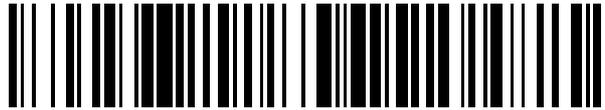


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 469 790**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/64**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2008 E 08854094 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2014 EP 2225385**

54 Título: **Uso de una preparación robusta de multi-enzimas, para la síntesis de ésteres de alquilo de ácidos grasos**

30 Prioridad:

**28.11.2007 US 946121**

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

**20.06.2014**

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 y  
KAIYAL, MUHAMMAD**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 469 790 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

Uso de una preparación robusta de multi-enzimas, para la síntesis de ésteres de alquilo de ácidos grasos

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención, se refiere al uso de un sistema multi-enzimático inmovilizado para la transesterificación o esterificación de aceites, y grasas triglicéridos, o de ácidos grasos, con alcoholes de cadena corta, con objeto de obtener ésteres de alquilo de cadena corta, de una forma preferible, para ser utilizados como biodiésel (biocombustible). La presente invención, se refiere también al uso de tales sistemas multi-enzimáticos inmovilizados, y a sus varios usos industriales, en procedimientos a base de una etapa o de etapas múltiples, de una forma particular, para la producción de ésteres metílicos, usados, de una forma típica, como biodiésel, en conversiones aproximadamente completas.

15 De una forma más particular, las enzimas, son lipasas, las cuales se inmovilizan o de una forma separada o unida, sobre un soporte, el cual es uno cualquiera de entre los soportes a base de polímeros alifáticos hidrofóbicos, o de entre los soportes a base de polímeros aromáticos hidrofóbicos.

20 Antecedentes y trasfondo de la invención

Las lipasas (triacilglicerol hidrolasa E.C. 3.1.3.3), se definen como enzimas hidrolíticas, las cuales actúan sobre el enlace del éster en el triglicérol, en los sistemas acuosos, para proporcionar ácidos grasos libres, glicéridos parciales y glicerol. Este grupo de enzimas, bajo una reducida actividad en agua, es capaz de catalizar su reacción de hidrólisis inversa. La actividad catalítica inversa de la lipasa, se ha venido explotando de una forma muy amplia, para la síntesis de compuestos valiosos que contienen enlace de éster y amida u otros compuestos químicos relacionados, que contengan grupos funcionales, tales como los consistentes en grupos hidroxilo, carboxílico y amino. De una forma particular, las lipasas, se han venido utilizando para reformar las grasas, los aceites, las ceras, los fosfolípidos y los esfingolípidos, con objeto de nuevas propiedades funcionales que se desean, y para separar óptimamente los compuestos óptimamente activos de sus mezclas racémicas. Siendo de un interés particular, el uso de un sistema multi-enzimático el cual esté compuesto por diferentes lipasas inmovilizadas sobre un soporte de polímero, éste se discutirá para la síntesis de los ésteres de alquilo de cadena corta, de ácidos grasos (biodiésel).

En el momento actual, existen más de 40 lipasas y fosfolipasas diferentes, las cuales se encuentran comercialmente disponibles en el mercado, si bien, no obstante, únicamente una pequeña cantidad de éstas, se encuentran preparadas en cantidades comerciales. Algunas de las enzimas interfaciales más prometedoras, desde el punto de vista industrial, son las consistentes en las que se derivan de las *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus niveus*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium camembertii*, *Alcaligenes sp.*, *Burkholderia sp.*, *Thermomyceslanuginosa*, *Chromobacterium viscosum*, semillas de papaya, y pancreatina.

Las técnicas de inmovilización de enzimas que son las más familiares, de una forma general, se dividen entre las que se citan a continuación:

1. La adsorción física de enzimas, a soportes sólidos, tales como los consistentes en la sílice y en los polímeros insolubles.
2. La adsorción sobre resinas de intercambio de iones.
3. El enlace covalente de las enzimas, a un material de soporte sólido, tal como el consistente en soportes inorgánicos epoxidados o en soportes polímeros.
4. El atrapamiento de enzimas en un polímero en crecimiento.
5. El confinamiento de las enzimas en un reactor membranario, o en geles semipermeables.
6. Los cristales o los agregados de reticulación de enzimas.

La adsorción física de las lipasas, basada en el uso de soportes poliméricos provistos de una alta porosidad o en el uso de las resinas de intercambio de iones, son los procedimientos de inmovilización mayormente practicados, para las lipasas. Este procedimiento, se caracteriza por el hecho su simplicidad y por el hecho proporcionar una actividad sintética digna de confianza.

El uso de las lipasas libres o inmovilizadas, para la transesterificación de los triglicéridos y para los alcoholes de cadena corta, para formar ésteres de alquilo de ácidos grasos, ha proporcionado unos resultados que no son satisfactorios, con respecto a la actividad y a la estabilidad de la enzima. Asimismo, también, la efectividad en cuanto a lo referente a los costes de las enzimas inmovilizadas, con objeto de llevar a cabo la producción enzimática de ésteres de alquilo de ácidos grasos, en cantidades industriales, es todavía prohibitivo. De una forma adicional, se ha reportado el hecho de que, la totalidad de las lipasas comercialmente disponibles en el mercado, en el momento actual, bien ya sea en su forma libre o bien ya sea en su forma inmovilizada, son incapaces de alcanzar unos grados de conversión que sean cercanos a las conversiones completas, de una forma preferible, en unos grados de

conversión cercanos a unos porcentajes que se encuentren por encima del 99 %, para los triglicéridos aceitosos, en ésteres de alquilo de ácidos grasos, en unos tiempos de reacción que puedan considerarse como razonables, de una forma particular, en un transcurso de tiempo inferior a 8 horas.

5 Otro inconveniente mayor de las lipasas, es el que resulta de su reducida tolerancia a los substratos hidrofílicos, de una forma particular, a los alcoholes de cadena corta, a los ácidos de cadena corta (ambos, por debajo de C<sub>4</sub>), al agua y a la glicerina, los cuales, se encuentran presentes, de una forma típica, en el medio de reacción de la transesterificación. Se ha observado, en muchos estudios de investigación, el hecho de que, los alcoholes de  
10 cadena corta y los ácidos grasos de cadena corta, tales como el metanol y el ácido acético, respectivamente, son responsables para separar las moléculas de agua, de la estructura cuaternaria de tales tipos de enzimas, conduciendo, con ello, a su desnaturalización y, como consecuencia, a una pérdida de su actividad catalítica. Asimismo, también, la presencia de tales tipos de moléculas hidrofílicas, en el medio de reacción, tiene como resultado una separación de las moléculas de enzima, del soporte y, como consecuencia de ello, a una reducción en  
15 el tiempo de vida operacional de la enzima. Así, por lo tanto, no es sorprendente el hecho de que, las aplicaciones de lipasas para la producción de cantidades comerciales de ésteres metílicos de ácidos grasos "biodiésel", en la que se utilicen triglicéridos aceitosos y metanol, como substratos, no sea susceptible de poderse realizar.

El uso de las mezclas de lipasas, se ha sugerido ya [Lee, D.H. et al., *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, -  
20 *Biotechnology e Ingeniería de Bioprocesos* -, 2006, 11 : 522 - 525]. Esta publicación, describe la producción de biodiésel, mediante la utilización de una mezcla de las lipasas de *Rhizopus oryzae* y *Candida rugosa*, inmovilizadas, químicamente enlazadas. Tal y como puede verse, el tiempo de reacción, era relativamente largo, siendo éste, de una forma típica, el correspondiente a un transcurso de tiempo de más de 24 horas, para alcanzar unos grados de conversión de un porcentaje superior al 96 % para su conversión en biodiésel. Asimismo, también, los resultados presentados en esta publicación, muestran el hecho de que, la mezcla de enzimas utilizadas, perdían un porcentaje  
25 de más de un 20 % de sus actividad inicial, después de un uso correspondiente a un valor tan pequeño como el de 10 ciclos. Esto podría atribuirse a la acumulación de intermediarios glicéridos parciales, en el sistema de reacción, lo cual provoca la reducción de la reacción de transesterificación y, así, de este modo, se prolonga el tiempo de reacción. La desactivación del biocatalizador, en el sistema descrito en esta publicación, es un inconveniente clave, el cual evita su aplicación industrial.

30 Los documentos que se citan a continuación, han reconocido también su aceptación:

- Kim et al., 2007, *Journal of Biotechnology*, Supplement 1, 131 (2): S 123, el cual concierne a la optimización para la  
35 producción de biodiésel, mediante la utilización de una mezcla de las lipasas de *Rheizopus oryzae* y *Candida rugosa*, inmovilizadas;

- Li et al., 2006, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 43: 58-62, el cual concierne a la transesterificación catalizada mediante lipasas, de aceites de colza, para la producción de biodiésel, con un nuevo disolvente orgánico, como medio de reacción;

40 - Ranganathan et al., 2007, *Bioresource Technology*, 99: 3975 - 3981, el cual concierne a una revisión de la producción enzimática de biodiésel;

45 - Soumanou et al., 2003, *Enzyme and Microbial Technology*, 33: 97 – 103, el cual concierne a la mejora en la síntesis catalizada mediante lipasa de los ésteres de metilo de ácidos grasos, en aceite de girasol;

50 - Lee et al., 2008, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18 : 1927 – 1931, el cual trata de la optimización del proceso para la producción de biodiésel, mediante la utilización de una mezcla de lipasas de *Rhizopus oryzae* y *Candida rugosa*, inmovilizadas;

- La patente internacional WO 08 / 084 470, la cual se refiere a las enzimas interfaciales inmovilizadas, con una actividad mejorada y estabilizada;

55 - Basheer et al., 2008, 99th A OCS Annual meeting & Expo, páginas 1 a 5, el cual trata de nuevas lipasas inmovilizadas para la producción de biodiésel; y

60 - Salis et al., 2008, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57 : 262 – 269, el cual trata del rol interpretativo de la superficie de soporte sobre en la carga y la actividad de lipasa de *Pseudomonas fluorescens*, utilizada para la síntesis de biodiésel.

65 Es por lo tanto un objeto de la presente invención, el proporcionar un nuevo procedimiento para la obtención de lipasas inmovilizadas altamente activas y estables, de una forma particular, para la síntesis de ésteres alquílicos de ácidos grasos, de una forma especial, para los ésteres de metilo de ácidos grasos para su uso como "biodiésel" (biocombustible).

Es un objeto adicional de la presente invención, el proporcionar el uso de una preparación de multi-enzimas inmovilizadas, altamente activa y estable, la cual posee una alta tolerancia hacia los alcoholes de cadena corta, y hacia los ácidos grasos de cadena corta, de una forma especial, el metanol, el etanol, y el ácido acético, respectivamente, y otros polioles, tales como el glicerol (glicerina), así como también otros factores inhibitorios, los cuales se encuentran típicamente presentes en aceites y en grasas, de una forma particular, de grado no comestible.

Es un objeto adicional de la presente invención, el proporcionar una configuración del reactor de enzimas, de una etapa o de etapas múltiples, para la obtención del producto deseado, a saber, los ésteres alquílicos de ácidos grasos, a unos grados de conversión cercanos a la conversión completa, durante un transcurso de tiempo de reacción que sea razonable, de una forma típica, que se encuentre por debajo de las 5 horas.

Este y otros objetos de la presente invención, se evidenciarán, a medida que se facilita la descripción.

## RESUMEN DE LA INVENCÓN

En un primer aspecto, la invención, proporciona un procedimiento para la preparación de ésteres de alquilo de ácidos grasos, en un sistema microacuoso exento de disolventes, sistema éste el cual comprende:

- proporcionar una fuente de triglicéridos de ácidos grasos, procediendo a añadir, por etapas, un alcohol libre, o un donante de alcohol, a la citada fuente de ácidos grasos, en presencia de una preparación de lipasas, y - permitir que avance la reacción, bajo unas condiciones que sean apropiadas, hasta que, los citados triglicéridos de ácidos grasos, se hayan convertido en éteres de alquilo de ácidos grasos, en donde, la citada preparación de lipasas, comprende por lo menos dos lipasas, encontrándose, las citadas lipasas, inmovilizadas, de una forma separada, o conjuntamente, sobre un soporte, el cual es uno cualquiera de los soportes consistentes en un soporte a base de polímero alifático y un soporte a base de polímero aromático hidrofóbico, y en donde, por lo menos una de las citadas lipasas, tiene una afinidad incrementada, para los glicéridos parciales, y por lo menos una de las citadas lipasas, es una lipasa de posición específica sn-1,3, en donde, la citada lipasa de posición específica sn-1,3, se selecciona de entre el grupo consistente en *Thermomyces lanuginose*, *Rhizomucor miehei*, *Mucor miehei*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus sp.*, *Mucor javanicus*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger*, *Acromobacter sp.* y *Burkholderia sp.* y, la citada lipasa que tiene una afinidad incrementada para los triglicéridos parciales, se selecciona de entre el grupo consistente en *Candida antarctica B*, *Candida antarctica A*, *Alcaligenes sp.* y *Penicillium camembertii*. De una forma preferible, los ésteres de alquilo de los ácidos grasos, son ésteres de alquilo de ácidos grasos de cadena corta, tales como los consistentes en éteres de metilo de ácidos grasos (biodiésel). De una forma preferible, el alcohol libre, es un alcohol libre de cadena corta, de una forma particular, el metanol. De una forma preferible, se deja que, la reacción, acontezca bajo unas condiciones apropiadas, hasta que, los citados triglicéridos de una fuente de ácidos grasos, se conviertan en ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). De una forma preferible, preparación de la citada lipasa, comprende por lo menos tres lipasas. De una forma opcional, se encuentra incluida una tercera lipasa, la cual tiene una alta selectividad respecto a la posición sn-2 de la cadena de glicerol.

La fuente de ácidos grasos, en el procedimiento en concordancia con la presente invención, puede comprender por lo menos uno, elegido de entre los consistentes en el aceite de soja, el aceite de cáñola, el aceite de colza, el aceite de oliva, el aceite de ricino, el aceite de palma, el aceite de girasol, el aceite de cacahuete, el aceite de semilla de algodón, el aceite de *Jatropha*, las grasas derivadas de animales, el aceite residual de cocción, los triglicéridos de los aceites derivados de fuentes de plantas no comestibles, o cualesquiera mezclas de por lo menos dos de entre éstos.

Las lipasas, pueden inmovilizarse, conjuntamente, sobre un soporte apropiado, a saber, un soporte a base de polímeros alifáticos, hidrofóbicos, o un soporte polimérico aromático, hidrofóbico. Cada uno de las citadas lipasas, puede inmovilizarse sobre un soporte apropiado, en donde, los soportes, sobre los cuales dichas lipasas se encuentran inmovilizados, son idénticos o diferentes.

El soporte es, de una forma preferible, un soporte poroso y, los soportes, pueden contener, de una forma opcional, grupos funcionales activos, seleccionados de entre grupos epoxi ó y grupos aldehído, o grupos iónicos.

En el procedimiento correspondiente a este aspecto de la presente invención, la conversión de los grupos acilo de ácidos grasos o de los ácidos grasos libres, los cuales se encuentran comprendidos en la citada fuente de ácidos grasos, en ésteres metílicos de ácidos grasos, pueden controlarse en varios puntos de tiempo, durante el avance de la reacción, y el medio de reacción, puede retirarse, mediante medios apropiados, en cualquier punto de tiempo que se desee, durante el avance de la reacción, procediéndose, con ello, a parar la reacción, y los ésteres metílicos de ácidos grasos formados y, de una forma opcional, el glicerol formado, preferible, se aíslan del medio de reacción. La reacción, puede pararse, de una forma específica, cuando el grado de conversión de los grupos acilo de ácidos grasos, o los ácidos grasos libres, comprendidos en la citada fuente de ácidos grasos, en ésteres metílicos de ácidos

grasos, haya alcanzado un valor correspondiente a un porcentaje del 70 %, siendo dicho porcentaje, de una forma preferible, de por lo menos un 85 % y, de una forma mayormente preferible, de por lo menos un 95 %.

La presente invención, proporciona, también, un procedimiento para la preparación de los ésteres metílicos de ácidos grasos (biodiésel), en un sistema micro-acuoso exento de disolventes; proporcionando una fuente de triglicéridos de ácidos grasos, procediendo a añadir metanol, por etapas, a la citada fuente de ácidos grasos, en presencia de una preparación de lipasas, y dejando que, la reacción, avance bajo unas condiciones apropiadas, hasta que el grado de conversión de los grupos acilo de ácidos grasos, comprendida en la citada fuente de ácidos grasos, en ésteres metílicos de ácidos grasos, alcance un porcentaje de por lo menos un 70 %, en donde, la citada preparación de lipasas, comprende una lipasa inmovilizada, individual, inmovilizada sobre un soporte, o una mezcla de por los menos dos lipasas, inmovilizadas de una forma conjunta o por separado, sobre un soporte, en donde, el citado soporte, es uno cualquiera de los soportes a base de polímeros alifáticos hidrofóbicos, y un soporte a base de polímero aromático, hidrofóbico.

Asimismo, además, en el procedimiento correspondiente a este aspecto, la citada preparación de lipasas, puede comprender por los menos dos lipasas, de una forma preferible, tres lipasas, encontrándose, las citadas lipasas, inmovilizadas de una forma separada, o inmovilizadas de una forma conjunta, sobre un soporte apropiado. Por los menos una de las citadas lipasas, tiene una afinidad incrementada para los glicéridos parciales, y por lo menos una de las citadas lipasas, es una lipasa de posición específica sn-1,3. Una tercera lipasa opcional, tiene, de una forma preferible, una mayor selectividad hacia la posición sn-2, que las lipasas aleatorias.

La lipasa de posición específica sn-1,3, puede ser, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstas, una cualquiera de entre las lipasas consistentes en las *Thermomyces lanuginose*, *Rhizomucor miehei*, *Mucor miehei*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus sp.*, *Mucor javanicus*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger*, *Acromobacter sp.* y *Burkholderia sp.* La citada lipasa que tiene una afinidad incrementada para los glicéridos parciales, puede ser, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstas, una cualquiera de entre las consistentes en *Candida antarctica B*, *Candida rugosa*, *Alcaligenes sp.* and *Penicillium camembertii*, y la citada tercera lipasa opcional, que tenga una mayor selectividad hacia la posición sn-2, que las lipasas aleatorias, puede ser, si bien de una forma no limitativa en cuanto a éstas, una lipasa derivada de la *Candida antarctica A* y *Pseudozyma sp.*

Asimismo, además, en este procedimiento la fuente de ácidos grasos, puede comprender por lo menos uno, elegido de entre los consistentes en el aceite de soja, el aceite de cáñola, el aceite de colza, el aceite de oliva, el aceite de ricino, el aceite de palma, el aceite de girasol, el aceite de cacahuate, el aceite de semilla de algodón, el aceite de *Jatropha*, las grasas derivadas de animales, el aceite residual de cocción, los triglicéridos de los aceites derivados de fuentes de plantas no comestibles, o cualesquiera mezclas de por los menos dos de entre éstos.

Las lipasas, pueden inmovilizarse, conjuntamente, sobre un soporte apropiado, a saber, un soporte a base de polímeros alifáticos, hidrofóbicos, o un soporte polimérico aromático, hidrofóbico. Cada uno de las citadas lipasas, puede inmovilizarse sobre un soporte apropiado, en donde, los soportes, sobre los cuales dichas lipasas se encuentran inmovilizados, son idénticos o diferentes.

El soporte es, de una forma preferible, un soporte poroso y, los soportes, pueden contener, de una forma opcional, grupos funcionales activos, seleccionados de entre grupos epoxi ó y grupos aldehído, o grupos iónicos.

Asimismo, también, en este procedimiento, la conversión de los grupos acilo de ácidos grasos o de los ácidos grasos libres, los cuales se encuentran comprendidos en la citada fuente de ácidos grasos, en ésteres metílicos de ácidos grasos, pueden controlarse en varios puntos de tiempo, durante el avance de la reacción, y el medio de reacción, puede retirarse, mediante medios apropiados, en cualquier punto de tiempo que se desee, durante el avance de la reacción, procediéndose, con ello, a parar la reacción, y los ésteres metílicos de ácidos grasos formados y, de una forma opcional, el glicerol formado, preferible, se aíslan del medio de reacción. La reacción, puede pararse, de una forma específica, cuando el grado de conversión de los grupos acilo de ácidos grasos, o los ácidos grasos libres, comprendidos en la citada fuente de ácidos grasos, en ésteres metílicos de ácidos grasos, haya alcanzado un valor correspondiente a un porcentaje del 70 %, siendo dicho porcentaje, de una forma preferible, de por lo menos un 85 % y, de una forma mayormente preferible, de por lo menos un 95 %.

En todavía otro aspecto, la presente invención, proporciona un procedimiento microacuoso, exento de disolventes, para la preparación de ésteres de alquilo, de ácidos grasos, de cadena corta, el cual comprende:

(a) proporcionar una fuente de triglicéridos de ácidos grasos, procediendo a añadir, por etapas, un alcohol de cadena corta, o cualquier otro donante de alcohol de cadena corta, a la citada fuente de ácidos grasos, en presencia de una preparación de lipasas, y permitir que avance la reacción, bajo unas condiciones que sean apropiadas, hasta que, el grado de conversión de los grupos acilo de ácidos grasos, comprendida en la citada fuente de ácidos grasos, en ésteres alquílicos de cadena corta de ácidos grasos, alcance un porcentaje de por lo menos un 70 %, en donde, la citada preparación de lipasas, comprende por lo menos una lipasa inmovilizada, individual, inmovilizada sobre un soporte, o una mezcla de por los menos dos lipasas, inmovilizadas de una forma conjunta o por separado, sobre un

soporte, en donde, cada uno de los citados soportes, es uno cualquiera de los soportes a base de polímeros alifáticos hidrofóbicos, y un soporte a base de polímero aromático, hidrofóbico, al mismo tiempo que se elimina de una forma continua la glicerina formada a partir de la mezcla de reacción, para proporcionar una fase orgánica que contiene principalmente glicéridos residuales, no reaccionados, y los ésteres alquílicos de cadena corta de ácidos grasos, formados; y

(b) hacer reaccionar la citada fase orgánica con un alcohol libre de cadena corta, o cualquier otro donante de alcohol, en presencia de una preparación de lipasas, según se define en la etapa (a), bajo unas condiciones que sean apropiadas, hasta que el grado de conversión de los grupos acilo de ácidos grasos, comprendidos en la citada fuente de ácidos grasos, en ésteres metílicos de ácidos grasos, alcance un porcentaje de por lo menos un 95 %.

De una forma preferible, los ésteres alquílicos o ácidos grasos, de cadena corta, son ésteres de metilo (biodiésel). De una forma preferible, el alcohol de cadena corta, es el metanol. De una forma preferible, se emplea una mezcla de por lo menos tres lipasas.

Las lipasas, las preparaciones de lipasas, el soporte de enzimas, la fuente de ácidos grasos, en el procedimiento en concordancia con este aspecto de la presente invención, son similares a los que se utilizan en otros aspectos.

Todavía de una forma adicional, la invención, proporciona, también, un procedimiento para la preparación de una mezcla de lipasas, inmovilizadas sobre un soporte insoluble, cuando se utilizan en el procedimiento de la invención, comprendiendo, la citada mezcla de lipasas, una lipasa derivada de la *Candida antarctica B*, y por lo menos una lipasa derivada de las *Pseudomonas sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Burkholderia sp.*, y *Thermomyces lanuginosa.*, comprendiendo, el procedimiento, las etapas de:

(a) poner en contacto una solución tampón que contiene una lipasa derivada de la *Candida antarctica B*, y por lo menos una lipasa derivada de las *Pseudomonas sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Burkholderia sp.*, y *Thermomyces lanuginosa*, con un soporte polimérico, el cual sea uno de entre el soporte a base de polímeros alifáticos, hidrofóbicos, y el soporte a base de polímeros aromáticos, hidrofóbicos;

(b) mezclar el sistema obtenido en la etapa (a), durante un transcurso de tiempo de por lo menos 4 horas, a la temperatura ambiente;

(c) filtrar la mezcla de lipasas inmovilizadas, y secar éstas, a un contenido de agua de menos de un porcentaje del 5%.

El soporte polimérico, es una resina intercambiadora de iones o un adsorbente; de una forma más particular, éste es un soporte a base de polímeros, alifáticos, hidrofóbicos, o a base de polímeros, aromáticos, hidrofóbicos. De una forma preferible, el poner en contacto la solución tampón, en presencia de un disolvente orgánico, hidrofóbico, en presencia de un disolvente orgánico, tal como el n-hexano, se realiza añadiéndolo, al medio de inmovilización, a unos factores de relación, correspondientes a unos valores comprendidos dentro de unos márgenes que van desde 1 : 10 hasta 10 : 1, respectivamente, del tampón, con respecto al disolvente orgánico.

El soporte insoluble utilizado en este aspecto de la invención es, de una forma preferible, un soporte poroso y reticular a base de polímeros alifáticos ó aromáticos, hidrofóbicos, de una forma particular, Amberlite XAD 7 HP ó Amberlite XAD 1600, respectivamente.

Los citados ésteres de alquilo de cadena corta, de ácidos grasos son, en todos los aspectos de la presente invención, de una forma preferible, ésteres de metilo, de etilo, de iso-propilo, o de butilo, de ácidos grasos (biodiésel).

En todavía otro aspecto, la presente invención, proporciona un procedimiento para la preparación de ésteres de alquilo de cadena corta, de ácidos grasos, en un sistema exento de disolventes, el cual comprende: proporcionar una fuente de triglicéridos de ácidos grasos, procediendo a añadir, por etapas, un alcohol libre de cadena corta, o cualquier otro donante de alcohol de cadena corta, a la citada fuente de ácidos grasos, en presencia de una preparación de lipasas, y permitir que avance la reacción, bajo unas condiciones que sean apropiadas, hasta que, la citada fuente de triglicéridos de ácidos grasos, se haya convertido en ésteres alquílicos de cadena corta, de ácidos grasos, en donde, la citada preparación de lipasas, comprende una primera lipasa y una segunda lipasa, encontrándose, las citadas lipasas, inmovilizadas sobre un soporte hidrofóbico, de una forma conjunta o por separado, el cual es uno cualquiera de los soportes a base de polímeros alifáticos hidrofóbicos, y soportes a base de polímeros aromáticos, hidrofóbicos, y en donde, la citada primera lipasa, exhibe una mayor actividad de transesterificación hacia los triglicéridos, en comparación con su actividad hacia los glicéridos parciales y, la citada segunda lipasa, exhibe una mayor actividad de transesterificación hacia los glicéridos parciales, en comparación con su actividad hacia los triglicéridos, y en donde, las citadas dos lipasas, muestran un efecto sinérgico, en su actividad de transesterificación, para obtener el producto final.

De una forma preferible, el procedimiento, es para la preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos. De una forma preferible, el alcohol libre de cadena corta, es metanol. De una forma preferible, se deja que la reacción avance bajo unas condiciones que sean apropiadas, hasta que, la citada fuente de triglicéridos de ácidos grasos, se haya convertido en ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME).

En aún todavía otro aspecto, la presente invención, proporciona un procedimiento para la preparación de ésteres de alquilo de cadena corta, de ácidos grasos, en un sistema exento de disolventes, el cual comprende: proporcionar una fuente de triglicéridos de ácidos grasos, procediendo a añadir, por etapas, un alcohol libre de cadena corta, o cualquier otro donante de alcohol de cadena corta, a la citada fuente de ácidos grasos, en presencia de una preparación de lipasas, y permitir que avance la reacción, bajo unas condiciones que sean apropiadas, hasta que, la citada fuente de triglicéridos de ácidos grasos, se haya convertido en ésteres alquílicos de cadena corta, de ácidos grasos, en donde, la citada preparación de lipasas, comprende una primera lipasa y una segunda lipasa, encontrándose, las citadas lipasas, inmovilizadas sobre un soporte hidrofóbico, de una forma conjunta o por separado, el cual es uno cualquiera de los soportes a base de polímeros alifáticos hidrofóbicos, y soportes a base de polímeros aromáticos, hidrofóbicos, y en donde, la citada primera lipasa, libera intermediarios que son por lo menos uno de los monoglicéricos y diglicéridos, en un primer soporte a base de polímeros de la reacción de transesterificación, los cuales se favorecen mediante la citada segunda lipasa para la transesterificación, con un alcohol, para formar ésteres alquílicos de ácidos grasos. De una forma preferible, el procedimiento, es para la preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos. De una forma preferible, el alcohol libre de cadena corta, es metanol. De una forma preferible, se deja que la reacción avance bajo unas condiciones que sean apropiadas, hasta que, la citada fuente de triglicéridos de ácidos grasos, se haya convertido en ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME).

La invención, proporciona, de una forma adicional, un procedimiento para la preparación de ésteres de alquilo de cadena corta, de ácidos grasos, en un sistema exento de disolventes, el cual comprende: proporcionar una fuente de triglicéridos de ácidos grasos, procediendo a añadir, por etapas, un alcohol libre de cadena corta, o cualquier otro donante de alcohol de cadena corta, a la citada fuente de ácidos grasos, en presencia de una preparación de lipasas, y permitir que avance la reacción, bajo unas condiciones que sean apropiadas, hasta que, la citada fuente de triglicéridos de ácidos grasos, se haya convertido en ésteres alquílicos de cadena corta, de ácidos grasos, en donde, la citada preparación de lipasas, comprende una primera lipasa y una segunda lipasa, encontrándose, las citadas lipasas, inmovilizadas sobre un soporte hidrofóbico, de una forma conjunta o por separado, el cual es uno cualquiera de los soportes a base de polímeros alifáticos hidrofóbicos, y soportes a base de polímeros aromáticos, hidrofóbicos, y en donde, las citadas lipasas, exhiben diferentes especificidades de los substratos, las cuales mantienen su actividad de transesterificación, a los triglicéridos, cuando se utilizan conjuntamente, mientras que, por lo menos una de las citadas dos lipasas, se descompone, en el medio de transesterificación, cuando se utilizan de una forma separada con los triglicéridos, como substrato, pero exhibe una alta actividad de transesterificación / esterificación, con los glicéridos parciales y los ácidos grasos, como substratos, de una forma respectiva. De una forma preferible, el procedimiento, es para la preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos. De una forma preferible, De una forma preferible, el alcohol libre de cadena corta, es metanol. De una forma preferible, se deja que la reacción avance bajo unas condiciones que sean apropiadas, hasta que la citada fuente de triglicéridos de ácidos grasos, se haya convertido en ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME).

La fuente de ácidos grasos, es por lo menos uno de entre los triglicéridos, los glicéridos parciales, los ácidos grasos libres, los fosfolípicos, los ésteres y las amidas de ácidos grasos, o una mezcla que comprenda por lo menos dos de las citadas fuentes.

El soporte, puede ser un polímero hidrofóbico reticular el cual comprende divinilbenceno, o una mezcla de divinilbenceno y estireno, y un polímero alifático hidrofóbico, el cual comprende polímeros acrílicos alifáticos. El soporte, de una forma preferible, es una matriz porosa, de un tamaño de poro correspondiente a un rango comprendido dentro de unos márgenes de 25 – 100 Å.

La invención, se describirá, en mayor detalle, por mediación de los dibujos que se encuentran anexos.

#### Descripción resumida de las figuras

Figura 1: En este gráfico, se encuentran representadas la actividad de esterificación de las CALB, Lipasa PS, Lipasa TL, todas ellas inmovilizadas, de una forma separada, en Amberlite XAD 7HP. Condiciones de reacción : Se procedió a mezclar ácido oleico (2,5 g), y metanol (3 lotes, cada uno de ellos, de un peso de 95 mg), con 250 mg de lipasa inmovilizada, a una temperatura de 30 °C, durante un transcurso de tiempo de 6 horas. El mismo lote de biocatalizador, se utilizó en 50 ciclos de reacción, bajo las mismas reacciones.

Figura 2: En este gráfico, se encuentran representadas la actividad de transesterificación de las CALB, Lipasa PS, Lipasa TL, todas ellas inmovilizadas, de una forma separada, en Amberlite XAD 7HP. Condiciones de reacción : Se procedió a mezclar aceite de soja (2,5 g), y metanol (3 lotes, cada uno de ellos, de un peso de 91 mg), con 250 mg

de lipasa inmovilizada, a una temperatura de 30 °C, durante un transcurso de tiempo de 6 horas. El mismo lote de biocatalizador, se utilizó en 50 ciclos de reacción, bajo las mismas reacciones.

5 Figura 3: En este gráfico, se encuentra representada la actividad de transesterificación de la multi-lipasa inmovilizada en Amberlite XAD 7HP, para, bien ya sea la CALB y la lipasa TL, o bien ya sea la CALB y la lipasa PS. Condiciones de reacción : Se procedió a mezclar aceite de soja (2,5 g), y metanol (3 lotes, cada uno de ellos, de un peso de 91 mg), con 250 mg de lipasa inmovilizada, a una temperatura de 30 °C, durante un transcurso de tiempo de 6 horas. El mismo lote de biocatalizador, se utilizó en 50 ciclos de reacción, bajo las mismas reacciones.

10 Figura 4: En este gráfico, se encuentra representado el porcentaje de FAME %, en el proceso de transesterificación en dos etapas, mediante la utilización de lipasa PSO y CALB, ambas inmovilizadas en Amberlite XAD 7HP. Condiciones de reacción : la reacción, se inició por mediación de la adición de biocatalizador (30 g), a aceite de soja (220 g), y alcohol metílico (23,9 g), en un reactor de vidrio, provisto de doble pared, con un filtro de vidrio sinterizado, en su fondo, de una porosidad correspondiente a un espesor correspondiente a un valor de 70 – 100 µm. El metanol, se añadió en lotes, siendo, cada lote, de un valor de 1 / 3 de la cantidad estequiométrica, o mediante forma de goteo, procediendo a su titración. El sistema de reacción, se agita por medios mecánicos, a una temperatura de 30 °C, durante un transcurso de tiempo de 2 horas. El medio de reacción, se retiró de la primera etapa, éste se centrifugó, para retirar el glicerol (glicerina) y, a continuación, se introdujo en el reactor de la segunda etapa, y procedió agitar, durante un transcurso de tiempo de dos horas.

#### 20 Descripción detallada de la invención

Con objeto de mejorar y de facilitar la producción enzimática de biodiésel, la presente invención, se encuentra principalmente dirigida a prevenir la desactivación de las enzimas, o la pérdida de actividad enzimática, debida a la separación de la enzima inmovilizada, del soporte sobre el cual se encuentra ésta inmovilizada, lo cual, de una forma usual, es el resultado de la exposición, bien ya sea en metanol, el cual es uno de los materiales de partida, o bien ya sea de la exposición al glicerol (glicerina) y el agua formada en el proceso. La lipasa “Novozyme 435 lipase” (lipase B de *Candida Antarctica*) inmovilizada en un adsorbente, el cual se ha venido utilizando en el pasado, se caracteriza por el hecho de su pérdida de actividad, después de una cantidad de ciclos de reacción, tan pequeña como la correspondiente a 10 ciclos de reacción, de media, debido al anteriormente citado deterioro de la actividad de la enzima. Es una finalidad de la presente invención, el solventar este problema.

Adicionalmente, además, con objeto de alcanzar unos grados de conversión que sean superiores a un porcentaje del 96 %, el tiempo de la reacción de transesterificación, es relativamente largo, siendo éste, de una forma típica, el correspondiente a un transcurso de tiempo de 24 – 48 horas, con la citada Novozyme 435, así como también con otras lipasas. Es también un objeto de la presente invención, el proporcionar un procedimiento, el cual pueda acortar, de una forma considerable, el tiempo de reacción.

Adicionalmente, además, el producto secundario consistente en el glicerol, formado en el proceso, conduce al deterioro de la actividad de la enzima, debido al hecho de que ésta se mantiene en las partículas de biocatalizador. La adherencia del glicerol (glicerina) en los biocatalizadores, conduce a la disminución y, algunas veces, incluso a pérdida total de la actividad enzimática. El procedimiento de la presente invención, está también dirigido a solucionar este problema.

Adicionalmente, además, cabe citar que, en los trabajos correspondientes al arte anterior de la técnica especializada, se utilizaba lipasas, las cuales conducían a la formación y la acumulación de glicéridos parciales, incluyendo a los mono- y a los di- glicéridos, en el sistema de reacción. Las reducidas tasas de reacción para la transesterificación de tales tipos de lipasas, para aquellos substratos, tenían como resultado una prolongación del tiempo de reacción necesario para alcanzar unos grados de conversión superiores a un porcentaje del 96 %. La presente invención, se refiere a preparaciones enzimáticas, a sistemas y procedimientos los cuales facilitan una alta tasa de acreditación, para los intermediarios formados durante el transcurso de la transesterificación enzimática y, así, por lo tanto, alcanzando un alto grado de conversión, en unos transcurros de tiempo que son relativamente cortos.

De una forma más específica, la presente invención, proporciona el uso de un sistema multi-enzima, en procedimientos de una etapa o de dos etapas, el cual supera los obstáculos anteriormente citados, arriba, proporcionando unos resultados inesperados, y exhibiendo una sinergia entre las enzimas inmovilizadas y evitando la desactivación enzimática o pérdida de la actividad enzimática, y también, debido a las combinaciones eficientes de ambas, la matriz de lipasa - lipasa y la matriz de lipasa.

Los presentes inventores, han desarrollado así, de este modo, unas preparaciones de enzimas inmovilizadas, altamente activas y estables, las cuales tienen una alta tolerancia hacia los substratos hidrofílicos, tales como los alcoholes de cadena corta, los polioles y los ácidos grasos de cadena corta, para mejorar los procesos enzimáticos para la producción de ésteres de alquilo de ácidos grasos, de una forma específica, los ésteres metílicos de ácidos grasos “biodiésel”. Adicionalmente, además de la descripción facilitada anteriormente, arriba, en el resumen de la

invención, también facilitada anteriormente, arriba, la mezcla de lipasas, puede también encontrarse compuesta por más de dos lipasas, siendo ésta, de una forma preferible, una mezcla de tres lipasas, en donde, una primera lipasa, tiene una especificidad posicional sn-1,3, una segunda lipasa, tiene selectividad hacia las posición sn-2, superior que la de las lipasas aleatorias, de una forma particular, lipasas aleatorias derivadas de la *Candida rugosa*, y una tercera lipasa, la cual tiene una afinidad incrementada hacia los mono- y di- glicéridos.

Debe también tomarse debida nota, en cuanto al hecho de que, a lo largo de este documento de solicitud de patente, cuando se hace referencia a las posiciones sn—1, sn-2 ó sn-3, éstas son posiciones, en la cadena de glicerol de varios glicéridos.

El significado de una lipasa que tiene una selectividad hacia la posición sn-2, la cual es mayor que la de las lipasas aleatorias, es que, tales tipos de enzimas, catalizan la reacción entre el alcohol o donante de alcohol, con el grupo acilo graso de la posición sn-2, mientras que, las lipasas aleatorias, exhiben la misma actividad de transesterificación para los grupos acilo grasos, en la totalidad de las tres posiciones, en la cadena de glicerol.

Tal y como se muestra en los Ejemplos que se facilitan más abajo, a continuación (como, por ejemplo, la referencia a la Candida Antarctica A (CALA), algunas enzimas, únicamente exhiben una actividad posicional, en la posición sn-2, especialmente, bajo unas condiciones específicas determinadas mediante los substratos, los productos, etc. Las enzimas que se utilizan aquí, en esta capacidad, muestran una selectividad posicional sn-2, y una capacidad, para transesterificar los glicéridos parciales sn-2.

El biocatalizador desarrollado, se compone de una mezcla de lipasas de diferentes tipos, inmovilizadas sobre una matriz polimérica, de una forma preferible, una matriz porosa, a base de un polímero reticular, alifático o aromático, hidrofóbico. En concordancia con la presente invención, pueden inmovilizarse diferentes lipasas en el mismo recipiente de reacción, o de una forma separada, sobre el mismo soporte o sobre distintos soportes, en dependencia a la mejor combinación de enzima – soporte, con respecto a la resistencia a los alcoholes de cadena corta, la actividad de esterificación / transesterificación el tiempo de vida operacional para el biocatalizador. La mezcla de lipasas en concordancia con la presente invención, comprende una lipasa la cual es específica de la posición sn-1,3, conjuntamente con una lipasa aleatoria, de una específica, una lipasa la cual tenga afinidad a los glicéridos parciales y, opcionalmente, una tercera lipasa con una alta afinidad a la posición sn-2.

La lipasa de posición específica sn-1,3, puede ser, aunque no de una forma limitativa en cuanto a ésta, la consistente en *Thermomyces lanuginose*, *Rhizomucor miehei*, *Mucor miehei*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus sp.*, *Mucor javanicus*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger*, *Acromobacter sp.* ó la *Burkholderia sp.* La lipasa con especificidad hacia la posición sn-2, mayor que la de las lipasas aleatorias, puede ser, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstas, la lipasa *Candida antarctica A*, y la lipasa derivada de la *Pseudozyma sp.* La lipasa que tiene una afinidad incrementada para los glicéridos parciales, puede ser, pero no de una forma limitativa en cuanto a éstas, una de las consistentes en *Candida antarctica B*, *Candida rugosa*, *Alcaligenes sp.* ó *Penicillium camembertii*. Otras lipasas que se contemplan en el ámbito de la presente solicitud de patente, pueden ser las consistentes en las *Rhizopus niveus*, *Rhizopus oryzae*, *Burkholderia sp.*, *Chromobacterium viscosum*, semillas de papaya o pancreatina.

La inmovilización de las diferentes lipasas, puede llevarse a cabo, bien ya sea en directamente, en el mismo recipiente ("one pot"), o bien ya sea de una forma separada.

El soporte insoluble, es capaz de unir ambas lipasas, mediante una adsorción física, o mediante una unión o enlace covalente, a sus grupos funcionales. Los términos "físicamente adsorbidos" ( o físicamente adsorbidas) o "adsorción física", tal y como se utiliza aquí, en este documento, pueden ser términos sinónimos a los términos "inmovilizada"(o inmovilizados) e "inmovilización", de una forma respectiva. Los soportes seleccionados de entre el grupo consistente en un soporte a base de polímeros alifáticos hidrofóbicos, o en un soporte a base de polímeros aromáticos hidrofóbicos, tales como los consistentes en los Amberlite® XAD 7HP y Amberlite® R XAD 1600, de una forma respectiva, en donde, el citado soporte, puede contener, de una forma opcional, grupos funcionales activos, tales como los grupos epoxi ó aldehído, o grupos iónicos. Los ejemplos específicos no limitativos de soportes apropiados, son los consistentes en un Amberlite XAD, tal como los Amberlite XAD 4, XAD 16, XAD-1600, XAD 7HP, XAD 16HP, XAD 1180, Amberlite FPA53, Amberlite FPC22H, Amberlite FPA40Cl, Amberlite IRC50, un Duolite, tal como los A7, A561, A568 y Duolite C467, Amberlyst A-21, Dowex Monosphere 77, Dowex Optipore L493, Dow Styrene DVB, MTO Dowex Optipore SD-2, Dowex MAC-3, Purolire A109, y Sepabeads tales como los EC - EA, EC - EP, EC - BU y EC - OD. Los soportes preferidos, son aquellos que están compuestos por polímeros aromáticos reticulares hidrofóbicos, compuestos por divinilbenceno ó por divinilbenceno y estireno, y polímeros alifáticos hidrofóbicos, compuestos por polímeros acrílicos alifáticos reticulares.

En un aspecto adicional, la invención, proporciona un procedimiento para la preparación de diodésel, de la forma que se detalla en el resumen de la invención.

Adicionalmente, además, en el procedimiento para la preparación de biodiésel en concordancia con la presente invención, puede existir una retirada continua de la totalidad de los productos de la reacción, o de algunos de los productos de la reacción y / o de la totalidad o de algunos de los productos secundarios. los cuales se auto-absorben del soporte de la enzima. La auto-desorción o desorción espontánea del producto / productos secundarios apartados del soporte que porta la enzima o las enzimas, es una propiedad única de los sistemas de enzimas inmovilizadas de la presente invención. Sin pretender ligarlo a ninguna teoría en particular, esta característica, puede deberse a la naturaleza hidrofóbica de la matriz, la cual es responsable de la acción de repeler el glicerol (glicerina) formado, o cualesquiera otras substancias hidrofílicas, de las proximidades del biocatalizador inmovilizado. El procedimiento enzimático dado a conocer, puede llevarse a cabo, bien ya sea en una etapa, o bien ya sea en dos etapas, con objeto de alcanzar un grado de conversión de las primeras materias, en sus correspondientes ésteres de alquilo de ácidos grasos, el cual sea superior a un porcentaje del 98 %. El nuevo procedimiento de la presente invención, puede emplear las preparaciones de lipasas en concordancia con la presente invención, o una lipasa individual, inmovilizada sobre un soporte sólido. En tal caso, la lipasa, puede ser aleatoria o sn-1,3 específica, y la combinación consistente en lipasa / soporte, se planifica con cuidado, con objeto de que proporcione una preparación de enzimas que sea robusta y eficiente. El glicerol desorbido, se libera en el medio de reacción y éste puede retirarse del sistema, a continuación, por mediación de medios mecánicos, de la forma que se encuentra descrita, aquí, en este documento de solicitud de patente. El uso de un sistema de este tipo, evita la producción de agregados de biocatalizador, los cuales se producen debido a la adherencia de las perlas, mediante el glicerol formado. La formación de agregados de enzimas, es uno de los factores clave, los cuales son responsables para la descomposición y para el enmascaramiento u ocultación de la actividad de la enzima, los cuales se solucionan por mediación del sistema y de los procedimientos de la presente invención.

Con objeto de poder alcanzar unos grados de conversión de las primeras materias en un porcentaje mayor del 98 %, se procedió a utilizar dos configuraciones del proceso:

1. Un reactor de tanque, provisto de agitación, con un filtro, en el fondo, a base de vidrio sinterizado, el cual retiene al biocatalizador en el reactor, si bien, no obstante, éste permite que el medio de reacción, permee hacia fuera del reactor. tal tipo de configuración del reactor, permite el hecho de que, el producto secundario o sub-producto, de una forma específica, el glicerol, el cual se ha auto-desorbido de la enzima inmovilizada, se hunda hacia el fondo del reactor, y que éste permee a través del filtro de vidrio sinterizado. El resultado que se obtiene con ello, es una retirada o eliminación continua del glicerol formado desorbido, y también, del exceso de agua, hacia fuera del medio de reacción, conduciendo, con ello, a la impulsión o cambio de la reacción, hacia la síntesis, alcanzándose, con ello, unos grados de conversión correspondientes a un porcentaje mayor a un 98 %. El biocatalizador el cual se utiliza en este reactor, puede encontrarse compuesto por un tipo de lipasa individual o por lipasas de múltiples tipos, en consideración a su especificidad posicional, así como a su origen.

2. Dos reactores de tanque, agitados, consecutivos, con un filtro de vidrio sinterizado en el fondo. Entre los dos reactores, se utiliza un tanque de sedimentación o una centrífuga. El primer reactor, puede contener un biocatalizador inmovilizado, el cual esté compuesto por una lipasa de tipo individual o por lipasas de tipos múltiples. El rol interpretativo del tanque de sedimentación o centrífuga, entre ambos reactores, es el de eliminar o retirar el glicerol formado y el exceso de agua, del medio de reacción, conduciendo, con ello, a un incremento del grado de conversión de las primeras materias, en sus correspondientes ésteres alquílicos de ácidos grasos, en un porcentaje superior a un 98 %, en el segundo reactor, en un tiempo de reacción que sea razonable.

En el procedimiento de la presente invención, no existe ninguna acumulación de los glicéridos parciales (mono- y diglicéridos), en el sistema. Tales tipos de glicéridos parciales, son responsables, de una forma típica, para la pérdida de actividad enzimática, conjuntamente con el glicerol acumulado. Tal y como se mostrará en los ejemplos los cuales se facilitan a continuación, en el procedimiento en concordancia con la presente invención, la actividad del biocatalizador, se retiene, de una forma inesperada, en el uso repetido de la preparación enzimática, en más de 100 ciclos. El tiempo de reacción, se acorta a menos de un transcurso de tiempo de 4 horas, en comparación con el período de tiempo correspondiente a más de 24 horas, cuando se procede a utilizar otros biocatalizadores los cuales de encuentran descritos en el arte correspondiente a la técnica anterior, con objeto de alcanzar unos grados de conversión que sean mayores de unos porcentajes del 96 %. Estas características, imparten, a las preparaciones enzimáticas y a los procedimientos en concordancia con la presente invención, unos valores altamente económicos.

La mezcla de reacción contenida en el reactor, el cual se encuentra provisto de un termostato, y de un filtro en el fondo, se hace reaccionar, bajo unas condiciones que sean apropiadas, hasta que, los grupos acilo grasos, o los ácidos grasos, se hayan convertido en ésteres de alquilo de ácidos grasos, de una forma típica, en éteres metílicos de ácidos grasos. Se procede a filtrar el medio de reacción, a través del filtro del fondo, mediante la fuerza de la gravedad, o procediendo a aplicar una presión de nitrógeno, sobre la parte superior del reactor.

Con objeto de alcanzar unos grados de conversión correspondientes a un porcentaje que sea superior a un 98 %, en unos tiempos de reacción que sean razonables, de una forma preferible, en un tiempo de reacción inferior a las 4 horas, la reacción, se lleva a cabo en dos etapas. En primer lugar, se procede a hacer reaccionar la fuente de ácidos grasos, con un alcohol de cadena corta, o con un donante de alcohol, tal como el metanol, durante un transcurso de

tiempo de aproximadamente 2 horas, en donde se obtengan unos grados de conversión a ésteres de alquilo de ácidos grasos, que sean superiores a un porcentaje del 70 %. El medio de reacción, se retira del fondo del reactor, manteniendo el biocatalizador en el reactor. Se deja que el medio de reacción, se separe en fases, o que éste se centrifugue, con objeto retirar el glicerol formado. A continuación, la fase orgánica superior, la cual contiene principalmente los glicéridos residuales que no han reaccionado, y los ésteres de alquilo de ácidos grasos formados, se introduce en un segundo reactor consecutivo, y se deja que éste reaccione con el metanol, en presencia de una lipasa o una multi-lipasa inmovilizada en una matriz polimérica.

Este procedimiento, proporciona ésteres alquílicos de ácidos grasos, con un contenido mayor a un porcentaje del 898 %, y un producto secundario o subproducto, a saber, el glicerol, de una alta calidad. La preparación multi-enzimática (de múltiples enzimas) inmovilizada, es susceptible de poderse reciclar, con unas pérdidas insignificantes, después del reciclaje, en más de 100 ciclos.

La reacción de las fuentes de ácidos grasos con un alcohol, tal como el metanol, u otro donante de alcohol, con objeto de proporcionar biodiésel, puede también llevarse a cabo de una forma continua, procediendo a cargar la mezcla de las enzimas inmovilizadas, en una columna, y procediendo a hacer pasar la mezcla de reacción, a través de la columna, con objeto de proporcionar los productos deseados.

Debe mencionarse el hecho de que, el reactor confeccionado para la producción del biodiésel, el cual puede operarse por lotes, en un reactor de tanque provisto de agitador, puede hacerse funcionar de una forma continua, procediéndose a cargar el biocatalizador en una columna.

Los soportes sólidos los cuales son apropiados para portar la lipasa / las lipasas, se han descrito anteriormente, arriba. Algunos de los soportes específicos, se proporcionan en los ejemplos los cuales se facilitan más abajo, a continuación, de una forma particular, en la Tabla 1.

De una forma preferible, puede añadirse un disolvente orgánico hidrofóbico, tal como el n-hexano, al medio inmovilizado, en unos factores de relación correspondientes a unos valores comprendidos dentro de unos márgenes que van desde 1 : 10 hasta 10 : 1, del tampón, con respecto al disolvente orgánico (tampón : disolvente orgánico), respectivamente. Las enzimas inmovilizadas de la presente invención, preparadas mediante el procedimiento en concordancia con la presente invención, son muy activas y particularmente estables, y de una alta tolerancia con respecto a los substratos hidrofílicos, tales como los consistentes en los alcoholes de cadena corta, los ácidos grasos de cadena corta, y otros factores enzimáticos desactivantes, los cuales se encuentran típicamente presentes en el aceite residual. Los grados de conversión de la fuente de ácidos grasos, en un porcentaje de aproximadamente el 90 %, en la primera etapa, y de un porcentaje mayor del 98 %, en la segunda etapa, se retienen, después de incluso 100 ciclos de reacción. Esta estabilidad, es de una importancia económica mayor.

La inmovilización, puede llevarse a cabo en concordancia con los procedimientos los cuales se encuentran descritos en el arte especializado de la técnica. Un procedimiento de inmovilización el cual es específicamente ventajoso, es el que se encuentra descrito en el documento co-pendiente presentado por el solicitante, correspondiente a la patente internacional WO 02 008 / 084 470. En resumen, la preparación de una lipasa inmovilizada sobre un soporte insoluble, se efectúa procediendo a proporcionar un sistema bi-fase, compuesto de una solución tampón acuosa, y por lo menos un primer disolvente orgánico; procediendo a mezclar la citada enzima interfacial con el sistema bifásico; procediendo a añadir el soporte a la mezcla obtenida, y procediendo a mezclar : y procediendo a aislar, de la mezcla obtenida, la enzima interfacial inmovilizada sobre el citado soporte.

La elección de la enzima, es de una gran importancia para la eficacia de la preparación enzimática, de una forma particular, para los sistemas multi-lipasa (de múltiples lipasas). La combinación, debería elegirse de tal forma que se evite el deterioro o la pérdida de actividad, bajo las duras condiciones de la reacción. Esta condición, puede satisfacerse, debido al hecho de que, las preparaciones bi-enzimáticas o multi-enzimáticas, en sistema, actúan de una forma sinérgica. Deberá entenderse el hecho de que, mediante el término sinergismo, tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, se pretende también significar la evitación de la desactivación enzimática o el deterioro o la pérdida de la actividad enzimática. Así, por ejemplo, sin pretender ligarlo a ninguna teoría, algunos de los intermediarios de transesterificación, a saber, los monoglicéridos y los diglicéridos, parecen ser responsables de la desactivación o del deterioro de la actividad de la lipasa derivada de la *Pseudomonas sp.* (a la que se le hará referencia, en la parte que sigue de este documento, como SP), y la lipasa derivada de la *Thermomyces lanuginose* (a la que se le hará referencia como TL). Por otro lado, la lipasa derivada de la *Candida Antarctica B* (a la que se le hará referencia como CALB), tiene una alta especificidad hacia los monoglicéridos y los diglicéridos. La presencia de CALB, en bien ya se la PS, ó bien ya sea la TL, garantiza los efectos sinérgicos como los que se han definido aquí, en este documento y, así, de este modo, manteniendo el complejo biocatalizador, sin ninguna pérdida significativa de actividad, en un uso repetido. Adicionalmente, además, la presencia de una tercera lipasa adicional, con una alta afinidad sn-2, conduce a la reducción de los niveles de concentración de los intermediarios formados en la reacción de transesterificación, del tipo consistente en el glicerol acilado sn-2, el cual se caracteriza por una reducida tasa de compensación procedente del medio de reacción. Las combinaciones específicas de enzimas, y el razonamiento subyacente de su diseño o concepción, se describirá en mayor detalle, en

los ejemplos que se facilitan más abajo, a continuación. Esto es debido al hecho de que, la posesión de una alta actividad de especificación, para una combinación de matriz de lipasas, no garantiza el mantenimiento de la actividad, en un uso repetido. Los presentes inventores, han establecido unas combinaciones que son particularmente eficientes.

5 Las combinaciones de enzimas que se prefieren de una forma específica, son la lipasa TL y CALB, la lipasa PS y CALB, la lipasa TL, CALB y CALA, y la lipasa PS, CALB y CALA, inmovilizadas sobre matrices hidrofílicas, de la forma que se describe aquí, en este documento.

10 El uso de un sistema de dos lipasas, o de un sistema de tres lipasas, en concordancia con la presente invención, los cuales posean una alta actividad de transesterificación del metanol y aceites, y también una alta estabilidad, bajo unas condiciones extremas de reacción, imparte un valor económico al biocatalizador desarrollado, en la producción de biodiésel, con unos costes menores del biocatalizador, el cual puede reutilizarse de una forma más eficiente.

15 Tal y como se mostrará en ejemplos que se facilitan más abajo, a continuación, el procedimiento enzimático para la preparación de ésteres de alquilo de cadena corta de ácidos grasos, en concordancia con la presente invención, puede emplear una primera lipasa y una segunda lipasa, encontrándose, las citadas lipasas, inmovilizadas de una forma separada, o inmovilizadas de una forma conjunta, en un soporte apropiado, de la forma que se ha definido anteriormente, arriba, exhibiendo, la citada primera lipasa, una mayor actividad de transesterificación hacia los triglicéridos, en comparación con su actividad hacia los glicéridos parciales, y exhibiendo, la citada segunda lipasa, una mayor actividad de transesterificación hacia los glicéridos parciales, en comparación con su actividad hacia los triglicéridos, y exhibiendo, las citadas dos lipasas, un efecto sinérgico en su actividad de transesterificación, con objeto de obtener el producto final consistente en ésteres de alquilo de ácidos grasos.

25 En todavía otra forma de presentación, la preparación de lipasas a ser utilizada en el procedimiento en concordancia con la presente invención, puede estar compuesta por un primera lipasa y por una segunda lipasa, encontrándose, las citadas lipasas, separadas de una forma separada o de una forma conjunta, en un soporte apropiado, liberando intermediarios, la citada primera lipasa, en una primera reacción de transesterificación, los cuales se favorecen mediante la citada segunda lipasa, para la transesterificación con un alcohol o con un donante de alcoholes, para formar ésteres de alquilo de ácidos grasos.

30 El alcohol, puede comprender por lo menos uno de entre el metanol, el etanol, el iso-propanol, el n-butanol, o cualquier otro alcohol superior, tal como el n-hexanol, el n-octanol, el n-decanol, el n-dodecanol, el n-tetradecanol, el n-hexanol, y el n-octadecanol, o cualquier donante de alcohol, o cualquier mezcla de por lo menos dos de éstas. El donante de alcohol, de una forma preferible, es un carboxilato de alquilo de cadena corta, tal como el acetato de metilo.

35 Todavía de una forma adicional, la preparación de lipasas, puede estar compuesta por un primera lipasa y por una segunda lipasa, encontrándose, las citadas lipasas, separadas de una forma separada o de una forma conjunta, en un soporte apropiado, las en donde, las citadas lipasas, exhiben diferentes especificidades de sustrato, las cuales mantienen su actividad de transesterificación a los triglicéridos, cuando éstas se utilizan de una forma conjunta, mientras que, por lo menos una de la citadas dos lipasas, se descompone, en el medio de reacción de transesterificación, cuando se utiliza de una forma separada con triglicéridos, como sustrato, pero exhibe una alta actividad de transesterificación / esterificación, con los glicéridos parciales o con los ácidos grasos, como sustrato.

45 Deberá tomarse debida nota, en cuanto al hecho de que, tal y como se utiliza en esta especificación y en la reivindicaciones anexas, las formas singulares consistentes en "uno", "una", y "el", "la", "los" y "las", incluye tanto las formas plurales como las singulares, a menos de que, en el contenido, se dicte claramente de otro modo.

50 En la total extensión de esta especificación, así como en las reivindicaciones que siguen a continuación, a menos de que el contexto los requiera, de una forma distinta, la palabra "comprende", y las variaciones de este término, como los términos "comprende" y "comprendiendo", se entenderán como implicando la inclusión de un número entero (unidad) indicado, o etapa o un grupo de números enteros (unidades) o etapas.

## 55 **EJEMPLOS**

### **Ejemplo 1.- Preparación de una lipasa individual inmovilizada sobre un soporte polimérico**

60 Se procedió a diluir la lipasa derivada de la *Thermomyces lanuginosa* ((TL), 1 ml de Lipozyme TL 100L), o un concentrado de lipasas derivado de la *Thermomyces lanuginose*, (Novozymes, Dinamarca), en una solución tampón TRIS buffer (12 ml) de 0,05 M, a un valor pH de 8. La solución de lipasa, se concentró con una soporte enzimático (1 g, encontrándose mostrados, los diversos soportes utilizados, en la Tabla 1, la cual se facilita posteriormente, a continuación), procediendo a batir o agitar la preparación, durante un transcurso de tiempo de 8 horas, a la temperatura ambiente. De una forma preferible, se procede a añadir un disolvente orgánico, hidrofóbico, tal como el consistente en el n-hexano, al medio de inmovilización, a unos factores de relación correspondientes a unos valores

comprendidos dentro de unos márgenes que van desde 1 : 10 hasta 10 : 1, correspondiente al valor de relación del tampón con respecto al disolvente, respectivamente. El soporte que contenía la enzima inmovilizada, se separó mediante filtrado, y éste se secó, en un desecante, durante el transcurso de toda la noche, para proporcionar la lipasa inmovilizada. Se procedió a repetir usar el mismo procedimiento, mediante la utilización de, o bien ya sea lipasa derivada de la *Pseudomonas sp.* (100 mg de Lipase PS, Amano Enzyme, Japón), o bien ya sea lipasa derivada de la *Alcaligenes sp.*, (50 mg de lipasa QLM, Meito Sangyo, Japón), o bien ya sea lipasa *Candida Antarctica A* (1 ml de CALA, Novozymes, Dinamarca) o bien ya sea un concentrado de lipasa *Candida antarctica B* (1 ml, CALB-L, Novozymes, Dinamarca). Estas lipasas inmovilizadas, pueden utilizarse, o bien ya sea solas, en el nuevo procedimiento de la invención, o bien ya sea en combinación, a diferentes factores de relación, en un sistema de reacción consistente en una sola etapa de reacción del tipo denominado "one-pot reaction", o en un sistema de reacción consistente en dos etapas consecutivas, o más procesos, para la preparación de ésteres de alquilo de ácidos grasos (biodiésel, vía las reacciones de esterificación / transesterificación, de una fuente de ácidos grasos y un alcohol, de una forma típica, el metanol, para biodiésel. El modo del reactor, para la producción de biodiésel, puede llevarse a cabo, procediendo a operar en un reactor de tanque agitado, o bien de una forma continua, en donde, el biocatalizador, se empaca en una columna.

**Ejemplo 2.- Preparación de biocatalizadores de multi-lipasas inmovilizadas**

Se procedió a solubilizar una lipasa derivada de la *Thermomyces lanuginosa* (1 ml de Lipozyme TL 100L, Novozymes, Dinamarca) y un concentrado de lipasa *Candida antarctica B* (1 ml, CALB-L, Novozymes, Dinamarca), en una solución tampón (12 ml) de 0,05 M y un valor pH de 8. Se procedió a poner en contacto la solución que contenía ambas enzimas, con un soporte, tal como el consistente en Amberlite XAD 7HP ó Amberlite XAD 1600, ambos, de procedencia de la firma Rohm and Haas, USA (1 g), procediendo a batir, o a agitar, durante un transcurso de tiempo de 8 horas, a la temperatura ambiente. De una forma preferible, se procede a añadir un disolvente tal como el consistente en n-hexano, al medio de de inmovilización, a unos factores de relación correspondientes a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde 1 : 10 hasta 10 : 1, del tampón con respecto al disolvente orgánico, respectivamente. Se procedió, a continuación, a separar mediante filtrado, el soporte que contenía las enzimas inmovilizadas, y éste se secó, en un desecante, durante el transcurso de toda la noche, para obtener la preparación multi-lipasas inmovilizada. Se procedió a repetir el mismo procedimiento, mediante la utilización de ambas lipasa PS (100 mg, Amano Enzyme, Japón) y concentrado de lipasa *Candida antarctica B* (1 ml, CALB-L, Novozymes, Dinamarca), lipasa PS (100 mg, Amano Enzyme, Japón) y concentrado de lipasa *Thermomyces lanuginosa* (1 ml, CALB-L, Novozymes, Dinamarca). Pueden prepararse otros sistemas multi-enzimas, como, por ejemplo, mediante la utilización de lipasa derivada de la *Alcaligenes sp.* (50 mg, de lipasa QLM, Meito-Sangyo, Japón), en combinación con bien ya sea PS ó bien ya sea lipasa TL. Otras preparaciones de lipasa, pueden contener tres diferentes enzimas, de una forma particular, las lipasas TL, CAL-A, y CAL-B, o las lipasas PS, CAL-A y CAL-B, todas ellas, inmovilizadas en soportes similares o diferentes.

**Ejemplo 3.- Preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME, biodiésel), mediante la utilización de lipasas inmovilizadas**

La tabla 1, muestra el porcentaje de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME %), que se forman en la reacción de transesterificación, mediante la utilización de lipasas derivadas de las *Thermomyces lanuginose* (TL), *Pseudomonas sp.* (PS) y *Candida antarctica B* (CALB), las cuales se encuentran inmovilizadas, cada una de ellas, en diferentes soportes. Las reacciones, se llevaron a cabo mediante la adición de la lipasa inmovilizada (30 g), al aceite de soja, (220 g) y alcohol metílico (23,9 g) (a un factor de relación estequiométrico correspondiente a un valor de 1 : 3, entre los triglicéridos y el metanol, de una forma respectiva), en un reactor de vidrio, de doble pared, con un filtro de vidrio sinterizado, en el fondo, con una porosidad correspondiente a un valor de 70 – 100 µm. Se procedió a determinar el progreso del grado de conversión de las primeras materias, mediante la medición del porcentaje de ésteres metílicos de ácidos grasos, glicéridos parciales y triglicéridos, mediante la utilización de GC (cromatografía de gases), después de un transcurso de tiempo de 8 horas de reacción, bajo las condiciones anteriormente mencionadas, arriba.

Los resultados obtenidos, se proporcionan en la Tabla 1, en la cual se muestra el porcentaje de ésteres metílicos de ácidos grasos, formados en el sistema de transesterificación, los cuales se encuentran compuestos por triglicéridos de aceite de soja (220 g) y metanol (23,9 g), mediante la utilización de diferentes lipasas individualmente inmovilizadas, preparadas en concordancia con el ejemplo 1 ( 30 g). La mezcla de reacción, se agitó por medios mecánicos, a una temperatura de 30 °C, durante un transcurso de tiempo de 8 horas.

**Tabla 1**

Lipasa inmovilizada / Tipo de soporte	<i>Thermomyces lanuginosa</i> lipase FAME (%)	<i>Pseudomonas sp.</i> lipase FAME (%)	<i>Candida antarctica</i> lipase FAME (%)
Amberlite XAD 4	45	55	20
Amberlite XAD 16	47	85	55

Continuación Tabla 1

Lipasa inmovilizada / Tipo de soporte	<i>Thermomyces lanuginosa</i> lipase FAME (%)	<i>Pseudomonas sp.</i> lipase FAME (%)	<i>Candida antarctica</i> lipase FAME (%)
Amberlite XAD 7HP	55	86	40
Amberlite XAD 16HP	46	80	40
Duolite XAD 761	50	85	40
Amberlite XAD 1180	55	87	70
Amberlite XAD 1600	60	80	70
Duolite A7	65	85	40
Duolite A561	65	85	75
Duolite A568	54	80	40
Duolite C467	75	10	0
Amberlyst A-21	55	80	40
Dowex monosphere 77	40	80	40
Dowex optipore L493	10	55	0
Dow styrene DVB	5	35	5
MTO Dowex optipore SD-2	5	75	5
Dowex MAC-3	0	0	0
Amberlite FPA53	45	70	35
Amberlite FPC22H	0	0	0
Amberlite FPA40CI	45	47	45
Amberlite IRC50	5	15	45
Purolite A109	45	75	45
Sepabeads EC-EA	75	85	70
Sepabeads EC-EP	80	85	75
Sepabeads EC-BU	85	86	85
Sepabeads EC-OD	80	85	85

**Ejemplo 4.- Síntesis de ésteres metílicos de ácidos grasos (biodiésel), mediante la utilización de una preparación multi-lipasas, inmovilizada**

La Tabla 2, muestra el porcentaje de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME %), formados en la reacción de transesterificación, mediante la utilización de una preparación multi-lipasas, inmovilizadas en Amberlite XAD 7HP, compuesta por bien ya sea lipasa de *Thermomyces lanuginose* (TL) y lipasa de *Candida antarctica* (CALB), o bien ya sea lipasa de *Pseudomonas sp.* (PS) y lipasa de *Candida antarctica* B, las cuales se inmovilizaron por separado, o de una forma conjunta, sobre el mismo soporte, en un sistema directo, en el mismo recipiente (denominado sistema "one pot"). Asimismo, además, en lugar de la CALB, se procedió a utilizar una lipasa derivada de la alcaligenes. Sp. (Lipase QLM, Meito – Sangyo, Japón), en combinación con las lipasa PS ó la lipasa TL. Las reacciones, se llevaron a cabo procediendo a añadir la preparación de lipasa (30 g), a aceite de soja (220 g) y alcohol metílico (23,9 g), en un reactor de vidrio, de doble pared, en cuyo fondo se encuentra provisto un filtro de vidrio sinterizado, con una porosidad correspondiente a un tamaño situado entre 70 – 100 µm. El metanol, se añadió en lotes, siendo la cantidad de cada lote, la correspondiente a 1 / 3 de la cantidad estequiométrica, o bien mediante una titración, mediante procedimiento de goteo. Se procedió a agitar de una forma mecánica el sistema de reacción, a una temperatura de 30 °C. El progreso de la reacción de las primeras materias, se determinó procediendo a medir el porcentaje de ésteres metílicos de ácidos grasos, los glicéridos parciales y los triglicéridos, mediante la utilización

de cromatografía de gases (GC), después de un transcurso de tiempo de 2, 3 y 6 horas de reacción, bajo las condiciones anteriormente mencionadas, arriba.

5 Los resultados que se presentan en la Tabla 2, muestran el hecho de que, las lipasas TL y PS, no pudieron alcanzar los FAME, a una concentración correspondiente a un porcentaje que se encuentre por encima del 95%, después de un tiempo de reacción de 6 horas, mientras que, la actividad de transesterificación de la CALB, era relativamente baja. Una preparación de multi-lipasas inmovilizadas, la cual comprendía las lipasas TL y CALB, exhibía, de una forma sorprendente una mayor actividad de transesterificación que la correspondiente a los experimentos de control realizados con lipasa TL ó lipasa CALB, de una forma separada.

10 Tal y como se muestra en la Tabla 2, la preparación inmovilizada de multi-lipasas, la cual encuentra compuesta por lipasa PS y lipasa CALB, exhibía, así mismo, una actividad de transesterificación sinérgica mejorada, siendo ésta, de una forma típica, la correspondiente a un porcentaje del 99 %, en comparación de la correspondiente a un porcentaje de menos de un 86 %, observada en los experimentos de control. Se observó la misma tendencia sinérgica, cuando la lipasa QLM, se utilizó en combinación con las lipasas TL y PS.

15 En la Tabla 2, se muestra el porcentaje de los ésteres de metilo de ácidos grasos formados, después de un transcurso de tiempo de 2, de 3 y 6 horas de reacción, en el sistema de transesterificación que estaba compuesto por triglicéridos de aceite de soja (220 g) y metanol (23,9 g), mediante la utilización de diferentes mezclas de múltiples lipasas, inmovilizadas sobre Amberlite XAD 7HP, preparadas en concordancia con el Ejemplo 2, y también, mediante la lipasas inmovilizadas preparadas en concordancia con el Ejemplo 1, como experimentos de control. La mezcla de reacción, se agitó de una forma mecánica, a una temperatura de 30 °C, durante un transcurso de tiempo de 6 horas.

**Tabla 2**

25

Lipasa inmovilizada sobre Amberlite SAD 7HP	FAME % Después de 2 horas	FAME % Después de 3 horas	FAME % Después de 4 horas
Lipasa <i>Thermomyces lanuginose</i> (control)	75	82	85
Lipasa <i>Pseudomonas sp.</i> (control)	74	81	86
Lipasa <i>Candida antarctica B</i> (control)	10	18	42
Lipasa <i>Alcaligenes sp.</i> (Lipasa QLM)	52	67	88
Lipasas <i>Thermomyces lanuginosa</i> y <i>Candida antarctica B</i>	82	87	96
Lipasas <i>Pseudomonas sp.</i> y <i>Candida antarctica B</i>	82	96	99,7
Lipasas <i>Alcaligenes sp.</i> y <i>Thermomyces lanuginosa</i>	71	78	96
Lipasas <i>Alcaligenes sp.</i> y <i>Pseudomonas sp.</i>	86	98	99.5

**Ejemplo 5.- Actividad de esterificación repetida de las lipasas inmovilizadas, en la reacciones por lotes, mediante la utilización del mismo lote de biocatalizador**

30 Se procedió a someter a test de ensayo, la actividad de esterificación de los biocatalizadores, mediante la adición de una de las tres lipasas (TL, PS, CALB), inmovilizadas sobre Amberlite XAD 7HP (250 mg), en un vial provisto de tapón de rosca, el cual contenía ácido oleico (2,5 g), y una cantidad estequiométrica de metanol, correspondiente a un 1/3 (285 mg). Se procedió a añadir la porción correspondiente a los 2/3 restantes de la cantidad de metanol, en dos lotes equivalentes, después de un transcurso de tiempo de reacción de 2 horas, y después de un transcurso de

tiempo de reacción de 4 horas. La composición de la mezcla de reacción, se analizó, después de un transcurso de tiempo de 6 horas. El medio de reacción, se desechó del vial y se procedió a introducir un nuevo lote de substratos frescos, mediante la utilización del mismo lote de enzimas. En la Figura 1, se muestra el porcentaje de FAME %, en el medio de reacción, mediante la utilización del mismo lote de lipasa PS, lipasa TL ó CALB, cada una de ellas, inmovilizadas, de una forma separada, sobre Amberlite XAD 7HP, en 50 ciclos de reacción.

Los resultados que se encuentran representados en la Figura 1, muestran las preparaciones de la CALB, las lipasas PS y TL, inmovilizadas, todas ellas catalizadas de una forma suficiente, la esterificación de los ácidos grasos libres, y el metanol. La actividad de la esterificación repetida de la CALB, era bastante estable, después de 50 ciclos de reacción, mientras que, las lipasas TL y PS, perdieron, de una forma lineal, un porcentaje del 26% y un porcentaje del 16%, de la actividad de esterificación inicial, después de 50 ciclos de reacción, respectivamente.

**Ejemplo 6.- Actividad de transesterificación repetida de las lipasas inmovilizadas, en la reacciones por lotes, mediante la utilización del mismo lote de biocatalizador**

Se procedió a someter a test de ensayo, la actividad de transesterificación de los biocatalizadores, mediante la adición de una de las tres lipasas, inmovilizadas sobre Amberlite XAD 7HP (250 mg), en un vial provisto de tapón de rosca, el cual contenía aceite de soja (2,5 g), y una cantidad estequiométrica de metanol, correspondiente a un 1/3 (91 mg). Se procedió a añadir la porción correspondiente a los 2/3 restantes de la cantidad de metanol, en dos lotes equivalentes, después de un transcurso de tiempo de reacción de 2 horas, y después de un transcurso de tiempo de reacción de 4 horas. La composición de la mezcla de reacción, se analizó, después de un transcurso de tiempo de 6 horas. El medio de reacción, se desechó del vial y se procedió a introducir un nuevo lote de substratos frescos, mediante la utilización del mismo lote de enzimas.

La figura 2, muestra la actividad de transesterificación de la CALB, la lipasa PS y la lipasa TL, de una forma separada, en 50 ciclos de reacción, mediante la utilización del mismo lote de biocatalizador. Los resultados obtenidos, muestran el hecho de que, la actividad de transesterificación de ambas, las lipasas PS y TL, proporcionaron un porcentaje de FAME %, correspondiente a un valor de menos del 85 %, y éstas se deterioraron de una forma lineal, y alcanzaron un valor correspondiente a un porcentaje del 70 %, de media, en cuanto a lo referente su actividad inicial, después de 50 ciclos de reacción. La actividad inicial de transesterificación de la CALB, era relativamente reducida y, de una forma inesperada, ésta perdió su actividad, de una forma lineal, después de 11 ciclos de reacción.

**Ejemplo 7.- Uso de la CALB deficiente en la actividad de transesterificación, para las reacciones de esterificación de ácidos grasos y alcohol**

Se procedió a utilizar la CALB inmovilizada sobre Amberlite XAD 7HP, la cual había perdido su actividad de transesterificación, después de 11 ciclos de reacción, de la forma que se ha descrito en el Ejemplo 6 (250 mg), para la esterificación del ácido oleico (2,5 g) y el metanol (285 mg). Se utilizó el mismo lote de biocatalizador, en los 10 ciclos de reacción. De una forma inesperada, los resultados del análisis, muestran el hecho de que, el biocatalizador, tenía una alta actividad de esterificación, si bien, éste, perdió su actividad de transesterificación, en los experimentos anteriores. El porcentaje medio de FAME %, en 10 pasadas de ejecución consecutivas, mediante la utilización del mismo lote de biocatalizador, era el correspondiente a un valor de 85%.

**Ejemplo 8.- Uso de la CALB deficiente en la actividad de transesterificación, para las reacciones de transesterificación de ácidos grasos y alcohol**

Se procedió a utilizar la CALB inmovilizada sobre Amberlite XAD 7HP, la cual había perdido su actividad de transesterificación, después de 11 ciclos de reacción, de la forma que se ha descrito en el Ejemplo 6 (250 mg), para la transesterificación de la monooleína (3 g) y el metanol (270 mg). Se utilizó el mismo lote de biocatalizador, en los 10 ciclos de reacción. De una forma inesperada, los resultados del análisis, muestran el hecho de que, el biocatalizador, tenía una alta actividad de transesterificación, para los glicéridos parciales y el metanol, si bien, éste, perdió su actividad de transesterificación de los triglicéridos y el metanol, en los experimentos anteriores. El porcentaje medio de FAME %, en 10 pasadas de ejecución consecutivas, mediante la utilización del mismo lote de biocatalizador, era el correspondiente a un valor de 80%.

**Ejemplo 9.- Actividad de transesterificación repetida de la preparación de multi-lipasas inmovilizadas, en la reacciones por lotes, mediante la utilización del mismo lote de biocatalizador**

Se procedió a someter a test de ensayo, la actividad de transesterificación de las preparaciones de multi-lipasas inmovilizadas, mediante la adición de lipasa PS y CALB, o lipasa TL y CALB, todas ellas inmovilizadas sobre Amberlite XAD 7HP (250 mg), en concordancia con los ejemplos 1 ó 2, en un vial provisto de tapón de rosca, el cual contenía aceite de soja (2,5 g), y una cantidad estequiométrica de metanol (91 mg). Se procedió a añadir la porción correspondiente a los 2/3 restantes de la cantidad de metanol, en dos lotes equivalentes, después de un transcurso de tiempo de reacción de 2 horas, y después de un transcurso de tiempo de reacción de 4 horas. El medio de

reacción, se desechó del vial, después de un transcurso de tiempo de 6 horas de reacción, y se introdujo un nuevo lote de sustratos frescos, mediante la utilización del mismo lote de enzimas. La figura 3, muestra el porcentaje de FAME %, en el medio de reacción, mediante la utilización del mismo lote de biocatalizador, en 50 ciclos. Los resultados presentados en la Figura 3, muestran, de una forma inesperada, el hecho de que, la actividad de transesterificación de ambas preparaciones multi-lipasa, son estables, en 50 ciclos de reacción, mediante la utilización del mismo lote de biocatalizador.

**Ejemplo 10.- Síntesis de ésteres metílicos de ácidos grasos (biodiésel), mediante la utilización de una preparación multi-lipasa inmovilizada, en un procedimiento de dos etapas**

La tabla 3, muestra el medio el porcentaje de FME %, en el medio de reacción de transesterificación, mediante la utilización de una preparación de multi-lipasas inmovilizadas sobre XAD 7HP, la cual estaba compuesta por, bien ya sea lipasa TL y CALB, o bien ya sea lipasa PS y CALB, las cuales de inmovilizaron de una forma separada, o de una forma directa en el recipiente (denominado sistema "one pot"). Las reacciones, se llevaron a cabo procediendo a añadir la preparación de lipasa (30 g), a aceite de soja (220 g) y alcohol metílico (23,9 g), en un reactor de vidrio, de doble pared, en cuyo fondo se encontraba provisto un filtro de vidrio sinterizado, con una porosidad correspondiente a un tamaño situado entre 70 – 100 µm. El metanol, se añadió en lotes, siendo la cantidad de cada lote, la correspondiente a 1 / 3 de la cantidad estequiométrica, o bien mediante una titración, mediante procedimiento de goteo. Se procedió a agitar de una forma mecánica el sistema de reacción, a una temperatura de 30 °C, durante un transcurso de tiempo de 2 horas. Cuando el progreso de la reacción hubo alcanzado, de una forma preferible, un grado de conversión correspondiente a un porcentaje que se encontraba por encima del 70%, se procedió a filtrar el medio de reacción, del fondo del reactor, mediante la aplicación de una presión de nitrógeno, o mediante la fuerza de la gravedad, sobre el filtro de vidrio sinterizado. El medio de reacción, o bien se centrifugó, o bien se le cedió un determinado transcurso de tiempo, para que tuviera una separación de fases. A continuación, se procedió a retirar la fase del fondo que contenía el glicerol, y se introdujo la fase orgánica que contenía los glicéridos no reaccionados y los FAME, en un segundo reactor provisto de un filtro de vidrio sinterizado en el fondo, el cual contenía la lipasa inmovilizada. El medio, en el segundo reactor, se agitó de una forma mecánica, con una cantidad correspondiente a un tercio del la cantidad estequiométrica del metanol que se necesitó inicialmente, durante un transcurso de tiempo de 2 horas, y a una temperatura de 30° C. El progreso de la reacción, se llevó a cabo procediendo a la medición del porcentaje de ésteres metílicos de ácidos grasos, los glicéridos parciales y los triglicéridos, mediante la utilización de cromatografía de gases (GC), después de un transcurso de tiempo de 2 horas.

Los resultados presentados en la Tabla 3, muestran el hecho de que, ambas, las lipasas TL y PS utilizadas en los experimentos de control, eran capaces de proporcionar un porcentaje de FAME %, correspondiente a un valor inferior a un 98%, en la primera etapa, y de un 98%, en la segunda etapa, mientras que, la CALB inmovilizada sobre Amberlite 7HD, exhibía una actividad de transesterificación que era relativamente baja, y al cual no excedía de un porcentaje del 15%, después de una reacción en dos etapas. La preparación multi-lipasas (es decir, de múltiples lipasas), la cual constaba de la lipasa PS y la CALB, proporcionó un porcentaje de FAME, correspondiente a un 92%, y un grado de conversión casi completa, en la segunda etapa. La combinación de las lipasas TL y PS, proporcionaron un alto porcentaje de FAME en la primera etapa, y un grado de conversión casi completa, en la segunda etapa. Estos resultados, dan soporte a la sinergia en la actividad de transesterificación de las combinaciones de lipasas utilizadas, las cuales se han descrito anteriormente, arriba.

La Tabla 3, muestra el porcentaje de ésteres metílicos de ácidos grasos que se han formado, después de un tiempo de reacción de 2 horas, para cada una de las etapas del sistema de reacción de transesterificación, el cual se encontraba compuesto por triglicéridos de aceite (220 g) y metanol (23,9 g), mediante las utilización de diferentes preparaciones multi-lipasa sobre Amberlite XAD 7HP, preparadas en concordancia con el Ejemplo 2. Se procedió a agitar la mezcla de reacción, a una temperatura de 30 °C, durante un transcurso de tiempo de 2 horas. Después de la separación de fases, la fase orgánica superior, se introdujo en un segundo reactor, el cual contenía lipasa inmovilizada, el cual se hacía funcionar mediante las mismas condiciones.

**Tabla 3**

Nº de Etapa	Lipasa PS FAME (%)	Lipasa TL FAME (%)	CALB FAME (%)	PS / CALB FAME (%)	TL / CALB FAME (%)	PS / TL FAME (%)
Etapa 1	80	85	5	92	90	85
Etapa 2	98	98	15	100	99	99

En la Tabla 3, se muestran varias posibilidades para diferentes combinación sinérgicas de enzimas (tal y como puede verse en la Figuras 2 y 4, en donde se procedió a utilizar sistemas multi-enzimáticos, en comparación con la Figura 2, en donde únicamente se utilizó una enzima.

El tiempo de reacción, se acortó en un tiempo de 2 – 3 horas, debido a la presencia de CALB, responsable para la compensación de los glicéridos parciales intermediarios, a saber, lo mono- y di- glicéricos, adicionalmente a la compensación del glicerol formado, el cual es responsable, de una forma típica, para la prolongación del tiempo de reacción y de la desactivación de la enzima, cuando únicamente se utilizan por separado la lipasa PS o la lipasa TL.

**Ejemplo 11.- Síntesis de ésteres metílicos de ácidos grasos (biodiésel), mediante la utilización de una preparación multi-lipasa inmovilizada, en un procedimiento de dos etapas, mediante la utilización del mismo biocatalizador, en lotes consecutivos**

La figura 4, muestra el porcentaje de FAME %, en las etapas 1 y 2, para el medio de la reacción de transesterificación, mediante la utilización de una preparación de multi-lipasas inmovilizadas sobre XAD 7HP, la cual estaba compuesta por lipasa TL y CALB, las cuales de inmovilizaron de una forma separada, o de una forma directa en el recipiente (denominado sistema “one pot”. Las reacciones, se llevaron a cabo procediendo a añadir la preparación de lipasa (30 g), a aceite de soja (220 g) y alcohol metílico (23,9 g), en un reactor de vidrio, de doble pared, en cuyo fondo se encontraba provisto un filtro de vidrio sinterizado, con una porosidad correspondiente a un tamaño situado entre 70 – 100 µm. El metanol, se añadió en lotes, siendo la cantidad de cada lote, la correspondiente a 1 / 3 de la cantidad estequiométrica, o bien mediante una titración, mediante procedimiento de goteo. Se procedió a agitar de una forma mecánica el sistema de reacción, a una temperatura de 30 °C, durante un transcurso de tiempo de 2 horas. Cuando el progreso de la reacción hubo alcanzado, de una forma preferible, un grado de conversión correspondiente a un porcentaje que se encontraba por encima del 80%, se procedió a filtrar el medio de reacción, mediante la aplicación de una presión de nitrógeno, o mediante la fuerza de la gravedad, sobre el filtro de vidrio sinterizado. El medio de reacción, o bien se centrifugó, o bien se le cedió un determinado transcurso de tiempo, para que tuviera una separación de fases. A continuación, se procedió a retirar la fase del fondo, que contenía el glicerol, y se introdujo la fase orgánica que contenía los glicéridos no reaccionados y los FAME, en un segundo reactor provisto de un filtro de vidrio sinterizado en el fondo, el cual contenía la el mismo biocatalizador. El medio, en el segundo reactor, se agitó de una forma mecánica, con una cantidad correspondiente un tercio del la cantidad estequiométrica del metanol que se necesitó inicialmente, durante un transcurso de tiempo de 2 horas, y a una temperatura de 30° C. El medio de reacción, se extrajo del reactor, manteniendo el mismo biocatalizador. Este procedimiento, se repitió por lo menos 100 ciclos. La figura 4, muestra el hecho de que, los porcentajes de FAME, después de la primera etapa, era aproximadamente el correspondiente a un porcentaje del 88%, de media, y alcanzó un porcentaje de más de un 99%, de media, después de la segunda etapa. Los resultados obtenidos muestran, de una forma inesperada, el hecho de que, la preparación inmovilizada de multi-lipasas, es altamente activa, y que no se observaron unas pérdidas de actividad significativas, en 100 ciclos de reacción, mediante la utilización del mismo biocatalizador.

**Ejemplo 12.- Producción de biodiésel, mediante la utilización de diferente especificidad de los substratos**

En la tabla 4, se muestra el porcentaje de los ésteres de metilo de ácidos grasos formados, después de diferentes intervalos de tiempo, para la reacción de transesterificación de triglicéridos de aceite de soja, mediante la utilización de diferentes preparaciones multi-lipasa de varias selectividades de substratos. Las lipasas, se inmovilizaron en concordancia con el procedimiento descrito en el Ejemplo 2, mediante la utilización de un soporte hidrofóbico, tal como el Amberlite XAD 1600.

**Tabla 4 :** En esta tabla, se facilita el porcentaje de ácidos grasos formados después de diferentes intervalos para el sistema de reacción de transesterificación, compuesto por triglicéridos de aceite de soja (2,5 g), y metanol (285 mg), mediante la utilización de diferentes preparaciones de multi-lipasa, inmovilizadas sobre Amberlite XAD 1600 (15 %, en peso), preparadas en concordancia con el Ejemplo 2. Se procedió a añadir el metanol, en tres lotes equivalentes, durante un transcurso de tiempo de reacción de 2 horas. A continuación, la mezcla de reacción, se agitó, y ésta se incubó, a una temperatura de 30 °C. Los factores de relación, en peso, entre las diferentes preparaciones de enzimas, era la correspondiente a unos valores de 60 % PS : 40 % CALB, y de 50 % PS : 20 % CALB : 20 % CALA. Se utilizaron, también, unos factores de relación en peso similares, entre TL: CALB y TL : CALB : CALA.

Tiempo / Lipasa	Lipasa PS + CALB	Lipasa PS + CALB + CALA	Lipasa TL + CALB	Lipasa TL + CALB + CALA
1	48	57	43	59
2	80	86	82	91
3	94	97	92	98
4	99	99,7	95	99

Los resultados que se presentan en la Tabla 4, muestran el hecho de que, mediante la utilización de un sistema multi – enzima, el cual se encuentra compuesto por una lipasa con una especificidad posicional 1,3, tal como la lipasa TL ó la lipasa PS, y una lipasa con una selectividad hacia la posición sn-2, tal como la consistente en la CALA, tiene como resultado una significativa mejora de la reacción de transesterificación, para la producción de biodiésel, en comparación con la utilización de unas preparaciones enzimáticas similares, aunque, sin embargo, sin la adición de una lipasa con una alta selectividad hacia posición sn-2, es decir, la CALA.

La tabla 5, muestra la actividad de transesterificación de dos preparaciones multi-lipasa las cuales se encuentran compuestas por lipasa TL, CALB y CALA, inmovilizadas bien ya sea sobre un soporte hidrofóbico, a saber, el consistente en el Amberlite XAD 1600, ó sobre un soporte hidrofóbico, poroso, tal como el consistente en el Duolite A7, ambos fabricados por parte de la firma Rohm and Hass, USA. Los resultados obtenidos, muestran el hecho de que, la combinación de las lipasas anteriormente mencionadas, arriba, cuando se encuentran inmovilizadas sobre un soporte hidrofóbico, éstas proporcionan una mayor actividad de transesterificación, así como también una estabilidad operativa muy mejorada. Puede verse, en la Tabla 5, el hecho de que, el biocatalizador el cual se encuentra compuesto por lipasas inmovilizadas sobre un soporte hidrofóbico, mantiene su actividad de transesterificación inicial, con una mínima pérdida de actividad, cuando se había procedido a utilizar el mismo lote, en 20 pasadas consecutivas, mientras que, la actividad de transesterificación mediante la utilización de las mismas lipasas, si bien, no obstante, inmovilizadas sobre un soporte hidrofílico, se había deteriorado de una forma substancial, y había alcanzado un porcentaje del 40% de su actividad inicial, después de 20 lotes, mediante la utilización del mismo lote de biocatalizador. Los resultados obtenidos, muestran claramente el hecho de que, los soporte hidrofóbicos, se ven favorecidos, para la inmovilización de las lipasas, para producir biodiésel, en comparación con la utilización de soportes hidrofílicos para la inmovilización de las mismas enzimas.

La Tabla 5, muestra la actividad de transesterificación de las preparaciones multi-lipasa, las cuales están compuestas por lipasa TL, CALB y CALA, todas ellas, inmovilizadas bien ya sea sobre un soporte hidrofóbico poroso, Amberlite XAD 1600, o bien ya sea sobre un soporte hidrofílico poroso, Duolite A7. Condiciones de reacción : Se procedió a mezclar aceite de soja (2,5 g) y metanol (3 lotes, cada uno de ellos, de 91 mg), con 250 mg de la preparación de lipasa inmovilizada, a una temperatura de 30 °C, durante un transcurso de tiempo de 4 horas. Se procedió a utilizar el mismo lote de biocatalizador, en 20 ciclos de reacción, mediante las mismas condiciones.

**Tabla 5**

Nº de lote / Biocatalizador	Lipasa TL, CALB y CALA inmovilizadas sobre un soporte hidrofóbico	Lipasa TL, CALB y CALA inmovilizadas sobre un soporte hidrofílico
1	92	82
2	91	82
3	91	75
4	90	72
5	90	66
6	89	65
7	89	62
8	90	57
9	88	55
10	89	53
11	88	52
12	88	50
13	89	50
14	89	47

Continuación Tabla 5

Nº de lote / Biocatalizador	Lipasa TL, CALB y CALA inmovilizadas sobre un soporte hidrofóbico	Lipasa TL, CALB y CALA inmovilizadas sobre un soporte hidrofílico
15	87	44
16	87	43
17	88	40
18	87	39
19	87	38
20	87	33

## REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento para preparación de ésteres alquílicos de ácidos grasos, en un sistema microacuoso exento de disolventes, el cual comprende:

- proporcionar una fuente de triglicéridos de ácidos grasos, procediendo a añadir, por etapas, un alcohol libre, o un donante de alcohol, a la citada fuente de ácidos grasos, en presencia de una preparación de lipasas, y  
- permitir que avance la reacción, bajo unas condiciones que sean apropiadas, hasta que, los citados triglicéridos de ácidos grasos, se hayan convertido en éteres de alquilo de ácidos grasos,

en donde, la citada preparación de lipasas, comprende por lo menos dos lipasas, encontrándose, las citadas lipasas, inmovilizadas, de una forma separada, o conjuntamente, sobre un soporte, el cual es uno cualquiera de los soportes consistentes en un soporte a base de polímero alifático y un soporte a base de polímero aromático hidrofóbico, y en donde, por lo menos una de las citadas lipasas, tiene una afinidad incrementada, para los glicéridos parciales, y por lo menos una de las citadas lipasas, es una lipasa de posición específica sn-1,3, en donde, la citada lipasa de posición específica sn-1,3, se selecciona de entre el grupo consistente en *Thermomyces lanuginose*, *Rhizomucor miehei*, *Mucor miehei*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus sp.*, *Mucor javanicus*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger*, *Acromobacter sp.* y *Burkholderia sp.* y, la citada lipasa que tiene una afinidad incrementada para los triglicéridos parciales, se selecciona de entre el grupo consistente en *Candida antarctica B*, *Candida antarctica A*, *Alcaligenes sp.* y *Penicillium camembertii*.

2.- Un procedimiento para la preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos (biodiésel), en un sistema microacuoso exento de disolventes; proporcionando una fuente de triglicéridos de ácidos grasos, procediendo a añadir, por etapas, metanol, a la citada fuente de ácidos grasos, en presencia de una preparación de lipasas, y dejando que, la reacción, avance bajo unas condiciones apropiadas, hasta que el grado de conversión de los grupos acilo de ácidos grasos, comprendidos en la citada fuente de ácidos grasos, en ésteres metílicos de ácidos grasos, alcance un porcentaje de por lo menos un 70 %, en donde, la citada preparación de lipasas, comprende una lipasa inmovilizada, individual, inmovilizada sobre un soporte, o una mezcla de por los menos dos lipasas, inmovilizadas de una forma conjunta o por separado, sobre un soporte, en donde, el citado soporte, es uno cualquiera de los soportes a base de polímeros alifáticos hidrofóbicos, y un soporte a base de polímero aromático, hidrofóbico.

3.- El procedimiento de la reivindicación 2, en donde, por lo menos una de las citadas lipasas, tiene una afinidad incrementada para los glicéridos parciales, y por lo menos una de las citadas lipasas es específica de la posición sn-1,3 y, la citada preparación de lipasas, comprende una tercera lipasa, la cual tiene una mayor selectividad hacia la posición sn-2 que las lipasas aleatorias.

4.- El procedimiento de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde, la citada fuente de ácidos grasos, comprende por lo menos una de entre el aceite de soja, el aceite de cáñola, el aceite de colza, el aceite de oliva, el aceite de ricino, el aceite de palma, el aceite de girasol, el aceite de cacahuete, el aceite de semilla de algodón, el aceite de *Jatropha*, las grasas derivadas de animales, el aceite residual de cocción, los triglicéridos de los aceites derivados de fuentes de plantas no comestibles, o cualesquiera mezclas de por los menos dos de entre éstos.

5.- Un procedimiento microacuoso, exento de disolventes, para la preparación de ésteres de alquilo, de ácidos grasos, de cadena corta, el cual comprende:

(a) proporcionar una fuente de triglicéridos de ácidos grasos, procediendo a añadir, por etapas, un alcohol de cadena corta, o cualquier otro donante de alcohol de cadena corta, a la citada fuente de ácidos grasos, en presencia de una preparación de lipasas, y permitir que avance la reacción, bajo unas condiciones que sean apropiadas, hasta que, el grado de conversión de los grupos acilo de ácidos grasos, comprendida en la citada fuente de ácidos grasos, en ésteres alquílicos de cadena corta de ácidos grasos, alcance un porcentaje de por lo menos un 70 %, en donde, la citada preparación de lipasas, comprende por lo menos una lipasa inmovilizada, individual, inmovilizada sobre un soporte, o una mezcla de por los menos dos lipasas, inmovilizadas de una forma conjunta o por separado, sobre un soporte, en donde, cada uno de los citados soportes, es uno cualquiera de los soportes a base de polímeros alifáticos hidrofóbicos, y un soporte a base de polímero aromático, hidrofóbico, al mismo tiempo que se elimina de una forma continua la glicerina formada a partir de la mezcla de reacción, para proporcionar una fase orgánica que contiene principalmente glicéridos residuales, no reaccionados, y los ésteres alquílicos de cadena corta de ácidos grasos, formados; y

(b) hacer reaccionar la citada fase orgánica con un alcohol libre de cadena corta, o cualquier otro donante de alcohol, en presencia de una preparación de lipasas, según se define en la etapa (a), bajo unas condiciones que sean apropiadas, hasta que el grado de conversión de los grupos acilo de ácidos grasos, comprendidos en la citada fuente de ácidos grasos, en ésteres metílicos de ácidos grasos, alcance un porcentaje de por lo menos un 95 %.

6.- Un procedimiento para la preparación de una mezcla de lipasas, inmovilizadas sobre un soporte insoluble, cuando se utilizan en el procedimiento de la invención, comprendiendo, la citada mezcla, una lipasas derivada de la

*Candida antarctica B*, y por lo menos una lipasa derivada de las *Pseudomonas sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Burkholderia sp.*, y *Thermomyces lanuginosa.*, comprendiendo, el procedimiento, las etapas de:

5 (a) poner en contacto una solución tampón que contiene una lipasa derivada de la *Candida antarctica B*, y por lo menos una lipasa derivada de las *Pseudomonas sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Burkholderia sp.*, y *Thermomyces lanuginosa*, con un soporte polimérico, el cual sea uno de entre el soporte a base de polímeros alifáticos, hidrofóbicos, y el soporte a base de polímeros aromáticos, hidrofóbicos;

10 (b) mezclar el sistema obtenido en la etapa (a), durante un transcurso de tiempo de por lo menos 4 horas, a la temperatura ambiente;

(c) filtrar la mezcla de lipasas inmovilizadas, y secar éstas, a un contenido de agua de menos de un porcentaje del 5%.

15 7.- El procedimiento de la reivindicación 6, en donde, el citado soporte insoluble, es un soporte poroso y reticular, a base de polímero alifático hidrofóbico, o a base de polímero aromático hidrofóbico.

20 8.- El procedimiento de la reivindicación 7, en donde, el soporte, es uno cualquiera de entre los Amberlite XAD-1600, XAD 7HP, XAD 16HP, XAD 1180, Amberlite FPA53, Amberlite FPC22H, Amberlite FPA40Cl, Amberlite IRC50, un Duolite, seleccionado de entre los tipos A7, A561, A568 y Duolite C467, Amberlyst A-21, Dowex Monosphere 77, Dowex Optipore L493, Dow Styrene DVB, MTO Dowex Optipore SD-2, Dowex MAC-3, Purolire A109, y Sepabeads seleccionado entre los tipos EC - EA, EC - EP, EC - BU y EC - OD.

25 9.- El procedimiento de la reivindicación 6, en donde, en (a), la puesta en contacto, se realiza en presencia de un disolvente orgánico hidrofóbico que se añade al medio de inmovilización, a unos factores de relación comprendidos dentro de unos márgenes que van desde 1 : 10 hasta 10 : 1, referentes a tampón : disolvente orgánico, respectivamente.

30 10.- El procedimiento de la reivindicación 9, en donde, el disolvente orgánico, es hexano.

11.- El procedimiento, de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 3, en donde, los citados ésteres de alquilo de ácidos grasos, son los ésteres de hexilo, de n-octilo, de n-decilo, de n-dodecilo, de n-tetradecilo, de n-hexadecilo ó de n-octadecilo de ácidos grasos.

35 12.- Un procedimiento para la preparación de ésteres de alquilo de cadena corta, de ácidos grasos, en un sistema exento de disolventes, el cual comprende: proporcionar una fuente de triglicéridos de ácidos grasos, procediendo a añadir, por etapas, un alcohol libre de cadena corta, o un donante de alcohol de cadena corta, a la citada fuente de ácidos grasos, en presencia de una preparación de lipasas, y permitir que avance la reacción, bajo unas condiciones que sean apropiadas, hasta que, la citada fuente de triglicéridos de ácidos grasos, se haya convertido en ésteres alquílicos de cadena corta, de ácidos grasos, en donde, la citada preparación de lipasas, comprende una primera lipasa y una segunda lipasa, encontrándose, las citadas lipasas, inmovilizadas sobre un soporte hidrofóbico, de una forma conjunta o por separado, el cual es uno cualquiera de los soportes a base de polímeros alifáticos hidrofóbicos, y soportes a base de polímeros aromáticos, hidrofóbicos, y en donde, la citada primera lipasa, exhibe una mayor actividad de transesterificación hacia los triglicéridos, en comparación con su actividad hacia los glicéridos parciales y, la citada segunda lipasa, exhibe una mayor actividad de transesterificación hacia los glicéridos parciales, en comparación con su actividad hacia los triglicéridos, y en donde, las citadas dos lipasas, muestran un efecto sinérgico, en su actividad de transesterificación, para obtener el producto final.

50 13.- Un procedimiento para la preparación de ésteres de alquilo de cadena corta, de ácidos grasos, en un sistema exento de disolventes, el cual comprende: proporcionar una fuente de triglicéridos de ácidos grasos, procediendo a añadir, por etapas, un alcohol libre de cadena corta, o cualquier otro donante de alcohol de cadena corta, a la citada fuente de ácidos grasos, en presencia de una preparación de lipasas, y permitir que avance la reacción, bajo unas condiciones que sean apropiadas, hasta que, la citada fuente de triglicéridos de ácidos grasos, se haya convertido en ésteres alquílicos de cadena corta, de ácidos grasos, en donde, la citada preparación de lipasas, comprende una primera lipasa y una segunda lipasa, encontrándose, las citadas lipasas, inmovilizadas sobre un soporte hidrofóbico, de una forma conjunta o por separado, el cual es uno cualquiera de los soportes a base de polímeros alifáticos hidrofóbicos, y soportes a base de polímeros aromáticos, hidrofóbicos, y en donde, la citada primera lipasa, libera intermediarios que son por lo menos uno de los monoglicéricos y diglicéricos, en un primer soporte a base de polímeros de la reacción de transesterificación, los cuales se favorecen mediante la citada segunda lipasa para la transesterificación, con un alcohol, para formar ésteres alquílicos de ácidos grasos.

60 14.- Un procedimiento para la preparación de ésteres de alquilo de cadena corta, de ácidos grasos, en un sistema exento de disolventes, el cual comprende: proporcionar una fuente de triglicéridos de ácidos grasos, procediendo a añadir, por etapas, un alcohol libre de cadena corta, o cualquier otro donante de alcohol de cadena corta, a la citada fuente de ácidos grasos, en presencia de una preparación de lipasas, y permitir que avance la reacción, bajo unas

condiciones que sean apropiadas, hasta que, la citada fuente de triglicéridos de ácidos grasos, se haya convertido en ésteres alquílicos de cadena corta, de ácidos grasos, en donde, la citada preparación de lipasas, comprende una primera lipasa y una segunda lipasa, encontrándose, las citadas lipasas, inmovilizadas sobre un soporte hidrofóbico, de una forma conjunta o por separado, el cual es uno cualquiera de los soportes a base de polímeros alifáticos hidrofóbicos, y soportes a base de polímeros aromáticos, hidrofóbicos, y en donde, las citadas lipasas, exhiben diferentes especificidades de los sustratos, las cuales mantienen su actividad de transesterificación, a los triglicéridos, cuando se utilizan conjuntamente, mientras que, por lo menos una de las citadas dos lipasas, se descompone, en el medio de transesterificación, cuando se utilizan de una forma separada con los triglicéridos, como sustrato, pero exhibe una alta actividad de transesterificación / esterificación, con los glicéridos parciales y los ácidos grasos, como sustratos, de una forma respectiva.

15.- Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 12 ó 15, en donde, el procedimiento, es para la preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos, y en donde, el citado alcohol de cadena corta, es el metanol.

16.- Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 12, en donde, la preparación de lipasas, comprende una tercera lipasa, la cual tiene una alta selectividad hacia la posición sn-2 de la cadena de glicerol.

17.- El procedimiento de la reivindicación 16, en donde, la citada tercera lipasa, la cual tiene una alta selectividad hacia la posición sn-2, se deriva de la *Candida Antarctica A* ó la *Pseudozyma sp.*

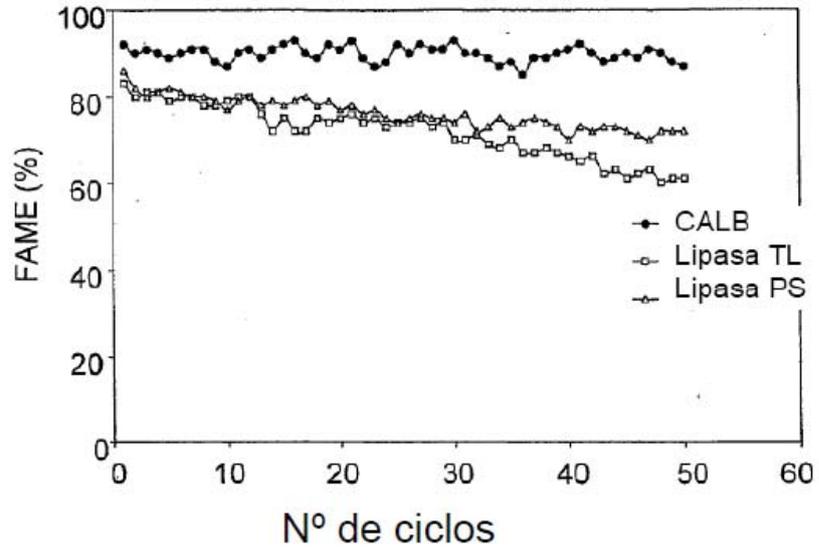


Fig. 1

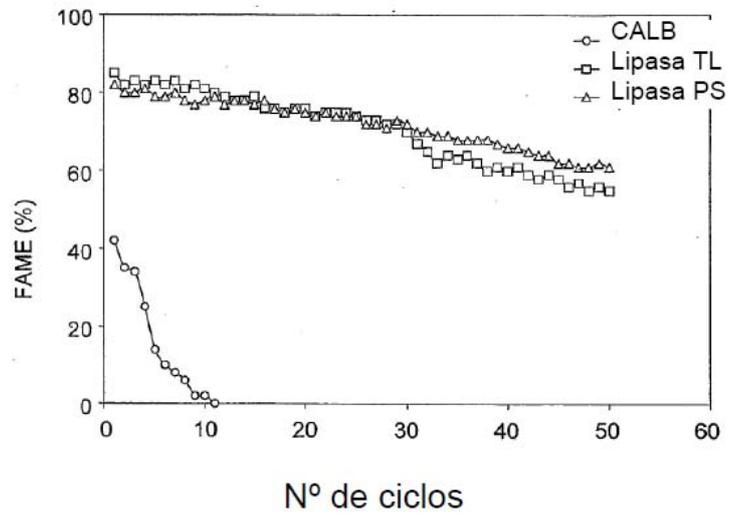


Fig. 2

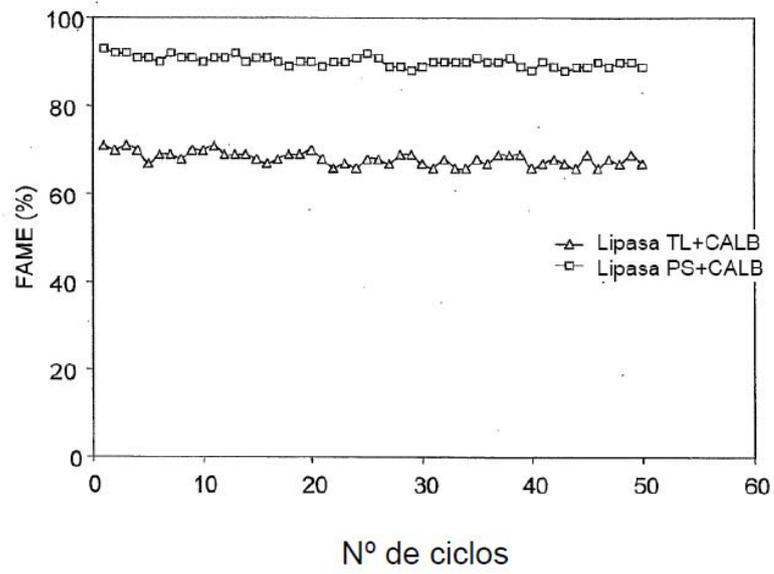


Fig. 3

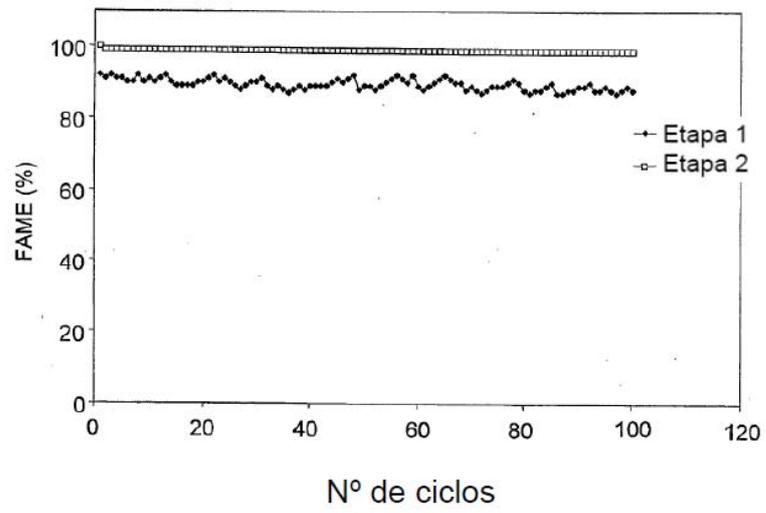


Fig. 4