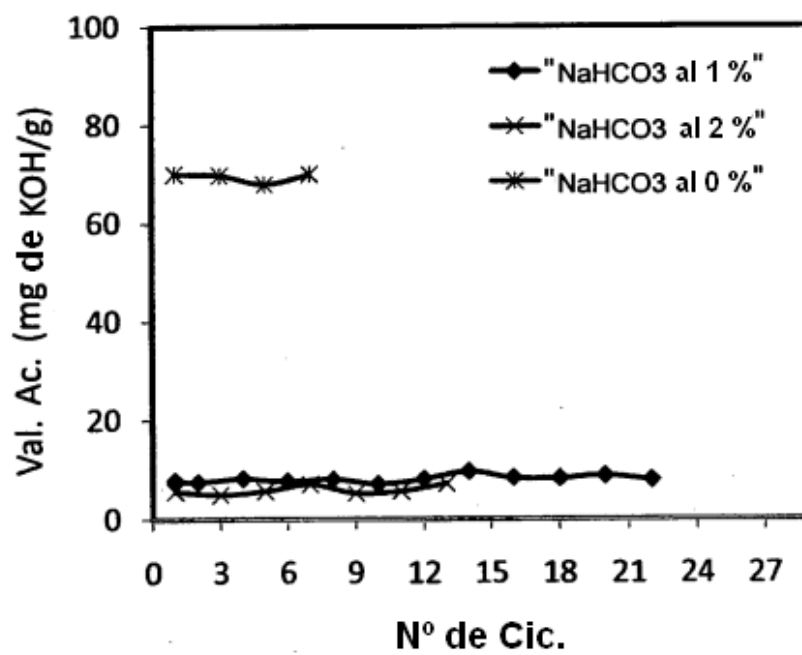


Figura 6

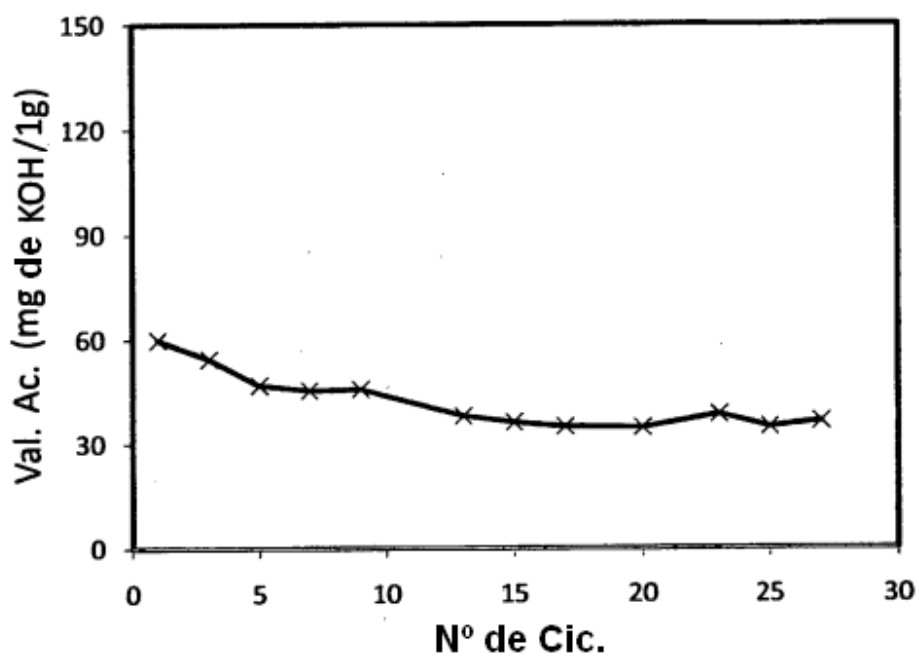


Figura 7

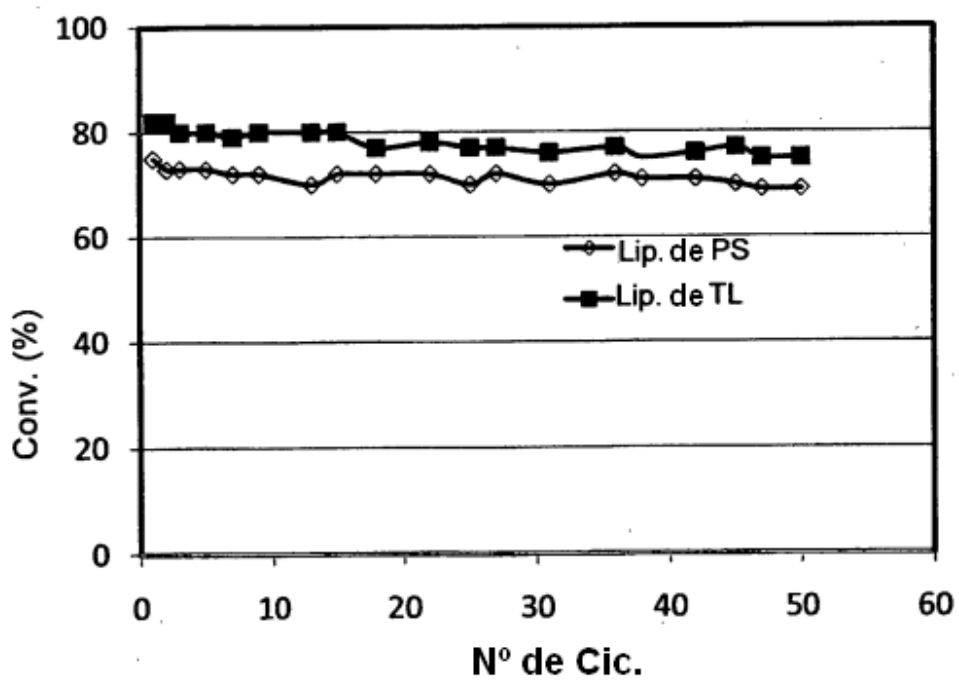


Figura 8

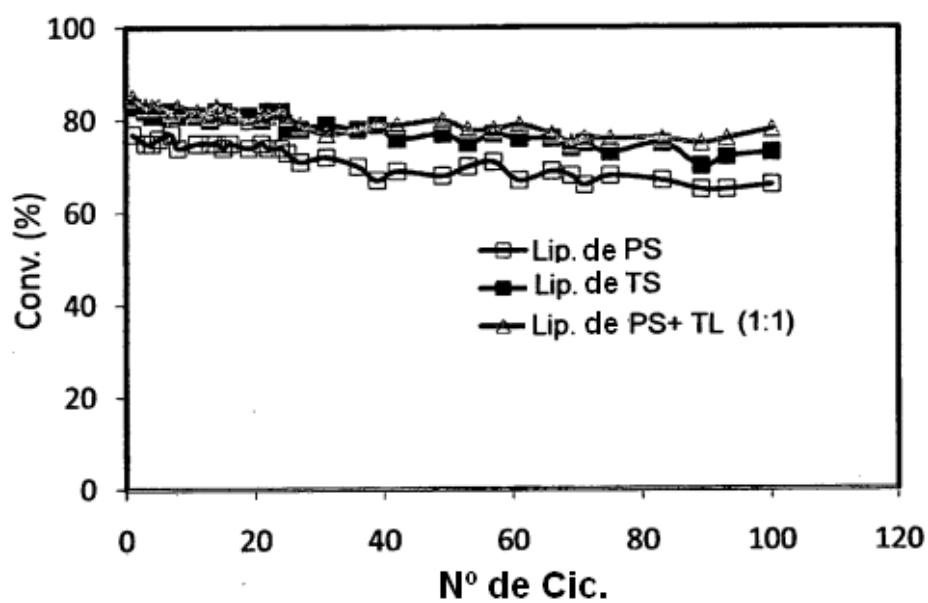


Figura 9

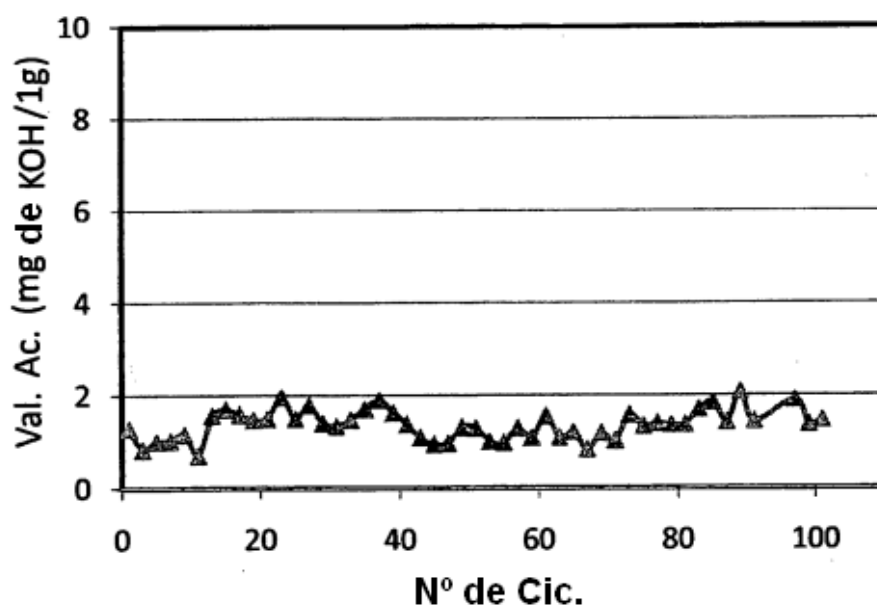


Figura 10

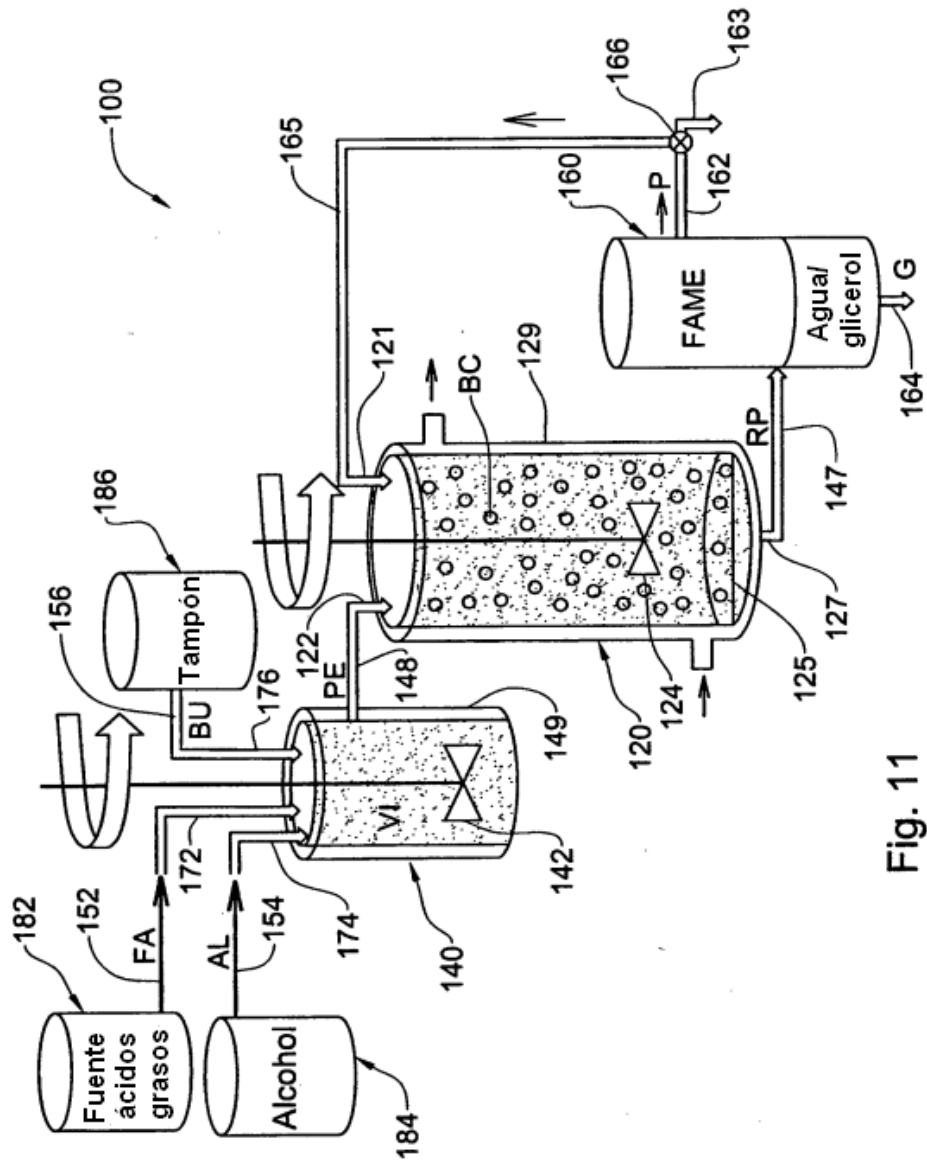


Fig. 11

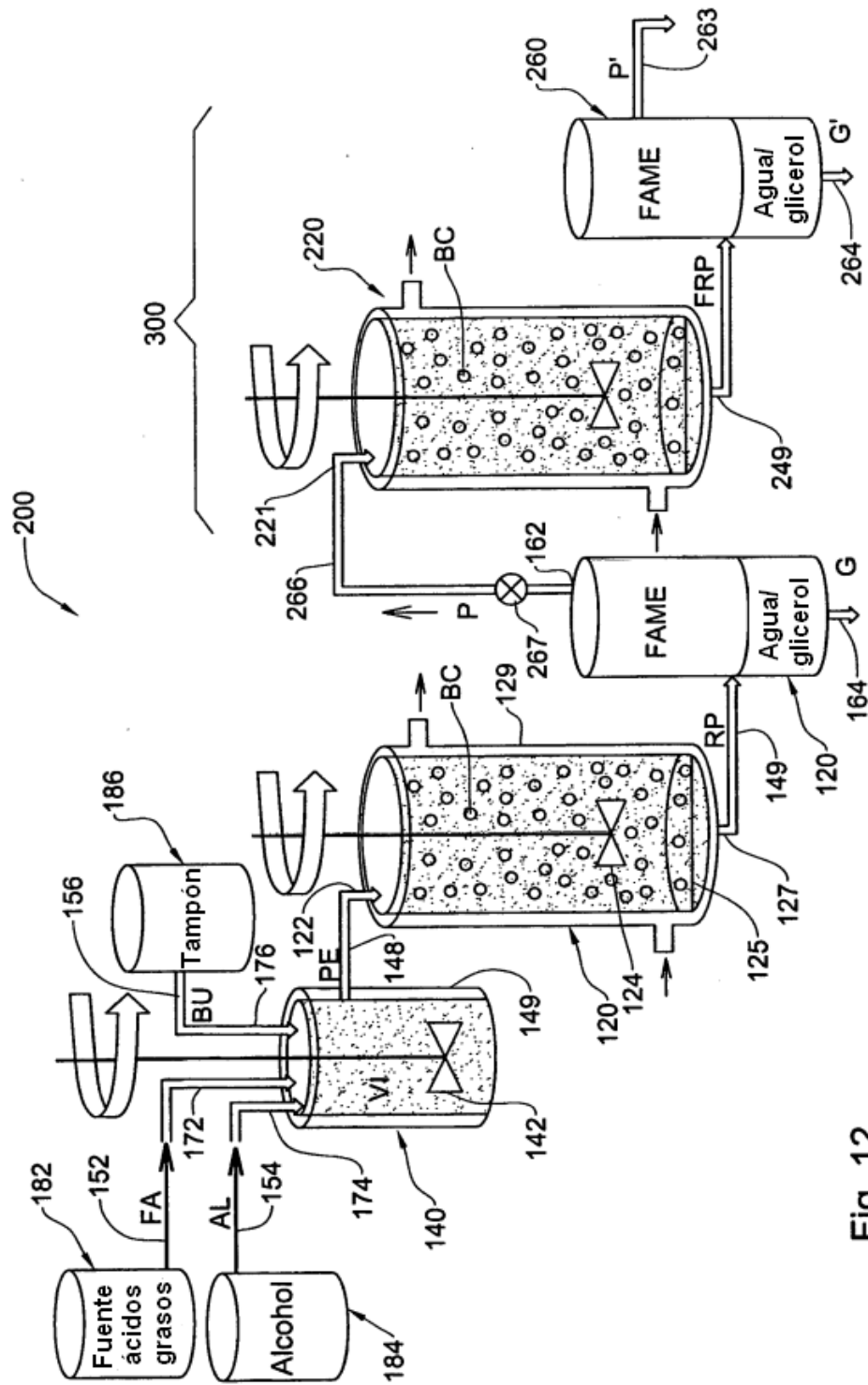


Fig. 12