

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 325**

51 Int. Cl.:

C12N 9/20 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

C12P 7/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2008 E 08721864 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2015 EP 2141229**

54 Título: **Preparación de lipasa en polvo, método para la producción de la misma y uso de la misma**

30 Prioridad:

16.03.2007 JP 2007069189

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

05.06.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 537 325 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).

DESCRIPCION

Preparación de lipasa en polvo, método para la producción de la misma y uso de la misma

Campo de la técnica de la invención

5 La presente invención se refiere a una preparación de lipasa en polvo que preferiblemente se puede utilizar en varias reacciones de esterificación o transesterificación, y una preparación de lipasa en polvo que comprende ésteres y/o ácidos grasos; un método para producir las mismas; y un método de transesterificación utilizando dichas preparaciones de lipasa en polvo.

Antecedentes de la invención

10 Las lipasas se utilizan ampliamente en la esterificación de varios ácidos carboxílicos tales como ácidos grasos con alcoholes tales como monoalcoholes y polialcoholes, transesterificación entre ésteres de varios ácidos carboxílicos, y similares. Entre ellas, la reacción de transesterificación es una tecnología importante no sólo como método para la modificación de grasas y aceites animales y vegetales, sino también como método para producir ésteres de varios ácidos grasos tales como ésteres de azúcar y ésteres de esteroles. Cuando una lipasa, que es una enzima que hidroliza grasas y aceites, se usa como un catalizador en las reacciones mencionadas, la reacción de transesterificación se puede realizar bajo condición suave, por ejemplo desde temperatura ambiente hasta alrededor de 70°C. Por tanto, las reacciones en las que se utiliza una lipasa pueden inhibir mejor reacciones adversas y reducir costes energéticos en comparación con las reacciones químicas convencionales. Además, ya que la lipasa como catalizador es un producto natural, es altamente segura. Además, se pueden producir eficazmente compuestos deseados utilizando una lipasa debido a la especificidad del sustrato y especificidad posicional de la misma. Sin embargo, ni siquiera si se utiliza una lipasa en polvo en la reacción de transesterificación sin modificación, se manifiesta completamente la actividad de la misma. Además, es difícil dispersar uniformemente una lipasa soluble básicamente en agua en materias primas oleosas y recoger tal lipasa.

25 Por tanto, generalmente, es común inmovilizar una lipasa en algunos vehículos, tales como una resina intercambiadora aniónica (Documento de Patente 1), una resina de adsorción fenólica (Documento de Patente 2), un vehículo hidrofóbico (Documento de Patente 3), una resina intercambiadora catiónica (Documento de Patente 4) y una resina quelato (Documento de Patente 5) y utilizarlos en reacciones tales como la esterificación y la transesterificación. Además, se propone el método para producir partículas de lipasa inmovilizadas, que comprende las etapas de producir una emulsión en la que una fase acuosa disuelve una lipasa y una sustancia que actúa como vehículo de una lipasa se dispersa en una fase hidrofóbica; y separar el agua de la emulsión para convertir la fase acuosa en partículas sólidas de la misma cubiertas con la lipasa (Documento de Patente 6).

30 Como se ha mencionado anteriormente, convencionalmente una lipasa se inmoviliza y se utiliza en la reacción de transesterificación. Sin embargo, la lipasa inmovilizada pierde la actividad lipasa original a través de la inmovilización. Además, cuando se utiliza un vehículo poroso, una materia prima o un producto se queda atascado en los poros finos y, como resultado, la velocidad de transesterificación disminuye. Además, en la reacción de transesterificación en que se utiliza la lipasa inmovilizada convencional, el agua retenida por el vehículo, entra en el sistema de reacción y, por lo tanto, es difícil evitar reacciones adversas, tales como la producción de diglicéridos y monoglicéridos en la reacción de transesterificación de grasas y aceites.

35 A la luz de las situaciones anteriores, se han desarrollado varias tecnologías utilizando una lipasa en polvo. Por ejemplo, se propone el método de reacción de transesterificación, que comprende las etapas de dispersar una lipasa en polvo, en presencia o ausencia de uno o más disolventes orgánicos inactivos, en una materia prima que comprende uno o más ésteres para que el 90% o más de las partículas de lipasa en polvo dispersas mantengan un diámetro de partícula de 1-100µm durante la reacción; y transesterificar dicha mezcla (Documento de Patente 7). Además, se propone también el uso de un polvo enzimático, donde dicho polvo enzimático es obtenido por secado de una solución de enzimas que comprende fosfolípidos y vitaminas liposolubles (Documento de Patente 8).

45 Sin embargo, se desea una lipasa en polvo cuya actividad lipasa sea aún mejor.

50 Por otro lado, se propone el método para producir una preparación de enzima inmovilizada, que comprende las etapas de añadir un polvo granulado o un polvo granulado y azúcares, a una solución que comprende una o más enzimas, y secar la solución que comprende una o más enzimas (Documento de Patente 9). La bibliografía describe que los ejemplos de enzimas utilizables incluyen una lipasa, una celulasa, una proteasa, una amilasa y una pectinasa, y que la preparación de la enzima inmovilizada obtenida por el método de producción arriba mencionado puede inhibir la desactivación enzimática en presencia de una sustancia que reduce la actividad enzimática. Sin embargo, en ese documento no se describe una mejora de la actividad enzimática. Además, los ejemplos realmente producidos en la biografía son sólo aquellos ejemplos en los que un polvo de soja desgrasado que tiene poco contenido graso se aplica como celulasa o proteasa, y no hay ninguna descripción específica de un ejemplo en donde se utilice una lipasa.

Documento de Patente 1: JP-A 60-98984

Documento de Patente 2: JP-A 61-202688

Documento de Patente 3: JP-A 2-138986

Documento de Patente 4: JP-A 3-61485

Documento de Patente 5: JP-A 1-262795

5 Documento de Patente 6: JP-B 3403202

Documento de Patente 7: JP- B 2668187

Documento de Patente 8: JP-A 2000-1-6873

Documento de Patente 9: JP-A 2000-106873

Descripción de la invención

10 El objeto de la presente invención es proporcionar una preparación de una lipasa en polvo en la cual se mejora su actividad enzimática.

El objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método para la producción de la preparación de lipasa en polvo.

15 Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método de transesterificación o un método de transesterificación en el cual se utiliza la preparación de lipasa en polvo.

La presente invención se ha completado basándose en el hallazgo de que, cuando se granula una lipasa de origen específico en un polvo con un polvo de soja de alto contenido en grasa y se utiliza la preparación de la lipasa en polvo obtenida en la reacción de esterificación y/o la reacción de transesterificación, la actividad de la lipasa se mejora drásticamente.

20 Concretamente, la presente invención proporciona una preparación de lipasa en polvo, que es un material granulado que contiene una lipasa derivada de *Rhizopus oryzae* y/o una lipasa derivada de *Rhizopus delemar* y un polvo de soja que tiene un contenido graso del 5% de la masa o más.

25 La presente invención proporciona también un método para producir una preparación de lipasa en polvo que comprende una etapa de secar una solución acuosa en la que están disueltas o dispersas una lipasa derivada de *Rhizopus oryzae* y/o una lipasa derivada de *Rhizopus delemar* y un polvo de soja que tiene un contenido graso del 5% de la masa o más.

La presente invención proporciona además un método para producir un producto transesterificado o un producto esterificado que comprende la etapa de transesterificar o esterificar una o más clases seleccionadas de ésteres de ácidos grasos, ácidos grasos y alcoholes, utilizando la preparación de lipasa en polvo mencionada anteriormente.

30 Según la presente invención, es posible proporcionar una preparación de lipasa en polvo que tiene una actividad enzimática mejorada drásticamente, con la que la reacción de transesterificación o esterificación se puede realizar eficazmente y, dicha preparación de lipasa en polvo, se puede reutilizar por recogida después de la reacción.

35 Además, según la presente invención, es también posible obtener una preparación de lipasa en polvo que se puede utilizar de forma segura y económica en la preparación de alimentos o aditivos alimentarios para aquellos que, por razones religiosas o de salud, no pueden tomar proteínas o grasas ni aceites derivados de animales.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra los cambios en el tiempo de la velocidad de reacción de transesterificación utilizando una preparación de lipasa en polvo obtenida por el Ejemplo 2 (invención 1) y cuando se utiliza una preparación convencional de lipasa en polvo.

40 Mejor modo de llevar a cabo la invención

Se pueden utilizar *Rhizopus delemar* y *Rhizopus oryzae* de *Rhizopus sp.* como lipasa en la presente invención. Una lipasa de la presente invención es preferiblemente una lipasa 1,3- específica.

45 Ejemplos de una lipasa incluyen la Picantase R8000 (producto de Robin) y Lipasa F- AP15 (producto de Amano Enzyme Inc.). La lipasa más preferible es la Lipasa DF "Amano" 15-K (también referida como Lipasa D) derivada de *Rhizopus oryzae*, un producto de Amano Enzyme Inc. Este producto es una lipasa en polvo. Aclarar que la Lipasa DF "Amano" se consideraba originalmente una lipasa derivada de *Rhizopus delemar*.

Una lipasa utilizada en la presente invención puede ser una que se obtiene por secado de una solución acuosa que la contiene, tal como una solución acuosa que contiene un componente intermedio de una lipasa.

5 Un polvo de soja que tiene un contenido graso del 5% de la masa o más que se usa en la presente invención, preferiblemente tiene un contenido graso del 10% de la masa o más, y más preferiblemente tiene un contenido graso del 15% de la masa o más, y por otro lado, preferiblemente tiene un contenido graso del 25% de la masa o menos. Es particularmente preferible un polvo de soja que tiene un contenido graso del 18-23 % de la masa. Ejemplos de grasas incluyen triglicéridos de ácidos grasos y análogos de los mismos. El contenido graso de las sojas se puede medir fácilmente mediante métodos tales como el de extracción de Soxhlet y similares.

10 En la presente invención, se puede utilizar como polvo de soja, un polvo de soja de grasa entera. Es también posible utilizar leche de soja como materia prima de un polvo de soja. Se puede producir un polvo de soja mediante aplastamiento de la soja, de acuerdo con el método común, y el diámetro de partícula del mismo es preferiblemente de alrededor de 0,1-600 μm .

El uso de un polvo de soja respecto de la lipasa es preferiblemente de 0,1-200 veces en masa, más preferiblemente 0,1-20 veces, y lo más preferiblemente 0,1-10 veces.

15 Una preparación de lipasa en polvo de la presente invención preferiblemente tiene un contenido acuoso del 10% de la masa o menos, y de modo particularmente preferible de 1-8% de la masa.

20 Se puede seleccionar arbitrariamente un diámetro de partícula de una preparación de lipasa en polvo de la presente invención, y el 90% de la masa o más de la preparación de lipasa en polvo tiene preferiblemente un diámetro de partícula de 1-100 μm . El diámetro medio de partícula de las mismas es de preferiblemente 10-80 μm . Además, la forma de la preparación de lipasa en polvo es preferiblemente esférica.

El diámetro de partícula de una preparación de lipasa en polvo se puede medir mediante utilización del analizador de distribución del tamaño de partícula (LA-500) de HORIBA, Ltd, por ejemplo.

25 Una preparación de lipasa en polvo de la presente invención se puede producir por el método que comprende la etapa de secar una solución acuosa en la que están disueltos o dispersos una lipasa y un polvo de soja, y dicho secado es uno de los tipos de métodos seleccionados de secado de rocío, liofilización, y precipitación/secado del disolvente.

30 Una solución acuosa en la que están disueltos o dispersos una lipasa y un polvo de soja, se puede obtener mediante disolución y dispersión en agua de una lipasa en polvo y un polvo de soja; mediante mezclado de una lipasa en polvo en una solución acuosa en la que está disuelto o disperso un polvo de soja; o, como se menciona abajo, por mezclado de un polvo de soja en una solución acuosa que contiene una lipasa.

En el proceso de secado de una solución acuosa en la que están disueltos o dispersos una lipasa y un polvo de soja, partículas de una lipasa y/o las de un polvo de soja, se aglutinan para formar un material granulado que comprende una lipasa y un polvo de soja. Este material granulado puede comprender el componente intermedio de una lipasa.

35 La preparación de lipasa en polvo así preparada se puede usar en transesterificación o esterificación sin modificación.

40 La masa de agua en una solución acuosa en la que están disueltos o dispersos una lipasa y un polvo de soja, se ajusta respecto al total de la masa de una lipasa y un polvo de soja. Más específicamente, la masa de agua por masa total de una lipasa y un polvo de soja es preferiblemente de 0,5-1.000 veces, más preferiblemente de 1,0-500 veces y más preferiblemente de 3,0-100 veces.

45 Particularmente, cuando se produce una preparación de lipasa en polvo por secado de rocío, la masa de agua por masa total de una lipasa y un polvo de soja es preferiblemente de 2,0-1000 veces, más preferiblemente de 2,0-500 veces y más preferiblemente de 3,0-100 veces por lo característico del secador de rocío. Entretanto, cuando una solución acuosa que contiene una lipasa se utiliza como una materia prima y el contenido de lipasa está poco claro en dicha solución acuosa, el contenido de lipasa se obtiene por pulverización de la solución acuosa que contiene una lipasa, por liofilización u otro método a baja presión, y la masa de una lipasa se puede calcular basándose en el contenido de lipasa obtenido.

50 Ejemplos de una solución acuosa que contiene una lipasa incluyen un cultivo de lipasa de los cuales se retira el contenido de hongos, un cultivo purificado, una solución acuosa en la que una lipasa obtenida a partir de dicho cultivo(s) se disuelve o dispersa de nuevo, una solución acuosa en la que una lipasa en polvo comercializada se disuelve o dispersa de nuevo, y una lipasa líquida comercializada. Además, son más preferibles para mejorar la actividad de una lipasa las soluciones acuosas de las cuales se elimina un componente de bajo peso molecular tales como sales. Además, las soluciones acuosas de las que se elimina un componente de bajo peso molecular tales como azúcares, son más preferibles para mejorar las propiedades del polvo.

- 5 Ejemplos de un cultivo de lipasa incluyen soluciones acuosas que contienen harina de soja, peptona, licor de maíz fermentado, K_2HPO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ o similares. Las concentraciones de los mismos son como sigue: harina de soja 0,1-20% en masa y preferiblemente 1,0-10% en masa; peptona 0,1-30% en masa y preferiblemente 0,5-10% en masa; licor de maíz fermentado 0,1-30% en masa y preferiblemente 0,5-10% en masa; K_2HPO_4 0,01-20% en masa y preferiblemente 0,1-5% en masa; $(NH_4)_2SO_4$ 0,01-20% en masa y preferiblemente 0,05-5% en masa. Las condiciones de cultivo de los mismos se pueden controlar como sigue: la temperatura de cultivo es de 10-40°C y preferiblemente de 20-35°C; la cantidad de flujo de aire es de 0,1-2,0VVM y preferiblemente de 0,1-1,5VVM; la velocidad de rotación de agitación es de 100-800rpm y preferiblemente de 200-400rpm; pH de 3,0-10,0 y preferiblemente de 4,0-9,5.
- 10 La separación del contenido de hongos se realiza preferiblemente por centrifugación, filtración en membrana, o similares. La eliminación de componentes de bajo peso molecular tales como sales y azúcares se pueden hacer con membranas ultrafiltrantes. Más específicamente después del tratamiento con membranas ultrafiltrantes, una solución acuosa que contiene una lipasa se concentra tanto como para conseguir la ½ del volumen de los mismos; y luego, se añade la misma cantidad de un tampón fosfato como la de la solución concentrada. Repitiendo estos
- 15 procedimientos 1-5 veces, es posible obtener una solución acuosa que contiene una lipasa de la que se ha eliminado un componente de bajo peso molecular.
- 20 La fuerza centrífuga de la centrifugación se controla preferiblemente a 200-20.000 × g. Igualmente, la presión de la membrana de filtración se controla preferiblemente a 3,0kg/m² o menos en membranas de microfiltración, filtro prensa y similares. En el caso de enzimas con contenido de hongos, es preferible aglomerar las células de las mismas por un homogenizador, licuadora, alteración ultrasónica, prensa francesa, molinillo o similares, y luego eliminar los residuos celulares por centrifugación, membrana de filtración, o similares. La velocidad de rotación por agitación del homogenizador es de 500-30.000rpm y preferiblemente de 1.000-15.000rpm. La velocidad de rotación de la licuadora es de 500-10.000rpm y preferiblemente 1.000-5.000rpm. El tiempo de agitación es de 0,5-10 minutos y preferiblemente de 1-5 minutos. La rotura ultrasónica se realiza bajo la condición de 1-50 KHz y preferiblemente de
- 25 10-20 KHz. Es preferible que el molino de bolas tenga pellets de vidrio con el diámetro de 0,1-0,5mm.
- 30 En alguna etapa antes del proceso de secado, es posible concentrar una solución acuosa que contiene una lipasa. El método de concentración no está particularmente limitado, y ejemplos de los mismos incluyen un evaporador, un evaporador rápido, la concentración por ultrafiltración, la concentración por microfiltración, salazón mediante sales inorgánicas, precipitación con disolventes, absorción con celulosas intercambiadoras de iones y similares, absorción de agua con geles absorbentes de agua. Entre ellos son preferibles la concentración por ultrafiltración y el evaporador. El módulo de la concentración mediante ultrafiltración es como sigue: una membrana lisa o membrana de fibras huecas que tiene un peso molecular fraccionado de 3,000-100,000 y más preferiblemente de 6,000-50,000; y el material de la misma es preferiblemente poliacrilonitrilo, polisulfona, o similares.
- 35 A continuación, en la presente invención se describen los métodos de secado de rocío, liofilización, y precipitación/secado con disolvente, cada uno de los cuales es el método de secado de una solución acuosa en la que están disueltos o dispersos una lipasa y un polvo de soja.
- 40 El secado de rocío se realiza preferiblemente utilizando secadores de rocío tales como un secador de flujo en contracorriente con una boquilla(s), un secador de flujo en contracorriente con un disco, un secador de flujo simultáneo con una boquilla(s) y un secador de flujo con un disco. Es más preferible el secador de flujo simultáneo con un disco, y es preferible controlar las condiciones del secado de rocío como sigue: la velocidad de rotación del atomizador es de 4,000-20,000rpm; y el calor es de 100-200°C para la temperatura de entrada y de 40-100°C para la temperatura de salida. Particularmente, es preferible ajustar la temperatura de una solución acuosa que contiene una lipasa y un polvo de soja a 20-40°C, y luego secar el rocío de la solución en una atmósfera seca de 70-130°C. Es también preferible ajustar el pH de la solución acuosa a 7,5-8,5 antes del secado.
- 45 La liofilización se realiza preferiblemente utilizando un liofilizador de sobremesa para una pequeña cantidad de muestra, una placa tipo liofilizador, o similares. Además, es también posible secar la solución a baja presión.
- 50 La precipitación/secado se realiza mediante el método que comprende las etapas de añadir gradualmente una solución acuosa en la que están dispersos o disueltos una lipasa y un polvo de soja para generar un precipitado, centrifugar el precipitado obtenido con una centrifuga para recogerlo, y luego secar el precipitado recogido a baja presión. Preferiblemente se realiza una secuencia de operaciones bajo condición de baja o muy baja temperatura ambiente de la habitación, para prevenir la desnaturalización y/o deterioro de una preparación de lipasa en polvo.
- 55 Ejemplos de disolventes usados en la precipitación con disolvente incluyen los disolventes solubles en agua o hidrofílicos tales como etanol, acetona, metanol, alcohol isopropílico y hexano, y también son utilizables mezclas de disolventes de los mismos. Entre ellos, se utiliza preferiblemente etanol o acetona para mejorar la actividad de una preparación de lipasa en polvo.
- Aunque la cantidad del disolvente usado no está particularmente limitada, es preferible usarlo 1-100 veces por volumen de disolvente para un volumen de una solución acuosa en la que están disueltos o dispersos una lipasa o polvo de soja, y es más preferible usarlo de 2-10 veces por volumen de disolvente.

Después de la precipitación del disolvente, el precipitado se puede obtener por filtración, y también por centrifugación moderada en torno a 1.000-3.000 × g. El secado del precipitado obtenido se puede realizar, por ejemplo, por secado a baja presión.

- 5 En la presente invención, ésteres de ácidos grasos y/o ácidos grasos pueden ser además añadidos en el proceso de producir una preparación de lipasa en polvo. Más específicamente, se puede obtener una preparación de lipasa en polvo por el método que comprende las etapas de poner en contacto ésteres de ácidos grasos y/o ácidos grasos con una solución acuosa en la que están disueltos o dispersos una lipasa y un polvo de soja, y secar la mezcla. La actividad de la lipasa y la estabilidad de la preparación de lipasa en polvo se pueden mejorar por contacto de ésteres de ácidos grasos y/o ácidos grasos como se ha mencionado arriba.
- 10 Ejemplos de ésteres de ácidos grasos incluyen ésteres de ácidos grasos entre monoalcoholes o polialcoholes y ácidos grasos. Los ésteres de ácidos grasos de polialcoholes pueden ser ésteres parciales o enteros.
- 15 Ejemplos de monoalcoholes incluyen alquilo monoalcoholes y esteroides tales como fitoesteroides. La parte alquilo que constituye los alquilo monoalcoholes es preferiblemente un alquilo de cadena media que tiene 6-12 átomos de carbono o un alquilo de cadena larga que tiene 13-22 átomos de carbono, cada uno de los cuales es saturado o insaturado, y lineal o ramificado. Los fitosteroides son preferiblemente sitosterol, estigmasterol, campesterol, fucosterol, espinasterol, brasicasterol, y similares. Ejemplos de polialcoholes incluyen glicerinas condensadas tales como glicerina, diglicerina, y decaglicerina, glicoles tales como propilenglicol, y sorbitol.
- 20 Aunque los ácidos grasos constituyentes de los ésteres de ácidos grasos y los ácidos grasos usados no están particularmente limitados, son preferibles derivados de grasas y aceites. Ejemplos de los mismos incluyen ácidos grasos de cadena media que tienen 6-12 átomos de carbono, por ejemplo ácido hexanoico, ácido octanoico, ácido decanoico, y ácido undecanoico; ácidos grasos insaturados de cadena larga que tienen 13-22 átomos de carbono, por ejemplo ácido oleico, ácido linoleico, ácido linoléico, ácido ricinoleico, y ácido erúxico. Los ejemplos también incluyen ácidos grasos saturados de cadena larga, por ejemplo ácido tetradecanoico, ácido hexadecanoico, ácido octadecanoico, ácido eicosanoico y ácido docosanoico.
- 25 Los ésteres de ácidos grasos utilizados son preferiblemente uno o más tipo(s) seleccionados de un grupo que consiste de diglicéridos y monoglicéridos cada uno de los cuales comprende como constituyentes grasas y aceites o ácidos grasos derivados de grasas y aceites. Además, es también posible utilizar una mezcla de ácidos grasos y ésteres parciales obtenidos por hidrólisis de una parte de los ésteres de ácidos grasos.
- 30 Por lo tanto, es preferible seleccionar los mismos ésteres de ácidos grasos y ácidos grasos utilizados en la preparación de la lipasa en polvo como materias primas utilizadas en transesterificación o esterificación utilizando una preparación de lipasa en polvo.
- Las grasas y aceites utilizados como ésteres de ácidos grasos no están particularmente limitados, y cuando se produce una preparación de lipasa en polvo realizando hidrólisis y esterificación, es preferible utilizar grasas y aceites líquidos a la temperatura de reacción.
- 35 Ejemplos de grasas y aceites incluyen uno o mezclas de dos o más tipos seleccionados de grupos que consisten en grasas y aceites vegetales tales como aceite de colza, aceite de girasol, aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de palma, aceite de semilla de sésamo, aceite de cártamo, aceite de soja, y grasas y aceites alto oleico, aceite de semilla de algodón, aceite de arroz, aceite de semilla de lino, aceite de palma, aceite fraccionado de aceite de palma, aceite de semilla de palma, aceite de camelia, manteca de cacao, manteca de karité, mantequilla de illipe; triglicéridos (grasas y aceites sintéticos) tales como trioleína (trioleato de glicerol), tricaprilina (trioctanoato de glicerol), triacetina (triacetato de glicerol) y tributirina (tributanoato de glicerol); y grasas y aceites animales tales como aceite de pescado, sebo de vacuno y de cerdo. De entre ellas son preferibles las grasas y aceites vegetales.
- 40 Cuando utilizamos ésteres de ácidos grasos, o ésteres de ácidos grasos y ácidos grasos como materias primas, se puede producir una preparación de lipasa en polvo por el método que comprende las etapas de añadir y poner en contacto ésteres de ácidos grasos, o ésteres de ácidos grasos y ácidos grasos, con una solución acuosa en la que están disueltos o dispersos una lipasa y un polvo de soja, agitar la mezcla uniformemente con un agitador, con uno o tres motores, o similar para hidrolizarla y/o emulsionarla o dispersarla, y luego secar la mezcla por uno de los métodos seleccionados de secado de rocío, liofilización, y precipitación/secado de disolvente.
- 45 Es también posible secar la mezcla por la deshidratación que acompaña a la reacción de esterificación. Concretamente, una preparación de lipasa en polvo se puede producir por el método que comprende las etapas de hidrolizar y/o emulsionar y dispersar la mezcla, luego realizar la reacción de esterificación de la mezcla deshidratándola, y si es necesario, filtrar una parte oleosa de la misma, tal como las sustancias que no han reaccionado.
- 50 La cantidad añadida de ésteres de ácidos grasos y/o ácidos grasos utilizados en la producción de una preparación de lipasa en polvo es preferiblemente de 0,1-500 veces en masa por un total de masa de un polvo de lipasa y soja, más preferiblemente de 0,2-100 veces en masa, y más preferiblemente de 0,3-5 veces en masa.
- 55

- 5 Mientras tanto, cuando se produce una preparación de lipasa en polvo por secado de rocío, la cantidad añadida de los ésteres de ácidos grasos y/o ácidos grasos por un total de masa de un polvo de lipasa y soja es preferiblemente de 0,1-10 veces en masa, más preferiblemente 2,0-10 veces en masa y lo más preferiblemente 3,0-10 veces en masa. Esto es porque, en el caso de utilizar un secador de rocío, cuando la cantidad añadida de ésteres de ácidos grasos y/o ácidos grasos aumenta, hay problemas de que el agua se evapore insuficientemente o que resulte difícil recoger la preparación de lipasa en polvo obtenida debido al exceso de ésteres de ácidos grasos y/o ácidos grasos.
- 10 Si bien, el límite máximo para la cantidad añadida de ésteres de ácidos grasos y/o ácidos grasos utilizados puede ser mayor según la modificación de los dispositivos de secado de rocío o los cambios en las formas recogidas, en caso de comprender menos ésteres de ácidos grasos y/o ácidos grasos de los necesarios, se requiere el proceso de filtración.
- 15 Cuando la producción de una preparación de lipasa en polvo comprende ésteres de ácidos grasos y/o ácidos grasos por precipitación de disolvente, es preferible, como cantidad de disolvente utilizada, utilizar de 1-100 veces por volumen de disolvente por total de masa de los ésteres de ácidos grasos y/o ácidos grasos y una solución acuosa en donde están disueltos o dispersos una lipasa y un polvo de soja, y más preferiblemente utilizar de 2-10 veces por volumen de disolvente.
- 20 Cuando se añade un coadyuvante de filtración antes de realizar la precipitación del disolvente, una masa de coadyuvante de filtración se incluye también en el total de la masa anteriormente mencionada, y el disolvente que se utiliza se basa en el total de dicha masa.
- 25 En la presente invención, se puede incluir en la misma, un proceso de adición de un coadyuvante de filtración.
- 30 Cuando el secado se realiza por deshidratación acompañando a la reacción de esterificación, es posible añadir un coadyuvante de filtración antes, durante o después de la reacción de esterificación. Es preferible añadir el coadyuvante de filtración ya que la filtración se puede realizar sin problemas después de la reacción de esterificación.
- 35 Cuando se añade un coadyuvante de filtración después o durante la reacción de esterificación, es posible añadir además grasas y aceites a la vez. Como la viscosidad de una solución aumenta por adición de la misma, en caso de que la agitación no se produzca sin problemas, la fluidez de la reacción de la solución se mejora añadiendo grasas y aceites como se menciona anteriormente.
- 40 Ejemplos de coadyuvantes de filtración utilizables incluyen gel de sílice, sellite, celulosa, almidón, dextrina, carbono activo, tierra activa, caolín, bentonita, talco y arena. Entre ellos, se prefiere el gel de sílice, sellite y celulosa. El diámetro de partícula del coadyuvante de filtración se puede seleccionar arbitrariamente, es preferible de 1-100 μ y particularmente preferible de 5-50 μ m.
- 45 El coadyuvante de filtración utilizado antes, durante o después de la reacción de esterificación se añade preferiblemente en una cantidad del 1-500% de la masa por un total de masa de una lipasa y polvo de soja, y más preferiblemente en una cantidad del 10-200% de la masa. Cuando utilizamos el coadyuvante de filtración en la cantidad dentro del intervalo arriba marcado, la carga de filtración es menor, y no se requiere un dispositivo de filtración a gran escala o pretratamiento de filtración tal como una centrífuga de alto rendimiento.
- 50 Además, es posible incluir un coadyuvante de filtración en una preparación de lipasa en polvo de la presente invención la cual es obtenida por secado o por el método de reacción de esterificación acompañada de deshidratación. Cuando se obtiene una preparación de lipasa en polvo por secado de rocío o liofilización, se puede añadir un coadyuvante de filtración antes o después del secado.
- 55 Cuando el secado se realiza después de la precipitación del disolvente, es preferible añadir un coadyuvante de filtración a la preparación de lipasa en polvo obtenida por secado.
- 60 La cantidad de coadyuvante de filtración comprendido en la preparación de lipasa en polvo obtenida puede ser de 1-500% en masa basado en el total de lipasa y polvo de soja, y preferiblemente de 10-200% en masa.
- 65 A continuación, se describe en la presente invención el método para producir un producto transesterificado o un producto esterificado, cada uno de los cuales es obtenido por transesterificación o esterificación utilizando una preparación de lipasa en polvo de la presente invención.
- 70 La reacción de transesterificación realizada utilizando una preparación de lipasa en polvo de la presente invención, es una reacción de transesterificación de ésteres de ácidos grasos con una o más clases seleccionadas de ésteres de ácidos grasos, ácidos grasos y alcoholes. Ejemplos de los mismos incluyen transesterificación entre grasas y aceites de acuerdo con el método ordinario, transesterificación de grasas y aceites con ésteres de ácidos grasos, y transesterificación de alcoholisis o acidólisis.
- 75 Además, la reacción de transesterificación realizada utilizando una preparación de lipasa en polvo de la presente invención, es una reacción de esterificación de ésteres parciales de ácidos grasos con ácidos grasos, o una reacción

de esterificación de mono o polialcoholes con ácidos grasos. Ejemplos de los mismos incluyen una reacción de esterificación de glicerina con ácidos grasos.

5 Más específicamente, como reacción de transesterificación entre grasas y aceites, es posible transesterificar aceite de colza, el cual es un triglicérido de un ácido graso de cadena larga y un trioctanoato de glicerol, el cual es un triglicérido de un ácido graso de cadena media derivado de vegetales, y producir un triglicérido que comprende ácidos grasos de cadena larga y cadena media.

10 Además, como reacción de transesterificación de grasas y aceites y ácidos grasos utilizando acidólisis, es posible producir grasas y aceites estructurados en los que una lipasa 1,3-específica tiene un uso significativo. Este es el método por el cual un ácido graso específico está a la izquierda de la segunda posición de la estructura de glicerina y los ácidos grasos en primera y tercera posiciones se reemplazan por ácidos grasos deseados. Las grasas y aceites obtenidos se pueden utilizar en chocolates que tienen efectos nutricionales específicos.

La condición de la reacción de transesterificación o la reacción de esterificación utilizando una preparación de lipasa en polvo no está particularmente limitada, y cada reacción se puede realizar por el método ordinario.

15 Generalmente, la reacción se realiza a presión ordinaria o reducida, previniendo la contaminación del agua que causa la hidrólisis. Aunque la temperatura de reacción depende de la materia prima utilizada y del punto de congelación de la mezcla en el que se combina una materia prima, es preferiblemente de 20°-80°C, y si no está limitada por el punto de liofilización, es preferiblemente de 40-60°C.

20 La cantidad de aditivo de una preparación de lipasa en polvo en una reacción de materia prima es preferiblemente de 0,05-10% en masa y más preferiblemente 0,05-5% en masa. La cantidad más adecuada se determina de acuerdo con la temperatura de reacción, tiempo de reacción, actividad de la preparación de lipasa en polvo obtenida, y similares. Después de que se complete la reacción, la preparación de lipasa en polvo se recoge por filtración y centrifugación, y se puede utilizar repetidamente (evaluación de estabilidad) hasta que la actividad de la misma disminuye hasta el punto en que producir la preparación de lipasa en polvo es imposible.

25 Por consiguiente, es preferible que una lipasa, la cual es usualmente cara, pueda impartir alta actividad y alta estabilidad en la menor cantidad posible de la misma a la preparación de la lipasa en polvo.

30 Aunque el material transesterificado o esterificado así obtenido no está particularmente limitado, se utilizan preferiblemente grasas y aceites transesterificados o esterificados en el campo de la alimentación, y más preferiblemente las grasas y aceites transesterificados o esterificados derivados de aceites vegetales se pueden utilizar en la producción de alimentos o aditivos alimentarios para aquellos que, por razones religiosas o de salud, no pueden tomar proteínas o grasas y aceites derivados de animales.

A continuación, los ejemplos de producción y ejemplos ilustrarán la presente invención.

Ejemplo 1

35 Tres veces la cantidad de leche de soja (una dispersión de polvo de soja que tiene un 20% en masa de contenido graso: Meiraku Co., Ltd) se añaden con agitación a una solución enzimática (150000 U/mL) de Lipasa DF "Amano" 15-K (también referida como Lipasa D), un producto de Amano Enzyme Inc. Luego, el pH de la misma se ajusta a 7,8 con una solución de NaOH 0,5N (solución a temperatura ambiente de la habitación), y la mezcla se pulveriza a una temperatura de entrada de 130°C para realizar el secado de rocío (con SD-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd). El 95% en masa de la preparación de lipasa en polvo obtenida tenía un diámetro de partícula de 1-100 µm.

Ejemplo Comparativo 1

40 Una preparación de lipasa en polvo se obtuvo por el mismo método que el Ejemplo 1 excepto que no se añadió la leche de soja.

La actividad de cada preparación de lipasa en polvo obtenida en el Ejemplo 1 y en el Ejemplo Comparativo 1 se midieron de acuerdo con el siguiente método.

Método de medición de la actividad de la lipasa

45 Cada preparación de lipasa en polvo se añadió al aceite en el cual están mezclados en relación 1:1 (p) 1,2,3-trioleil glicerol y 1,2,3-trioctanoil glicerol, y reaccionaron a 60°C. 10µL de los mismos se tomaron como muestra a lo largo del tiempo, se diluyeron con 1,5 mL de hexano, y una solución en donde se filtró la preparación de lipasa en polvo, se tomó como muestra para cromatografía de gas (GC). La solución se analizó por GC(columna: DB-1th) y la velocidad de reacción se calculó a partir de la fórmula siguiente. Las condiciones de GC son: temperatura de la columna: 150°C, subida de temperatura: 15°C/min., y temperatura final 370°C.

50 Velocidad de reacción (%) = $\{C34\text{área} / (C24\text{área} + C34\text{área})\} \times 100$.

ES 2 537 325 T3

En donde, C24 es 1,2,3-trioctanoil glicerol; C34 es 1,2,3-trioctanoil glicerol en donde un ácido graso es reemplazado por un ácido oleico; y área es cada área de los mismos. Basado en la velocidad de reacción de cada tiempo, la velocidad de reacción constante k se calculó por un software analítico (origin ver. 6.1).

5 La actividad de la preparación de lipasa en polvo se representó por la actividad relativa cuando definimos el valor k de una solución enzimática secada por pulverización sin modificación como 100.

La Tabla 1 muestra los resultados de los mismos.

Tabla 1

	Condición (relación de volumen)	Velocidad de actividad (%)
Ejemplo Comparativo 1	Solución lipasa	100
Ejemplo 1	Solución lipasa: leche de soja=1:3(pH7,8)	504

De los resultados de la tabla 1, está claro que la actividad de la lipasa es mejorada drásticamente según la presente invención.

Ejemplo 2

10 Tres veces la cantidad de una solución acuosa al 10% de un polvo de soja de grasa entera desodorizada (contenido graso: 23% de la masa; nombre comercial: Alphaplus HS-600, producida por Nisshin Cosmo Foods, Ltd.) se añadieron con agitación a la misma solución enzimática (150000U/mL) de Lipasa DF "15-k que en el Ejemplo 1. Luego, se ajustó el pH de la misma a 7,8 con una solución de NaOH 0,5 N, y la mezcla se secó por pulverización (con SD-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd) (invención 1).

15 Cuando comparamos cada solución acuosa de polvo de soja de grasa entera desodorizada que tiene la concentración del 10% en masa (aquí en lo sucesivo referido como %), 15% (invención 2) y 20% (invención 3), se fue capaz de obtener un polvo cuya actividad de transesterificación es máxima por adición del 10% de la solución acuosa de las mismas.

20 Además, cuando se realizó previamente la esterilización en autoclave (121°C 15 minutos) de una solución al 10% de polvo de soja de grasa entera desodorizado y la solución se fue enfriando a temperatura ambiente y se convirtió en polvo de acuerdo con el proceso arriba mencionado (invención 4), se fue capaz de obtener un polvo enzimático que tiene una actividad aún mayor.

La Tabla 2 muestra los resultados de los mismos

Tabla 2

	Condición (relación de volumen)	Velocidad de reacción(%)
Invención 1	Solución lipasa:10%HS-600=1:3(pH7,8)	409
Invención 2	Solución lipasa:15%HS-600=1:3(pH7,8)	209
Invención 3	Solución lipasa:20%HS-600=1:3(pH7,8)	227
Invención 4	Solución lipasa:10%HS-600=1:3(pH7,8)	440

25

Ejemplo 3

El tipo de harina de soja añadida a la misma solución enzimática (150000U/mL) de Lipasa DF "Amano" 15-k que en el Ejemplo 1 fue examinado. La concentración de una solución acuosa de harina de soja se fijó al 10%.

30 Una preparación de lipasa en polvo se preparó por el mismo método que en el Ejemplo 1 excepto que se utilizó una harina de soja U.S. (nombre comercial: Organic Soy Flour producido por Arrowhead Mills: después se preparó un líquido de la misma con un mezclador, colando a través de una gasa o similar, y se utilizó la solución obtenida; contenido graso: 7% en masa) o un polvo de soja desgrasado (nombre comercial: Soya Flour FT-N producido por Nisshin Cosmo Foods, Ltd.: contenido graso: 0,2% en masa, ejemplo comparativo 2).

La Tabla 3 muestra la actividad lipasa de cada preparación de lipasa en polvo obtenida.

Tabla 3

	Condición (relación de volumen)	Velocidad de actividad (%)
Ejemplo 3	Solución lipasa: 10% US harina de soja (pH7,8)	465
Ejemplo Comparativo 2	Solución lipasa: 10% polvo de soja desgrasado (pH7,8)	22

De los resultados de la Tabla 3, está claro que la actividad de la lipasa no puede mejorarse cuando usamos un polvo de soja desgrasado que tiene menos contenido graso.

Ejemplo 4

- 5 2g de la preparación de lipasa en polvo obtenida en el Ejemplo 2 (invención 1) se añadieron a 200g de oleína de Karité (nombre comercial: Lipex205 producido por Aarhuskarlshamn), y se agitaron a 60°C durante 20 horas para realizar la reacción de transesterificación. 10 µL de los mismos se toman como ejemplo a lo largo del tiempo, diluídos con 1,5 mL de hexano, y una solución en la que se filtra la enzima en polvo se tomó como muestra para cromatografía de gas (GC). La razón de distearoil monooleil glicerol (una mezcla de SSO y SOS) en la composición de triacilglicérido se definió como velocidad de reacción. Similarmente, se realizó la reacción de transesterificación de la preparación de lipasa en polvo obtenida en el Ejemplo Comparativo. Como resultado, como se muestra en la
- 10 Figura 1, estaba claro que la actividad de la enzima obtenida en el Ejemplo 2 era obviamente mayor.

REIVINDICACIONES

1. Una preparación de lipasa en polvo que es un material granulado que comprende una lipasa derivada de *Rhizopus oryzae* y/o una lipasa derivada de *Rhizopus delemar* y un polvo de soja que tiene un contenido graso del 5% en masa o más.
- 5 2. La preparación de lipasa en polvo según la reivindicación 1, en la que el contenido graso del polvo de soja es del 10-25% en masa.
3. La preparación de lipasa en polvo según la reivindicación 1 o 2, en la que el polvo de soja es un polvo de soja de grasa entera.
- 10 4. La preparación de lipasa en polvo según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el 90% en masa o más de la preparación de lipasa en polvo tiene un tamaño de partícula de 1-100 μm .
5. La preparación de lipasa en polvo según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para transesterificación o esterificación.
- 15 6. Un método para producir una preparación de lipasa en polvo, que comprende la etapa de secar una solución acuosa en la que están disueltos o dispersos una lipasa derivada de *Rhizopus oryzae* y/o una lipasa derivada de *Rhizopus delemar* y un polvo de soja que tiene un contenido graso del 5% en masa o más.
7. El método según la reivindicación 6, que comprende la etapa de ajustar el pH de la solución acuosa a 7,5-8,5 antes del secado.
8. El método según la reivindicación 6 o 8, en donde el secado se realiza por secado de rocío.
- 20 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 6-8, que comprende ajustar la temperatura a 20-40 °C de la solución acuosa que comprende la lipasa y el polvo de soja justo antes del secado de rocío; y pulverizar la solución en atmósfera seca de 70-130°C.
10. Un método para producir un producto transesterificado o un producto esterificado que comprende la etapa de transesterificar o esterificar uno o más tipos seleccionados de ésteres de ácidos grasos, ácidos grasos, y alcoholes, utilizando la preparación de lipasa en polvo según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

25

FIGURA 1

