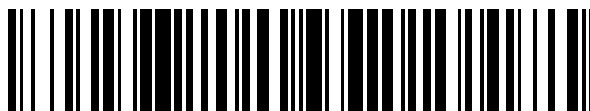


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 959**

51 Int. Cl.:

C12N 11/06 (2006.01)

C12N 11/08 (2006.01)

C12N 9/20 (2006.01)

C12P 7/40 (2006.01)

C12P 7/62 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2006 E 11189338 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015 EP 2439268**

54 Título: **Enzimas inmovilizadas y métodos para usar las mismas**

30 Prioridad:

16.06.2005 US 691061 P

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

16.02.2016

73 Titular/es:

**DSM NUTRITIONAL PRODUCTS AG (100.0%)
Wurmisweg 576
4303 Kaiseraugst, CH**

72 Inventor/es:

**KRALOVEC, JAROSLAV A. y
WANG, WEIJIE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 559 959 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Enzimas inmovilizadas y métodos para usar las mismas

Campo

El tema divulgado se refiere a métodos para esterificar un ácido graso usando enzimas inmovilizadas.

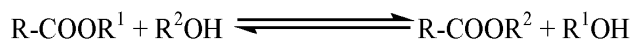
5 Antecedentes

Los efectos beneficiosos de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés) de cadena larga que son característicos de los lípidos marinos, especialmente ácido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (EPA) y ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico (DHA), sobre la disminución de triglicéridos séricos están ahora bien establecidos. Estos compuestos también se conocen por otros beneficios cardioprotectores y otros efectos biológicos. Entre los beneficios más frecuentemente mencionados están los relacionados con la prevención y el tratamiento de la inflamación, enfermedades neurodegenerativas y anormalidades del desarrollo cognitivo. El público es cada vez más consciente de los beneficios para la salud del aceite de pescado y concentrados de DHA y EPA, como se evidencia a partir de las ventas mundiales de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Por ejemplo, las ventas de PUFA ascendieron un 50% en 2002, y fueron los únicos de todas las categorías de productos nutracéuticos que tuvieron un incremento de ventas significativo.

Zuta y cols. describen la síntesis de acilglicerolos a partir de ácidos grasos ω -3 e isómeros de ácido linoleico conjugados en *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2006, 43(1), 25-32. Se conocen varios métodos para producir concentrados de PUFA a partir de aceites marinos, por ejemplo, hidrólisis selectiva con lipasas, complejación de PUFA usando urea (o estructuras moleculares huésped-hospedante más sofisticadas que implican el control métrico), y una retirada física de componentes no deseados mediante fraccionación. La Publicación de EE. UU. N° 2004/0236128 describe la separación de EPA a partir de DHA al precipitar sal magnésica de EPA.

Una fraccionación que implica destilación molecular se efectúa habitualmente sobre ésteres etílicos preparados a partir de los triglicéridos de partida ya que son más volátiles que los triglicéridos correspondientes. Sin embargo, hay una controversia en cuanto a si los ésteres etílicos de PUFA están tan biodisponibles como sus homólogos de triglicérido. Por lo tanto, hay una necesidad de reesterificar los ésteres hasta los triglicéridos correspondientes.

La reacción que describe la formación de triglicéridos a partir de los ésteres etílicos de aceite de pescado es la transesterificación. La transesterificación es un procedimiento en el que un éster se convierte en otro éster a través de intercambio de los restos alcoxi.



La reacción es un procedimiento de equilibrio y la transformación se produce de forma esencial simplemente mezclando los dos componentes. Sin embargo, se ha observado que la reacción es acelerada por catalizadores de ácido de Lewis (tales como BBR_3 , AlCl_3 , etc., embebidos en poliestireno-divinilbenceno), catalizadores de ácido de Bronsted tales como HCl , H_3PO_4 , H_2SO_4 , $p\text{-TosOH}$, o catalizadores básicos tales como alcóxidos metálicos, hidróxidos metálicos y carbonatos metálicos.

Sin embargo, se ha hecho evidente que la reacción de transesterificación bajo estas condiciones no cumple en muchos casos los requisitos de la química sintética moderna, es decir, condiciones de reacción muy eficientes y regioselectivas. Así, han continuado los esfuerzos para efectuar transesterificaciones bajo condiciones más suaves y para controlar la aleatorización. Entre los catalizadores químicos desarrollados, se encontró que el distanoxano era eficaz para la transesterificación de diversos tipos de ésteres; sin embargo, este catalizador es difícil de preparar y no está disponible comercialmente, al menos en grandes cantidades. El método de transesterificación mediado por titanato es extremadamente suave pero no consigue ciertos tipos de transesterificaciones. De forma similar, las reacciones catalizadas por DMAP o las reacciones en presencia de superácidos basados en estaño tienen diferentes perfiles de selectividad de reacción. También se han hecho intentos satisfactorios de realizar transesterificaciones usando zeolitas, alúmina cromatográfica neutra o caolinitas.

A pesar de los avances en la química sintética moderna, los catalizadores industriales más populares son las bases fuertes. Son económicas, pero debido a su naturaleza generan un grado significativo de productos secundarios, particularmente a las altas temperaturas necesarias para alcanzar los rendimientos deseables. Además, no son regioselectivas y conducen a reacciones secundarias. Aunque pueden ser buenas elecciones para entidades químicas estables y estructuralmente adecuadas, no se prefieren para productos complejos tales como, por ejemplo, aceites de pescado. En el caso de los aceites de pescado, las transesterificaciones catalizadas enzimáticamente son una alternativa viable, puesto que son regioselectivas y virtualmente no generan productos secundarios. Sin embargo, generalmente, su desventaja es su coste.

El uso de enzimas inmovilizadas en métodos para la esterificación de ácidos grasos se divulga, por ejemplo, en los documentos WO 95/33047, US 5569594, US 6605452 y WO 01/62906

Por lo tanto, hay una necesidad de transesterificar ésteres complejos tales como, por ejemplo, ésteres de ácidos grasos poliinsaturados en ésteres más útiles. También hay una necesidad de una esterificación eficaz de ácidos carboxílicos complejos tales como ácidos grasos. Los procedimientos deben tener una alta eficacia con respecto a la transesterificación y la esterificación y sin embargo no producir productos secundarios no deseables. El procedimiento también debe ser relativamente económico para aplicaciones comerciales. Finalmente, los ésteres producidos por los métodos descritos en la presente memoria deben estar listos para ser incorporados en numerosos productos alimenticios sin el requisito de retirar impurezas adicionales del procedimiento de transesterificación. Los métodos descritos en la presente memoria satisfacen estas necesidades experimentadas desde hace mucho tiempo.

10 Sumario

Según los propósitos de los materiales, los compuestos, las composiciones, los artículos y los métodos divulgados, que se incorporan y se describen ampliamente en la presente memoria, la materia divulgada se refiere a métodos para esterificar un ácido graso utilizando enzimas inmovilizadas.

15 Ventajas adicionales se indicarán en parte en la descripción que sigue, y en parte serán obvias a partir de la descripción, o se pueden aprender mediante la práctica de los aspectos descritos posteriormente. Las ventajas descritas posteriormente se conocerán y alcanzarán por medio de los elementos y las combinaciones apuntados particularmente en las reivindicaciones adjuntas. Se debe entender que tanto la descripción general precedente como la siguiente descripción detallada son solamente ejemplares y explicativas y no son restrictivas.

Breve descripción de las figuras

20 Las figuras adjuntas, que se incorporan en y constituyen una parte de esta memoria descriptiva, ilustran varios aspectos descritos posteriormente.

La Figura 1 es un esquema de un procedimiento para la transformación enzimática de ésteres etílicos (o ácidos grasos libres) en triglicéridos. En la figura, 1 representa un recipiente de contención calentado removido, 2 representa una bomba de cizalladura, 3 representa un reactor de lecho enzimático fijo (FEBR, por sus siglas en inglés), 4 representa un depósito de evaporación, y 5 representa un condensador. El reactor 3 puede ser de geometría variable (p. ej., longitud > altura o longitud < altura).

La Figura 2 es una gráfica de una conversión enzimática de ácidos grasos libres en un triglicérido con una enzima CALB inmovilizada sobre una matriz de calidad alimentaria (AMBERLITE™ XAD 16HP). Se usó el mismo lecho enzimático para 40 rondas.

30 Descripción detallada

Los materiales, los compuestos, las composiciones, los artículos y los métodos descritos en la presente memoria se pueden entender más fácilmente mediante referencia a la siguiente descripción detallada de aspectos específicos de la materia divulgada y los Ejemplos incluidos en la presente memoria y a las Figuras.

35 Antes de que se divulguen y se describan los presentes materiales, compuestos, composiciones, artículos y métodos, se debe entender que los aspectos descritos posteriormente no están limitados a métodos sintéticos específicos o reactivos específicos, ya que estos, por supuesto, pueden variar. También se debe entender que la terminología usada en la presente memoria solamente tiene el propósito de describir aspectos particulares y no pretende ser limitativa.

Definiciones generales

40 En esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones que siguen, se hará referencia a un número de términos, que se definirán para tener los siguientes significados:

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, la palabra "comprenden" y otras formas de la palabra, tales como "que comprende(n)" y "comprende", significa incluir, pero no se limita a, y no pretende excluir, por ejemplo, otros aditivos, componentes, números enteros o etapas. Según se usan en la descripción y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un" "uno/una" y "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a "un compuesto" incluye mezclas de dos o más de tales compuestos, la referencia a "un ácido graso insaturado" incluye mezclas de dos o más de tales ácidos grasos insaturados, la referencia a "la matriz" incluye mezclas de dos o más de tales matrices, y similares. "Opcional" u "opcionalmente" significa que el suceso o la circunstancia descrito posteriormente se puede presentar o no, y que la descripción incluye casos en los que el suceso o la circunstancia se presenta y casos en los que no. Los intervalos se pueden expresar en la presente memoria como de "aproximadamente" un valor particular y/o a "aproximadamente" otro valor particular. Cuando se expresa tal intervalo, otro aspecto incluye

desde el valor particular y/o hasta el otro valor particular. De forma similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del precedente "aproximadamente," se entenderá que el valor particular forma otro aspecto. Se entenderá además que los puntos finales de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el otro punto final como independientemente del otro punto final. También se debe entender que hay un número de valores divulgados en la presente memoria, y que cada valor también se divulga en la presente memoria como "aproximadamente" ese valor particular además del propio valor. Por ejemplo, si se divulga en valor "10", entonces también se divulga "aproximadamente 10". También se debe entender que cuando se divulga un valor, entonces también se divulgan "menor que o igual al" valor, "mayor que o igual al valor" y posibles intervalos entre los valores, como se entiende apropiadamente por el experto en la especialidad. Por ejemplo, si se divulga el valor "10", entonces también se divulga "menor que o igual a 10" así como "mayor que o igual a 10". También se entiende que a lo largo de la solicitud, se proporcionan datos en un número de formatos diferentes y que estos datos representan puntos terminales y puntos de partida e intervalos para cualquier combinación de los puntos de datos. Por ejemplo, si se divulgan un punto de datos particular "10" y un punto de datos particular "15", se entiende que también se consideran divulgados mayor que, mayor que o igual a, menor que, menor que o igual a e igual a 10 y 15, así como entre 10 y 15. También se entiende que también se divulga cada unidad entre dos unidades particulares. Por ejemplo, si se divulgan 10 y 15, entonces también se divulgan 11, 12, 13 y 14.

Las referencias en la memoria descriptiva y las reivindicaciones finales a partes en peso de un elemento o componente particular en una composición indica la relación en peso entre el elemento o componente y cualesquiera otros elementos o componentes de la composición o el artículo para los que se exprese una parte en peso. Así, en un compuesto que contiene 2 partes en peso de componente X y 5 partes en peso de componente Y, X e Y están presentes en una relación en peso de 2:5, y están presentes en esta relación independientemente de si están contenidos en el compuesto componentes adicionales.

Un porcentaje en peso de un componente, a menos que se indique específicamente lo contrario, se basa en el peso total de la formulación o composición en la que se incluye el componente.

A menos que se indique lo contrario, una fórmula con enlaces químicos mostrados solo como líneas sólidas y no como cuñas o líneas de puntos contempla todos los isómeros posibles, p. ej., todos los enantiómeros y diastereoisómeros, y una mezcla de isómeros, tales como mezclas racémicas o escalémicas.

Se hará ahora referencia con detalle a aspectos específicos de los materiales, los compuestos, las composiciones, los artículos y los métodos divulgados, cuyos ejemplos se ilustran en los Ejemplos y las Figuras adjuntos.

Se divulgan en la presente memoria materiales, compuestos, composiciones y componentes que se pueden usar para, se pueden usar junto con, se pueden usar en una preparación para o son productos de los métodos y las composiciones divulgados. Estos y otros materiales se divulgan en la presente memoria, y se entiende que cuando se divulgan combinaciones, subconjuntos, interacciones, grupos, etc. de estos materiales, aunque no se pueda divulgar específicamente una referencia específica de cada una de diversas combinaciones y permutaciones individuales y colectivas de estos compuestos, cada uno se contempla y se describe específicamente en la presente memoria. Por ejemplo, si se divulga un compuesto y se divulga un número de modificaciones que se pueden hacer en un número de componentes o residuos del compuesto, se contemplan específicamente todas y cada una de las combinaciones y permutaciones que sean posibles a menos que se indique específicamente lo contrario. Así, si se divulga una clase de componentes o residuos A, B y C así como una clase de componentes o residuos D, E y F y se divulga un ejemplo de un compuesto combinado A-D, entonces incluso si cada uno no se cita individualmente, cada uno se contempla individualmente y colectivamente. Así, en este ejemplo, se contempla específicamente cada una de las combinaciones A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D, C-E y C-F y se debe considerar divulgada a partir de la divulgación de A, B y C; D, E y F; y la combinación ejemplar A-D. Asimismo, también se contempla y se divulga específicamente cualquier subconjunto o combinación de estos. Así, por ejemplo, se contempla específicamente el subgrupo de A-E, B-F y C-E y se debe considerar divulgado a partir de la divulgación de A, B y C; D, E y F; y la combinación ejemplar A-D. Este concepto se aplica a todos los aspectos de esta divulgación incluyendo, pero no limitados a, etapas de los métodos para elaborar y usar las composiciones divulgadas. Así, si hay una variedad de etapas adicionales que se pueden realizar, se entiende que cada una de estas etapas adicionales se puede realizar con cualquier aspecto específico o combinación de aspectos de los métodos divulgados, y que cada una de tales combinaciones se contempla específicamente y se debe considerar divulgada.

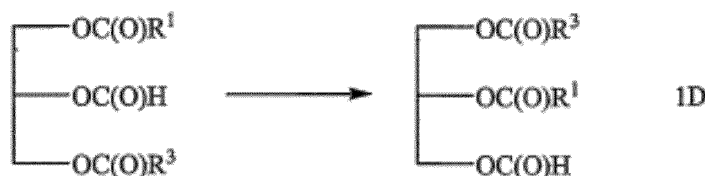
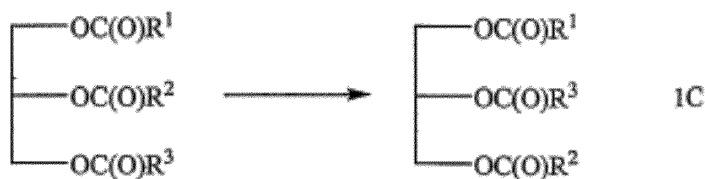
Ciertos materiales, compuestos, composiciones y componentes divulgados en la presente memoria se pueden obtener comercialmente o sintetizar fácilmente usando técnicas generalmente conocidas por los expertos en la especialidad. Por ejemplo, las materias primas y los reactivos usados para preparar los compuestos y las composiciones divulgados bien están disponibles de proveedores comerciales tales como Ocean Nutrition Canada, Ltd. (Dartmouth, Canadá), Aldrich Chemical Co., (Milwaukee, Wis.), Acros Organics (Morris Plains, N.J.), Fisher Scientific (Pittsburgh, Pa.) o Sigma (St. Louis, Mo.) o bien se preparan mediante métodos conocidos por los expertos en la especialidad siguiendo procedimientos indicados en referencias tales como Reagents for Organic Synthesis de Fieser and Fieser, Volúmenes 1-17 (John Wiley and Sons, 1991); Chemistry of Carbon Compounds de Rodd, Volúmenes 1-5 y Suplementos (Elsevier Science Publishers, 1989); Organic Reactions, Volúmenes 1-40 (John Wiley and Sons, 1991); Advanced Organic Chemistry de March, (John Wiley and Sons, 4ª Edición); y Comprehensive Organic Transformations de Larock (VCH Publishers Inc., 1989).

Enzimas inmovilizadas

En un aspecto, se divulgan en la presente memoria enzimas inmovilizadas que comprenden una enzima de esterificación, transesterificación o interesterificación/intraesterificación inmovilizada en una matriz de calidad alimentaria. Cada componente de las enzimas inmovilizadas divulgadas se describe posteriormente.

5 Enzimas

Las enzimas útiles en la presente memoria son cualesquiera enzimas naturales o sintéticas que se puedan usar para esterificar un ácido carboxílico o transesterificar un éster. El término "esterificar" se define en la presente memoria como la conversión de un ácido carboxílico en el éster correspondiente al hacer reaccionar el ácido carboxílico con un alcohol para producir el éster (p. ej., $\text{RCOOH} + \text{R}^1\text{OH} \rightarrow \text{RCOOR}^1 + \text{H}_2\text{O}$). El término "transesterificar" se define en la presente memoria como la conversión de un éster en otro al hacer reaccionar el éster con un alcohol para producir un éster diferente (p. ej., $\text{RCOOR}^1 + \text{R}^2\text{OH} \rightarrow \text{RCOOR}^2 + \text{R}^1\text{OH}$). El término "interesterificar" se define en la presente memoria como el intercambio de restos éster entre dos o más ésteres independientes separados. La interesterificación entre dos ésteres se representa en el esquema 1A, donde los grupos R^2 y R^4 se intercambian en las materias primas (es decir, R^1COOR^2 y R^3COOR^4). El esquema 1B representa la interesterificación entre un ácido carboxílico (R^1COOH) y un éster (R^3COOR^4), que produce un nuevo ácido carboxílico y éster. El término "intraesterificar" se define en la presente memoria como el intercambio de los restos éster dentro de la misma molécula. La intraesterificación se representa en el esquema 1C, donde los grupos R^2 y R^3 se intercambian en el triéster. El esquema 1D representa la intraesterificación entre un grupo ácido carboxílico y un éster dentro de la misma molécula, donde el hidrógeno del ácido carboxílico se intercambia por R^3 del grupo éster.



Esquema 1

Enzimas adecuadas se pueden derivar de un microorganismo. Ejemplos de microorganismos que pueden producir enzimas útiles en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, *Burkholderia* sp., *Candida antarctica* B, *Candida rugosa*, *Candida cylindracea*, *Pseudomonas* sp., *Candida antarctica* A, *Porcine pancreas*, *Humicola* sp., *Humicola* Y *lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Rhizopus javan.*, *Pseudomonas fluor*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida cylindracea*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Mucor jaanicus*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus* sp., *Rhizopus japonicus*, *Rhizomucor miehi*, *Rhizopus niveus* o *penicillium camembertii* (también *Rhizopus delemar*, *Pseudomonas aeruginosa*).

En los métodos de la invención, la enzima inmovilizada comprende CALB, que es una lipasa (lipasa B) de *Candida antarctica* producida mediante la fermentación sumergida de un microorganismo *Aspergillus oryzae* genéticamente modificado. CALB L NOVOZYME(TM) es un catalizador muy versátil con actividad para una gran variedad de diferentes sustratos. La enzima se usa en particular como un potente catalizador enantioselectivo en la síntesis de alcoholes, aminas y ácidos carboxílicos ópticamente activos. Se sabe que la lipasa B de *Candida antarctica* convierte eficazmente ésteres etílicos o ácidos grasos libres en triglicéridos. Esta enzima es una proteína con 317 residuos de aminoácido y un peso molecular de 33.008 daltons. Los aminoácidos se ensamblan en 14 hélices [α] y 9 láminas [β]. La secuencia y la estructura secundaria de la lipasa B de *Candida antarctica* se proporciona en la SEQ ID N°:1.

También se contempla que se puedan inmovilizar y usar en los métodos descritos en la presente memoria derivados de enzimas producidas a partir de microorganismos. Se entiende que la estructura de muchas enzimas, como las

divulgadas en la presente memoria, se conoce y se puede encontrar, por ejemplo, en Genbank, y se incorpora en la presente memoria mediante referencia.

Como todas las lipasas microbianas, CALB pertenece a las hidrolasas α/β , cuyo pliegue comprende láminas β de ocho hebras intercaladas entre dos capas de hélices α anfífilas. El mecanismo de hidrólisis del éster de estas enzimas implica generalmente la unión al sustrato de éster, la formación del primer producto intermedio tetraédrico por ataque nucleófilo a la serina catalítica con el oxianión estabilizado por dos o tres enlaces de H, el llamado hueco del oxianión. El enlace éster se escinde y la enzima acilada se hidroliza en la etapa final. El ataque nucleófilo por la serina catalítica está mediado por el residuo catalítico de histidina y ácido aspártico o glutámico. En ciertos ejemplos, la cadena de ácido graso más larga que se une completamente dentro del bolsillo de unión de CALB es C 13; así, el sitio de ácido graso escindible de esta enzima es relativamente corto (13,5 Å). El sitio de unión de CALB es relativamente corto y tiene una pequeña área hidrófoba situada en la pared del túnel de unión. La estructura de CALB ha sido publicada en el Protein Data Bank (The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. Bernstein y cols., J. Mol. Biol. 112:525-542, 1977). También se entiende que las enzimas divulgadas se pueden definir por sus centros catalíticos conservados que se conocen en la especialidad y se divulgan en la presente memoria.

Similitudes de secuencia

Se entiende que según se analiza en la presente memoria el uso de los términos "homología" e "identidad" significa lo mismo que similitud. Así, por ejemplo, si se usa la palabra homología entre dos secuencias no naturales, se entiende que esto no está indicando necesariamente una relación evolutiva entre estas dos secuencias sino que, en cambio, está considerando la similitud o relación entre sus secuencias. Muchos de los métodos para determinar homología entre dos moléculas evolutivamente relacionadas se aplican habitualmente a cualesquiera dos o más ácidos nucleicos o proteínas con el propósito de medir la similitud de secuencias, independientemente de si están evolutivamente relacionadas o no.

En general, se entiende que un modo de definir cualesquiera variantes y derivados conocidos o los que podrían surgir de los genes y las proteínas divulgados en la presente memoria, tales como SEQ ID N°:1 es a través de definir las variantes y los derivados en cuanto a la homología con secuencias conocidas específicas. Esta identidad de secuencias particulares divulgadas en la presente memoria también se analiza en cualquier parte en la presente memoria. En general, las variantes de genes y proteínas de la presente memoria divulgadas tienen típicamente al menos aproximadamente 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 por ciento de homología con la secuencia indicada o la secuencia natural. Los expertos en la especialidad entienden fácilmente cómo determinar la homología de dos proteínas o ácidos nucleicos, tales como genes. Por ejemplo, la homología se puede calcular después de alinear las dos secuencias de modo que la homología esté en su nivel más alto.

Otro modo de calcular la homología se puede realizar mediante algoritmos publicados. El alineamiento óptimo de las secuencias para la comparación se puede efectuar mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981, mediante al algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970, mediante el método de la búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, 1988, mediante ejecuciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección.

Se pueden obtener los mismos tipos de homología para ácidos nucleicos mediante, por ejemplo, los algoritmos divulgados en Zuker, *Science* 244:48-52, 1989, Jaeger y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:7706-7710, 1989, Jaeger y cols., *Methods Enzymol.* 183:281-306, 1989, que se incorporan en la presente memoria mediante referencia al menos para material relacionado con el alineamiento de ácidos nucleicos. Se entiende que típicamente se puede usar cualquiera de los métodos y que en ciertos casos los resultados de estos diversos métodos pueden diferir, pero el experto sabe que si se encuentra identidad con al menos uno de estos métodos, se diría que las secuencias tienen la identidad indicada y se divulgarían en la presente memoria.

Por ejemplo, según se usa en la presente memoria, una secuencia que se cita que tiene un porcentaje de homología particular con otra secuencia se refiere a secuencias que tienen la homología citada según se calcula por uno cualquiera o más de los métodos de cálculo descritos anteriormente. Por ejemplo, una primera secuencia tiene 80 por ciento de homología, según se define en la presente memoria, con una segunda secuencia si se calcula que la primera secuencia tiene 80 por ciento de homología con la segunda secuencia usando el método de cálculo de Zuker aunque la primera secuencia no tenga 80 por ciento de homología con la segunda secuencia según se calcula mediante cualquiera de los otros métodos de cálculo. Como otro ejemplo, una primera secuencia tiene 80 por ciento de homología, según se define en la presente memoria, con una segunda secuencia si se calcula que la primera secuencia tiene 80 por ciento de homología con la segunda secuencia usando tanto el método de cálculo de Zuker como el método de cálculo de Pearson y Lipman aunque la primera secuencia no tenga 80 por ciento de homología con la segunda secuencia según se calcula mediante el método de cálculo de Zuker o cualquiera de los otros métodos de cálculo.

Como otro ejemplo más, una primera secuencia tiene 80 por ciento de homología, según se define en la presente memoria, con una segunda secuencia si se calcula que la primera secuencia tiene 80 por ciento de homología con la segunda secuencia usando cada uno de los métodos de cálculo (aunque, en la práctica, los diferentes métodos de cálculo a menudo darán como resultado diferentes porcentajes de homología calculados).

5 Hibridación/hibridación selectiva

También se entiende que las enzimas divulgadas en la presente memoria, tales como SEQ ID N°:1, se pueden clasificar por la capacidad de los ácidos nucleicos que las codifican para hibridarse a otros ácidos nucleicos. El término "hibridación" significa típicamente una interacción conducida por secuencia entre al menos dos moléculas de ácido nucleico, tales como un cebador o una sonda y un gen. La expresión "interacción conducida por secuencia" significa una interacción que se produce entre dos nucleótidos o análogos de nucleótido o derivados de nucleótido de un modo específico para los nucleótidos. Por ejemplo, G que interactúa con C o A que interactúa con T son interacciones conducidas por secuencia. Típicamente, las interacciones conducidas por secuencia se producen sobre la cara de Watson-Crick o la cara de Hoogsteen del nucleótido. La hibridación de dos ácidos nucleicos está afectada por un número de condiciones y parámetros conocidos por los expertos en la especialidad. Por ejemplo, las concentraciones de sales, el pH y la temperatura de la reacción afectan todos a si dos moléculas de ácido nucleico se hibridan.

Los parámetros para la hibridación selectiva entre dos moléculas de ácido nucleico son muy conocidos para los expertos en la especialidad. Por ejemplo, en algunos ejemplos, las condiciones de hibridación selectiva se pueden definir como condiciones de hibridación restrictivas. Por ejemplo, la restricción de la hibridación se controla tanto mediante la temperatura como mediante la concentración de sal de cualquiera o ambas de las etapas de hibridación y lavado. Por ejemplo, las condiciones de hibridación para alcanzar la hibridación selectiva pueden implicar hibridación en solución de alta intensidad iónica (6X SSC o 6X SSPE) a una temperatura que está de aproximadamente 12 a aproximadamente 25°C por debajo de la T_m (la temperatura de fusión a la que la mitad de las moléculas se disocian de sus socios de hibridación), seguido por lavado con una combinación de temperatura y concentración de sal elegida de modo que la temperatura de lavado esté de aproximadamente 5°C a aproximadamente 20°C por debajo de la T_m . La temperatura y las condiciones salinas se determinan de forma fácil empíricamente en pruebas preliminares en las que muestras de DNA de referencia inmovilizadas sobre filtros se hibridan a un ácido nucleico marcado de interés y a continuación se lavan bajo condiciones de diferentes restricciones. Las temperaturas de hibridación típicamente son superiores para hibridaciones de DNA-RNA y RNA-RNA. Las condiciones se pueden usar como se describe anteriormente para alcanzar restricción, o como se sabe en la técnica. (Sambrook y cols., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989; Kunkel y cols. *Methods Enzymol.* 1987:154:367, 1987, que se incorpora en la presente memoria mediante referencia al menos para material relacionado con la hibridación de ácidos nucleicos). Una condición de hibridación restrictiva preferible para una hibridación de DNA:DNA puede ser a aproximadamente 68°C (en solución acuosa) en 6X SSC o 6X SSPE seguido por lavado a 68°C. La restricción de la hibridación y el lavado, si se desea, se pueden reducir según esto a medida que el grado de complementariedad se disminuye, y además, dependiendo de la riqueza en G-C o A-T de cualquier área en la que se busque variabilidad. Asimismo, la restricción de la hibridación y el lavado, si se desea, se puede incrementar según esto a medida que se incrementa la homología deseada, y además, dependiendo de la riqueza en G-C o A-T de cualquier área en la que se desee una alta homología, todo según se sabe en la especialidad.

Otro modo de definir una hibridación selectiva es considerar la cantidad (porcentaje) de uno de los ácidos nucleicos unidos al otro ácido nucleico. Por ejemplo, en algunos ejemplos, las condiciones de hibridación selectiva serían cuando al menos aproximadamente 60, 65, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 por ciento del ácido nucleico limitativo esté unido al ácido nucleico no limitativo. Típicamente, el cebador no limitativo está, por ejemplo, en un exceso de 10 o 100 o 1.000 veces. Este tipo de ensayo se puede realizar bajo condiciones en las que tanto el cebador limitativo como el no limitativo están, por ejemplo, 10 veces o 100 veces o 1.000 veces por debajo de su k_d , o cuando solo una de las moléculas de ácido nucleico está 10 veces o 100 veces o 1.000 veces, o cuando una o ambas moléculas de ácido nucleico están por encima de su k_d .

Otro modo de definir una hibridación selectiva es considerar el porcentaje de cebador que queda enzimáticamente manipulado bajo condiciones en las que se requiere hibridación para promover la manipulación enzimática deseada. Por ejemplo, en algunos ejemplos, las condiciones de hibridación selectiva serían cuando al menos aproximadamente 60, 65, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 por ciento del cebador esté enzimáticamente manipulado bajo condiciones que promuevan la manipulación enzimática; por ejemplo, si la manipulación enzimática es extensión de DNA, entonces las condiciones de hibridación selectiva serían cuando se extiende al menos aproximadamente 60, 65, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 por ciento de las moléculas de cebador. Condiciones preferidas también incluyen las sugeridas por el fabricante o indicadas en la técnica como apropiadas para que la enzima realice la manipulación.

Igual que con la homología, se entiende que hay una variedad de métodos en la presente memoria divulgados para determinar el nivel de hibridación entre dos moléculas de ácido nucleico. Se entiende que estos métodos y condiciones pueden proporcionar diferentes porcentajes de hibridación entre dos moléculas de ácido nucleico, pero a menos que se indique otra cosa, sería suficiente cumplir los parámetros de cualquiera de los métodos. Por ejemplo, se considera divulgado en la presente memoria que se requiere 80% hibridación y con tal de que la hibridación se produzca dentro de los parámetros requeridos en uno cualquiera de estos métodos.

Se entiende que los expertos en la especialidad saben que si una composición o un método cumple uno cualquiera de estos criterios para determinar la hibridación bien colectivamente o bien individualmente, es una composición o un método que se divulga en la presente memoria.

Péptidos

Según se analiza en la presente memoria, hay numerosas variantes y se conocen y se contemplan en la presente memoria derivados de cepas de las enzimas divulgadas, tales como SEQ ID N°:1. Las enzimas se pueden elaborar a partir de proteínas o péptidos. Variantes y derivados de proteínas son muy conocidos por lo expertos en la especialidad y pueden implicar modificaciones de la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, las modificaciones de secuencias de aminoácidos están típicamente dentro de una o más de tres clases: variantes de sustitución, inserción o eliminación. Las inserciones incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales así como inserciones intrasecuenciales de residuos de aminoácidos individuales o múltiples. Normalmente, las inserciones serán inserciones más pequeñas que las de las fusiones amino- o carboxilo-terminales, por ejemplo, del orden de uno a cuatro residuos. Derivados de proteínas de fusión inmunogénicos, tales como los descritos en los ejemplos, se elaboran fusionando un polipéptido suficientemente grande para conferir inmunogenicidad a la secuencia diana mediante reticulación in vitro o mediante cultivo de células recombinantes transformado con DNA que codifica la fusión. Las eliminaciones se caracterizan por la retirada de uno o más residuos de aminoácido de la secuencia de proteína. Típicamente, no más de aproximadamente 2 a 6 residuos se eliminan en un sitio cualquiera dentro de la molécula de la proteína. Estas variantes se preparan normalmente mediante mutagénesis dirigida de nucleótidos en el DNA que codifica la proteína, produciendo de ese modo DNA que codifica la variante, y posteriormente expresando el DNA en un cultivo de células recombinantes. Se conocen bien técnicas para elaborar mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en DNA que tiene una secuencia conocida, por ejemplo mutagénesis con cebador M13 y mutagénesis por PCR. Típicamente, las sustituciones de aminoácidos son de residuos individuales pero se pueden producir en un número de diferentes posiciones a la vez; las inserciones serán habitualmente del orden de aproximadamente 1 a 10 residuos de aminoácido; y las eliminaciones variarán de aproximadamente 1 a 30 residuos. Las eliminaciones o inserciones se realizan preferiblemente en pares adyacentes, es decir, una eliminación de 2 residuos o una inserción de 2 residuos. Las sustituciones, eliminaciones, inserciones o cualquier combinación de las mismas se pueden combinar para llegar a la construcción final. Las mutaciones no deben situar la secuencia fuera del marco de lectura y preferiblemente no crearán regiones complementarias que puedan producir una estructura de mRNA secundaria. Las variantes de sustitución son aquellas en las que al menos un residuo se ha retirado y se ha insertado en su lugar un residuo diferente. Generalmente, tales sustituciones se realizan según las siguientes Tablas A y B y se denominan sustituciones conservativas.

Tabla A: Abreviaturas de Aminoácidos

Aminoácido	Abreviaturas
alanina	Ala (A)
aloesoleucina	Alle
arginina	Arg (R)
asparagina	Asn (N)
ácido aspártico	Asp (D)
cisteína	Cys (C)
ácido glutámico	Glu (E)
glutamina	Gln (Q)

Aminoácido	Abreviaturas
glicina	Gly (G)
histidina	His (H)
isoleucina	Ile (I)
leucina	Leu (L)
lisina	Lys (K)
fenilalanina	Phe (F)
prolina	Pro (P)
ácido piroglutámico	Glu
serina	Ser (S)
treonina	Thr (T)
tirosina	Tyr (Y)
triptófano	Trp (W)
valina	Val (V)

Tabla B: Sustituciones de Aminoácidos

Sustituciones Conservativas Ejemplares de Residuos Originales, se conocen otras en la técnica.
Ala ↔ ser
Arg ↔ lys o gln
Asn ↔ gln o his
Asp ↔ glu
Cys ↔ ser
Gln ↔ asn o lys
Glu ↔ asp
Gly ↔ pro
His ↔ asn o gln
Ile ↔ leu o val
Leu ↔ ile o val

Sustituciones Conservativas Ejemplares de Residuos Originales, se conocen otras en la técnica.
Lys ↔ arg o gln;
Met ↔ Leu o ile
Phemet ↔ leu o tyr
Ser ↔ thr
Thr ↔ ser
Trp ↔ tyr
Tyr ↔ trp o phe
Val ↔ ile o leu

Se realizan cambios sustanciales en la función o la identidad inmunológica al seleccionar sustituciones que son menos conservativas que las de la Tabla B, es decir, seleccionar residuos que difieren más significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de: (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo como una conformación laminar o helicoidal; (b) la carga o la hidrofobia de la molécula en el sitio diana; o (c) el volumen de la cadena lateral. Las sustituciones que se espera generalmente que produzcan los mayores cambios en las propiedades de la proteína serán aquellas en las que (a) un residuo hidrófilo, p. ej., serilo o treonilo, sustituye a (o es sustituido por) un residuo hidrófobo, p. ej., leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) una cisteína o prolina sustituye a (o es sustituida por) cualquier otro residuo; (c) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva, p. ej., lisilo, arginilo o histidilo sustituye a (o es sustituido por) un residuo electronegativo, p. ej., glutamilo o aspartilo; o (d) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa, p. ej., fenilalanina, sustituye a (o es sustituido por) uno que no tiene una cadena lateral, p. ej., glicina, en este caso, (e) al incrementar el número de sitios para sulfatación y/o glicosilación.

Por ejemplo, la sustitución de un residuo de aminoácido por otro que sea biológicamente y/o químicamente similar es conocida por los expertos en la especialidad como una sustitución conservativa. Por ejemplo, una sustitución conservativa sería reemplazar un residuo hidrófobo por otro o un residuo polar por otro. Las sustituciones incluyen combinaciones tales como, por ejemplo, Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe, Tyr. Tales variaciones sustituidas conservativamente de cada secuencia divulgada explícitamente se incluyen dentro de los polipéptidos mosaico proporcionados en la presente memoria.

Se puede emplear mutagénesis de sustitución o eliminación para insertar sitios para la *N*-glicosilación (Asn-X-Thr/Ser) o la *O*-glicosilación (Ser o Thr). También pueden ser deseables eliminaciones de cisteína u otros residuos lábiles. Las eliminaciones o sustituciones de sitios de proteólisis potenciales, p. ej., Arg, se efectúan, por ejemplo, al eliminar uno de los residuos básicos o sustituir uno por residuos glutaminilo o histidilo.

Ciertas derivaciones postraduccionales son el resultado de la acción de células huésped recombinantes sobre el polipéptido expresado. Frecuentemente, residuos glutaminilo y asparaginilo se desamidán postraduccionalmente hasta los residuos glutamilo y asparilo correspondientes. Alternativamente, estos residuos se desamidán bajo condiciones suavemente ácidas. Otras modificaciones postraduccionales incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo, la metilación de los grupos amino ω de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco pp 79-86 [1983]), la acetilación de la amina *N*-terminal y, en algunos casos, la amidación del carboxilo C-terminal.

Se entiende que un modo de definir las variantes y los derivados de las proteínas divulgadas en la presente memoria es a través de la definición de las variantes y los derivados en cuanto a la homología/identidad con secuencias conocidas específicas. Por ejemplo, SEQ ID N°:1 indica una secuencia particular de una lipasa. Se divulgan específicamente variantes de estas y otras proteínas en la presente memoria divulgadas que tienen al menos aproximadamente 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 de homología con la secuencia indicada. Los expertos en la especialidad saben fácilmente cómo determinar la homología de dos proteínas. Por ejemplo, la homología se puede calcular después de alinear las dos secuencias de modo que la homología esté en su nivel más alto.

Otro modo de calcular la homología puede ser mediante algoritmos publicados. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación se puede efectuar mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981, mediante el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, 1988, mediante ejecuciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección.

Se pueden obtener los mismos tipos de homología para ácidos nucleicos mediante, por ejemplo, los algoritmos divulgados en Zuker, *Science* 244:48-52, 1989, Jaeger y cols., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:7706-7710, 1989, Jaeger y cols., *Methods Enzymol.* 183:281-306, 1989, que se incorporan en la presente memoria mediante referencia al menos para su material relacionado con el alineamiento de ácidos nucleicos.

Se entiende que la descripción de las mutaciones conservativas y la homología se puede combinar entre sí en cualquier combinación, tal como realizaciones que tienen al menos 70% de homología con una secuencia particular en la que las variantes son mutaciones conservativas.

Como esta memoria descriptiva analiza diversas proteínas y secuencias de proteína, se entiende que también se divulgan los ácidos nucleicos que pueden codificar esas secuencias de proteína. Esto incluirá todas las secuencias degeneradas relacionadas con un secuencia de proteína específica, es decir, todos los ácidos nucleicos que tienen una secuencia que codifica una secuencia de proteína particular así como todos los ácidos nucleicos, incluyendo ácidos nucleicos degenerados, que codifican las variantes y los derivados divulgados de las secuencias de proteína. Así, aunque todas las secuencias de ácido nucleico particulares no se pueden escribir en la presente memoria, se entiende que todas y cada una de las secuencias se divulgan y describen de hecho en la presente memoria a través de la secuencia de proteína divulgada. También se entiende que aunque ninguna secuencia de aminoácidos indique qué secuencia de DNA particular codifica esa proteína dentro de un organismo, cuando se divulgan en la presente memoria variantes particulares de una proteína divulgada, también se conoce la secuencia de ácido nucleico conocida que codifica esa proteína en la cepa particular de la que surge esa proteína y se divulga y se describe en la presente memoria.

Se entiende que hay numerosos análogos de aminoácidos y péptidos que se pueden incorporar en las composiciones divulgadas. Por ejemplo, hay numerosos D-aminoácidos o aminoácidos que tienen un sustituyente funcional diferente que los aminoácidos mostrados en la Tabla A y la Tabla B. Se divulgan los estereoisómeros opuestos de péptidos naturales, así como los estereoisómeros y análogos peptídicos. Estos aminoácidos se pueden incorporar fácilmente en cadenas polipeptídicas al cargar moléculas de tRNA con el aminoácido de elección y construcciones de manipulación genética que utilizan, por ejemplo, codones ámbar para insertar el aminoácido análogo en una cadena peptídica de un modo específico para el sitio (Thorson y cols., *Meth. Mol. Biol.* 77:43-73, 1991; Zoller, *Curr. Opin. Biotechnol.* 3:348-354, 1992; Ibba, *Biotechnol. Gen. Eng. Rev.* 13:197-216, 1995; Cahill y cols., *TIBS* 14(10):400-403, 1989; Benner, *TIB Tech* 12:158-163, 1994; Ibba y Hennecke, *Bio/technology* 12:678-682, 1994, todas las cuales se incorporan en la presente memoria mediante referencia al menos para su material relacionado con análogos de aminoácidos).

Se pueden producir codones que se asemejan a péptidos, pero que no están conectados a través de un enlace peptídico natural. Por ejemplo, enlaces para aminoácidos o análogos de aminoácido pueden incluir, pero no se limitan a, $\text{CH}_2\text{NH-}$, $\text{-CH}_2\text{S-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, -CH=CH- (*cis* y *trans*), $\text{-COCH}_2\text{-}$, $\text{-CH(OH)CH}_2\text{-}$ y $\text{-CHH}_2\text{SO-}$ (Estos y otros se pueden encontrar en Spatola, en *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides y Proteins*, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, p. 267, 1983; Spatola, *Vega Data* (marzo 1983), Vol. 1, Edición 3, *Peptide Backbone Modifications* (revisión general); Morley, *Trends Pharm. Sci.* 463-468, 1980; Hudson y cols., *Int. J. Pept. Prot. Res.* 14:177-185, 1979 ($\text{-CH}_2\text{NH-}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-}$); Spatola y cols., *Life Sci.* 38:1243-1249, 1986 ($\text{-CH}_2\text{-S-}$); Hann, *J. Chem. Soc Perkin Trans. I* 307-314, 1982 (-CH=CH- , *cis* y *trans*); Almquist y cols., *J. Med. Chem.* 23:1392-1398, 1980 ($\text{-COCH}_2\text{-}$); Jennings-White y cols., *Tetrahedron Lett.* 23:2533, 1982 ($\text{-COCH}_2\text{-}$); Szelke y cols., *Solicitud Europea* N° EP 45665 CA (1982): 97:39405 (1982) ($\text{-CH(OH)CH}_2\text{-}$); Holladay y cols., *Tetrahedron. Lett.* 24:4401-4404, 1983 ($\text{-C(OH)CH}_2\text{-}$); y Hruby, *Life Sci.* 31:189-199, 1982 ($\text{-CH}_2\text{-S-}$); cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria mediante referencia. Un enlace no peptídico particularmente preferido es $\text{-CH}_2\text{NH-}$. Se entiende que los análogos peptídicos pueden tener más de un átomo entre los átomos del enlace, tales como β -alanina, ácido γ -aminobutírico y similares.

Los análogos de aminoácido y los análogos peptídicos a menudo tienen propiedades mejoradas o deseables, tales como más producción económica, mayor estabilidad química, propiedades farmacológicas (semivida, absorción, potencia, eficacia, etc.) mejoradas, especificidad alterada (p. ej., un amplio espectro de actividades biológicas), antigenicidad reducida, y otras. Se pueden usar D-aminoácidos para generar péptidos más estables, debido a que los D-aminoácidos no son reconocidos por peptidasas y similares. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de consenso por un D-aminoácido del mismo tipo (p. ej., D-lisina en lugar de L-lisina) se puede usar para generar péptidos más estables. Se pueden usar residuos de cisteína para ciclar o ligar dos o más péptidos entre sí. Esto puede ser beneficioso para constreñir péptidos en conformaciones particulares. (Rizo y Gierasch, *Ann. Rev. Biochem.* 61:387, 1992,).

Matriz de calidad alimentaria

El término "matriz de calidad alimentaria" es cualquier material que pueda formar una matriz para inmovilizar una enzima y que se acredite por the U.S. Food and Drug Administration como un Secondary Direct Food Additive bajo 21 C.F.R. § 173. Las Secciones 5-165 de 21 C.F.R. § 173 proporcionan ejemplos representativos de materiales útiles como la matriz de calidad alimentaria así como las cantidades permisibles de impurezas a considerar en una matriz de calidad alimentaria útil en la presente memoria. Por ejemplo, el material usado para producir la matriz de calidad alimentaria comprende menos de 10%, menos de 8%, menos de 6%, menos de 4% o menos de 2% en peso de impurezas no polimerizables.

La matriz de calidad alimentaria es un copolímero de (1) divinilbenceno y (2) etilvinilbenceno o estireno. El Título 21 C.F.R. § 173.65 proporciona los requisitos para el uso de copolímeros de divinilbenceno como un aditivo alimentario directo secundario. Por ejemplo, el copolímero de divinilbenceno debe tener al menos 79 por ciento en peso de divinilbenceno y no más de 4 por ciento en peso de impurezas no polimerizables. Ejemplos de copolímeros de divinilbenceno útiles en la presente memoria como matrices de calidad alimentaria incluyen, pero no se limitan a, AMBERLITE™ XAD 16HP, AMBERLITE™ FPX600, AMBERLITE™ FPX66 y DUOLITE™ A7, todos los cuales son fabricados por Rohm and Haas (Filadelfia, PA). AMBERLITE™ XAD1 6HP y FPX600 son copolímeros de poliestireno/divinilbenceno macroporosos reticulados.

En un ejemplo específico, la enzima es lipasa B de *Candida antarctica* y la matriz de calidad alimentaria es AMBERLITE™ XAD 16HP.

Producción de enzimas inmovilizadas

La producción de la enzima inmovilizada implica generalmente mezclar la enzima con el material usado para producir la matriz de calidad alimentaria en un disolvente tal como, por ejemplo, agua. No se usa un tensioactivo en la preparación de la enzima inmovilizada. Parámetros de inmovilización tales como el pH, la temperatura, la duración de la inmovilización, etc. variarán dependiendo de la selección de la enzima y el material de la matriz de calidad alimentaria. Después de que la inmovilización sea completa, la solución se drena y la enzima-matriz resultante se puede lavar con agua u otros disolventes adecuados. La selección de disolventes para la preparación de la enzima inmovilizada debe ser un material que sea compatible con el consumo humano. Así, el agua es un disolvente preferido. Después de que la enzima se haya inmovilizado, la enzima-matriz se puede secar bajo presión reducida y/o a temperatura elevada, o usando otro medio gaseoso o líquido (N₂, Ar, aceite, etc.).

La enzima se puede inmovilizar sobre la matriz a través de uniones o enlaces covalentes o no covalentes (p. ej., electrostáticos, iónicos, enlace de hidrógeno, adsorción, atrapamiento, encapsulación, etc.) dependiendo de la selección de la enzima y la matriz de calidad alimentaria, así como las condiciones de inmovilización. Sin querer limitarse por una teoría, se cree que la inmovilización de la enzima sobre la matriz hace a la enzima significativamente más estable debido a la fijación de la conformación de la enzima. Si es posible, la enzima no se debe filtrar de la matriz, lo que incrementará la eficacia del procedimiento de esterificación así como prolongará la vida de la enzima inmovilizada para uso futuro. También es deseable que las enzimas ligadas a la superficie de la matriz sean tales que las enzimas expongan su centro catalítico.

La cantidad de enzima inmovilizada sobre la matriz puede variar dependiendo de la enzima y la matriz seleccionadas y el uso final de la enzima inmovilizada. En un aspecto, la cantidad de enzima inmovilizada en la matriz es de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 35 KUL (kilounidades de lipasa) por gramo de matriz basado en la diferencia de concentración de enzima en la solución usada para interactuar con la matriz, según se mide a 280 nm. En otros ejemplos, la cantidad de enzima inmovilizada sobre la matriz puede ser aproximadamente 7,5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 KUL/g de matriz, donde cualquier valor puede formar un punto final de un intervalo. En otro ejemplo, la cantidad de enzima inmovilizada en la matriz es de aproximadamente 28 a aproximadamente 32 KUL/g de matriz.

La matriz inmovilizada se puede preparar mediante métodos divulgados en la presente memoria. En ciertos ejemplos, la matriz inmovilizada divulgada se puede preparar a escala de laboratorio, piloto o de fabricación. Por ejemplo, se puede usar el sistema mostrado en las Figuras 1 y 3 para la preparación de enzimas inmovilizadas a escala piloto y de fabricación. Además, se puede usar más de un lecho enzimático. Esto es, se pueden usar procedimientos en los que más de un reactor de lecho fijo enzimático que contiene las enzimas inmovilizadas divulgadas están conectados en serie o paralelo. El número de reactores dependerá de las cantidades de producción y las materias primas deseadas. También se pueden usar diversas geometrías de reactores enzimáticos. Ejemplos de geometrías de reactores adecuadas se muestran en la Figura 4.

Uso de enzimas inmovilizadas

Se describen en la presente memoria métodos para esterificar un ácido graso que comprenden hacer pasar una mezcla de reacción que comprende un ácido graso y un alcohol a través de un lecho de enzima inmovilizada. Por "ácido graso" se entiende un ácido carboxílico con al menos 10 átomos de carbono. En un aspecto, el ácido graso

puede comprender al menos 10, al menos 12, al menos 14, al menos 16, al menos 18 o al menos 20 átomos de carbono, en algunos ejemplos específicos, el ácido graso puede contener 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o 45 átomos de carbono, donde cualquiera de los valores indicados puede formar un punto final superior o inferior cuando sea apropiado. En otros ejemplos, el ácido graso puede comprender una mezcla de ácidos grasos que tienen un intervalo de átomos de carbono. Por ejemplo, el ácido graso puede comprender de aproximadamente 10 a aproximadamente 40, de aproximadamente 12 a aproximadamente 38, de aproximadamente 14 a aproximadamente 36, de aproximadamente 16 a aproximadamente 34, de aproximadamente 18 a aproximadamente 32 o de aproximadamente 20 a 30 átomos de carbono. Los ácidos grasos pueden ser saturados, insaturados o una mezcla de ácidos grasos saturados e insaturados. Por "saturado" se entiende que la molécula o residuo no contiene dobles o triples enlaces carbono-carbono. Por "insaturado" se entiende que la molécula o el residuo contiene al menos un doble o triple enlace carbono-carbono.

En un ejemplo específico, los ácidos grasos o los ésteres de los mismos se pueden derivar de aceites marinos, tales como aceite de pescado, antes de la esterificación. Típicamente, tales aceites contienen mezclas de ácidos grasos saturados e insaturados, pero se pueden procesar para dar como resultado una mezcla de ácidos grasos particular (p. ej., que contiene todos saturados, todos insaturados, mezclas de ambos, o mezclas con ácidos grasos de una cierta longitud de cadena o intervalo de longitudes de cadena). Se puede usar cualquier aceite de pescado en los compuestos y los métodos divulgados. Ejemplos de aceites de pescado adecuados incluyen, pero no se limitan a, aceite de pescado del Atlántico, aceite de pescado del Pacífico, aceite de pescado del Mediterráneo, aceite de pescado prensado ligero, aceite de pescado tratado con álcali, aceite de pescado termotratado, aceite de pescado marrón ligero y pesado, aceite de bonito, aceite de sardina europea, aceite de atún, aceite de lubina, aceite de rodaballo, aceite de marlín, aceite de barracuda, aceite de bacalao, aceite de sábalo, aceite de sardina, aceite de boquerón, aceite de capelán, aceite de bacalao del Atlántico, aceite de arenque del Atlántico, aceite de caballa del Atlántico, aceite de sábalo del Atlántico, aceite de salmónidos y aceite de tiburón, incluyendo mezclas y combinaciones de los mismos. También es adecuado el aceite de pescado no tratado con álcali. Otros aceites marinos adecuados para el uso en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, aceite de calamar, aceite de sepia, aceite de pulpo, aceite de krill, aceite de foca, aceite de ballena y similares, incluyendo mezclas y combinaciones de los mismos. Cualquier aceite marino y combinación de aceite marino se puede usar en las composiciones divulgadas y en los métodos divulgados para prepararlas. Aceites adicionales incluyen ciertos ejemplos, el éster del ácido graso es un éster alquílico de cadena ramificada o lineal C₁-C₆ tal como, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo y similares.

En otros ejemplos específicos, un ácido graso o el éster del mismo se puede usar en los métodos descritos en la presente memoria. Por "ácido graso" se entiende un ácido carboxílico con al menos 10 átomos de carbono. En un aspecto, el ácido graso o el éster del mismo puede comprender al menos 10, al menos 12, al menos 14, al menos 16, al menos 18 o al menos 20 átomos de carbono. En algunos ejemplos específicos, el ácido graso o el éster del mismo puede contener 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o 45 átomos de carbono, donde cualquiera de los valores indicados puede formar un punto final superior o inferior cuando sea apropiado. En otros ejemplos, el ácido graso o el éster del mismo puede comprender una mezcla de ácidos grasos o los ésteres de los mismos que tienen un intervalo de átomos de carbono. Por ejemplo, el ácido graso o el éster del mismo puede comprender de aproximadamente 10 a aproximadamente 40, de aproximadamente 12 a aproximadamente 38, de aproximadamente 14 a aproximadamente 36, de aproximadamente 16 a aproximadamente 34, de aproximadamente 18 a aproximadamente 32 o de aproximadamente 20 a 30 átomos de carbono.

Los ácidos grasos o los ésteres de los mismos pueden ser saturados, insaturados o una mezcla de ácidos grasos saturados e insaturados. Por "saturado" se entiende que la molécula o residuo no contiene dobles o triples enlaces carbono-carbono. Por "insaturado" se entiende que la molécula o el residuo contiene al menos un doble o triple enlace carbono-carbono.

En un ejemplo específico, los ácidos grasos o los ésteres de los mismos se pueden derivar de aceites marinos, tales como aceite de pescado, antes de la esterificación. Típicamente, tales aceites contienen mezclas de ácidos grasos saturados e insaturados, pero se pueden procesar para dar como resultado una mezcla de ácidos grasos particular (p. ej., que contiene todos saturados, todos insaturados, mezclas de ambos, o mezclas con ácidos grasos de una cierta longitud de cadena o intervalo de longitudes de cadena). Se puede usar cualquier aceite de pescado en los compuestos y los métodos divulgados. Ejemplos de aceites de pescado adecuados incluyen, pero no se limitan a, aceite de pescado del Atlántico, aceite de pescado del Pacífico, aceite de pescado del Mediterráneo, aceite de pescado prensado ligero, aceite de pescado tratado con álcali, aceite de pescado termotratado, aceite de pescado marrón ligero y pesado, aceite de bonito, aceite de sardina europea, aceite de atún, aceite de lubina, aceite de rodaballo, aceite de marlín, aceite de barracuda, aceite de bacalao, aceite de sábalo, aceite de sardina, aceite de boquerón, aceite de capelán, aceite de bacalao del Atlántico, aceite de arenque del Atlántico, aceite de caballa del Atlántico, aceite de sábalo del Atlántico, aceite de salmónidos y aceite de tiburón, incluyendo mezclas y combinaciones de los mismos. También es adecuado el aceite de pescado no tratado con álcali. Otros aceites marinos adecuados para el uso en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, aceite de calamar, aceite de sepia, aceite de pulpo, aceite de krill, aceite de foca, aceite de ballena y similares, incluyendo mezclas y

combinaciones de los mismos. Cualquier aceite marino y combinación de aceite marino se puede usar en las composiciones divulgadas y en los métodos divulgados para prepararlas. Aceites adicionales incluyen aceite microbiano, aceite de algas (p. ej., aceite de un dinoflagelado tal como *Cryptothecodinium cohnii*), aceite fúngico (p. ej., aceite de *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* o una mezcla de los mismos), y/o un aceite de planta, incluyendo mezclas y combinaciones de los mismos.

Ejemplos de ácidos grasos saturados específicos o ésteres de los mismos útiles en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, ácido cáprico (C10), ácido láurico (C12), ácido mirístico (C14), ácido palmítico (C16), ácido margárico (C17), ácido esteárico (C18), ácido araquídico (C20), ácido behénico (C22), ácido lignocérico (C24), ácido cerótico (C26), ácido montánico (C28) y ácido melísico (C30), incluyendo derivados ramificados y sustituidos de los mismos.

Los ácidos insaturados o ésteres de los mismos adecuados para los métodos divulgados en la presente memoria pueden comprender al menos un enlace insaturado (es decir, un doble o triple enlace carbono-carbono). En un ejemplo, el ácido graso insaturado o el éster del mismo puede comprender al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 dobles enlaces, triples enlaces carbono-carbono o cualquier combinación de los mismos. En otro ejemplo, el ácido graso insaturado o éster del mismo puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 enlaces insaturados, donde cualquiera de los valores indicados puede formar un punto final superior o inferior cuando sea apropiado.

En un ejemplo, los ácidos grasos insaturados o ésteres de los mismos pueden comprender un doble enlace carbono-carbono (es decir, un ácido o residuo monoénico). Ejemplos de ácidos grasos insaturados o ésteres de los mismos que son adecuados para los métodos divulgados en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, los de la siguiente Tabla 1.

Tabla 1: Ejemplos Ácidos Monoénicos

Número total de átomos de carbono en la cadena de ácido graso	Número de carbono donde empieza el doble enlace. ("c" indica un doble enlace <i>cis</i> ; "t" indica un doble enlace <i>trans</i>)
10	4c
12	4c
14	4c y 9c
16	3t, 4c, 5t, 6c, 6t, 9c (palmitooleico) y 11c
18	3t, 5c, 5t, 6c (petroselínico), 6t, 9c (oleico), 10c, 11c (cis-vaccénico), 11t (vaccénico) y 13c
20	5c, 9c (gadolénico), 11c, 13c y 15c
22	5c, 11c (cetoleico), 13c (erúcico) y 15c
24	15c (selacoleico, nervónico)
26	9c y 17c (ximénico)
28	9c, 19c (luméquico)
30	21c

En otros ejemplos, los ácidos grasos insaturados o ésteres de los mismos pueden comprender al menos dos enlaces insaturados (p. ej., ácidos o residuos poliénicos). En algunos ejemplos, los ácidos grasos insaturados o ésteres de los mismos pueden comprender al menos un par de enlaces insaturados interrumpidos por metileno. Por "enlace insaturado interrumpido por metileno" se entiende que un doble o triple enlace carbono-carbono está separado de otro doble o triple enlace carbono-carbono por al menos un grupo metileno (es decir, CH₂). Ejemplos específicos de ácidos grasos insaturados o ésteres de los mismos que contienen al menos un par de enlaces

- insaturados interrumpidos por metileno incluyen, pero no se limitan a, la familia n-1 derivada de 9, 12, 15-16:3; la familia n-2 derivada de 9, 12, 15-17:3, 15:3, 17:3, 17:4, 20:4; la familia n-3 derivada de 9, 12, 15-18:3, 15:2, 15:3, 15:4, 16:3, 16:4, 18:3 (α -linolénico), 18:4, 18:5, 20:2, 20:3, 20:4; 20:5 (EPA), 21:5, 22:3, 22:5 (DPA), 22:6 (DHA), 24:3, 24:4, 24:5, 24:6, 26:5, 26:6, 28:7, 30:5; la familia n-4 derivada de 9,12-16:2, 16:2, 16:3, 18:2, 18:3; la familia n-5 derivada de 9, 12-17:2, 15:2, 17:2, 17:3,19:2, 19:4, 20:3, 20:4 21:4, 21:5; la familia n-6 derivada de 9, 12-18:2, 15:2, 16:2, 18:2 (ácido linoleico), 18:3 (ácido γ -linolénico); 20:2, 20:3, 20:4 (ácido araquidónico), 22:2, 22:3, 22:4 (ácido adrenico), 22:5, 24:2, 24:4, 25:2, 26:2, 30:4; la familia n-7 derivada de 9-16:1, 15:2, 16:2, 17:2, 18:2, 19:2; la familia n-8 derivada de 9-17:1, 15:2, 16:2, 17:2, 18:2, 19:2; la familia n-9 derivada de 9-18:1, 17:2, 18:2, 20:2, 20:3, 22:3, 22:4; la familia n-11 19:2 y la familia n-12 20:2.
- 10 En el párrafo anterior, los compuestos se identifican haciendo referencia en primer lugar a la "familia n-x", donde x es la posición en el ácido graso en la que empieza el primer doble enlace. El esquema de numeración empieza en el extremo terminal del ácido graso donde, por ejemplo, el grupo CH₃ terminal se denomina posición 1. En este sentido, la familia n-3 sería un ácido graso ω -3, según se describe en la presente memoria. El siguiente número
- 15 identifica el número total de átomos de carbono en el ácido graso. El tercer número, que está después de los dos puntos, indica el número total de dobles enlaces en el ácido graso. Así, por ejemplo, en la familia n-1, 16:3 se refiere a un ácido graso de 16 carbonos de longitud con 3 dobles enlaces, cada uno separado por un metileno, en donde el primer doble enlace empieza en la posición 1, es decir, el extremo terminal del ácido graso. En otro ejemplo, en la familia n-6, 18:3 se refiere a un ácido graso de 18 carbonos de longitud con 3 dobles enlaces separados por metileno que empiezan en la posición 6, es decir, el sexto carbono desde el extremo terminal del ácido graso, etc.
- 20 Algunos otros ejemplos son ácidos grasos o ésteres de los mismos que contienen al menos un par de enlaces insaturados interrumpidos por más de un grupo metileno. Ejemplos adecuados de estos ácidos y ésteres incluyen, pero no se limitan a, los de la siguiente Tabla 2:

Tabla 2: Ejemplos de Ácidos Poliénicos

Número total de átomos de carbono en la cadena de ácido graso	Número de carbono donde empieza el doble enlace. ("c" indica un doble enlace <i>cis</i> ; "t" indica un doble enlace <i>trans</i>)
18	5, 9 5, 11 2t, 9, 12 3t, 9, 12 5t, 9, 12 5, 9, 12 5, 11, 14 3t, 9, 12, 15 5, 9, 12, 15
20	5, 11 5, 13 7, 11 7, 13 5, 11, 14

Número total de átomos de carbono en la cadena de ácido graso	Número de carbono donde empieza el doble enlace. ("c" indica un doble enlace <i>cis</i> ; "t" indica un doble enlace <i>trans</i>)
	7, 11, 14 5, 11, 14, 17
22	5, 11 5, 13 7, 13 7, 15 7, 17 9, 13 9, 15

5 Otros ejemplos adicionales de ácidos grasos insaturados o ésteres de los mismos que son adecuados para el uso en los métodos divulgados en la presente memoria son los que contienen al menos un enlace insaturado conjugado. Por "enlace insaturado conjugado" se entiende que al menos un par de dobles y/o triples enlaces carbono-carbono están unidos entre sí, sin un grupo metileno (CH₂) entre ellos (p. ej., -CH=CH-CH=CH-). Ejemplos específicos de ácidos grasos insaturados o ésteres de los mismos que contienen enlaces insaturados conjugados incluyen, pero no se limitan a, los de la siguiente Tabla 3.

Tabla 3: Ejemplos de Ácidos Poliénicos Conjugados

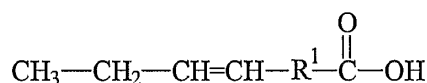
Número total de átomos de carbono en la cadena de ácido graso	Número de carbono donde empieza el doble enlace. ("c" indica un doble enlace <i>cis</i> ; "t" indica un doble enlace <i>trans</i>)
10	2t, 4t, 6c 2c, 4t, 6t 3t, 5t, 7c 3c, 5t, 7t
12	3, 5, 7, 9, 11
14	3, 5, 7, 9, 11
18	10t, 12t 8c, 10t, 12c (jacárico) 8t, 10t, 12c (caléndico)

Número total de átomos de carbono en la cadena de ácido graso	Número de carbono donde empieza el doble enlace. ("c" indica un doble enlace <i>cis</i> ; "t" indica un doble enlace <i>trans</i>)
	8t, 10t, 12t
	9t, 11t, 13c (catálpico)
	9c, 11t, 13t (α-eleoesteárico)
	9c, 11t, 13c (punífico)
	9t, 11t, 13t (β-eleoesteárico)
	9c, 11t, 13t, 15c (α-parinárico)
	9t, 11t, 13t, 15t (β-parinárico)

Los ácidos grasos ω-3 y los ésteres de los mismos también son útiles en los métodos descritos en la presente memoria. Los ácidos grasos ω-3 son ácidos grasos insaturados que son particularmente útiles en los compuestos y los métodos divulgados en la presente memoria. Los ácidos grasos ω-3 no solo exhiben efectos probados sobre la disminución de los niveles de triglicéridos, sino que tienen una fuerte relación con la diabetes. Por ejemplo, el ácido docosahexaenoico (DHA) también tiene un fuerte efecto mejorador de la permeabilidad a insulina y se observa como un mejorador potencial de la absorción para el aporte intestinal de insulina (Onuki y cols., *Int. J. Pharm.* 198:147-56, 2000). La toma de DHA evita ciertos procesos bioquímicos que se originan a partir de la deficiencia de insulina (Ovide-Bordeaux y Grynberg, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286:R519-27, 2003) y tanto el DHA como el EPA (ácido eicosapentaenoico) incrementan significativamente los niveles de insulina en ayunas (Mori y cols., *Am. J. Clin. Nutr.* 71:1085-94, 2000).

Un ácido graso ω-3 es un ácido graso insaturado que contiene como su extremo CH₃-CH₂-CH=CH-. Ejemplos específicos de ácidos grasos ω-3 y ésteres de los mismos que son adecuados para el uso en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, ácido linolénico (18:3ω3), ácido octadecatetraenoico (18:4ω3), ácido eicosapentaenoico (20:5ω3) (EPA), ácido docosahexaenoico (22:6ω3) (DHA), ácido docosapentaenoico (22:6ω3) (DPA), derivados de los mismos y mezclas de los mismos.

En otros ejemplos adicionales, los ácidos grasos insaturados y los ésteres de los mismos se pueden derivar de un compuesto que comprende la siguiente fórmula:



en la que R¹ es un grupo alquilo o alqueno C₃-C₄₀ que comprende al menos un doble enlace. El término "alcano" o "alquilo", según se usa en la presente memoria, es un grupo hidrocarbonado saturado. El término "alqueno" o "alqueno", según se usa en la presente memoria, es un grupo hidrocarbonado de al menos 2 átomos de carbono con una fórmula estructural que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Se pretende que estructuras asimétricas tales como (AB)C=C(CD) incluyan los isómeros tanto *E* como *Z* (*cis* y *trans*). Esto se puede suponer en fórmulas estructurales de la presente memoria en las que está presente un alqueno asimétrico o se puede indicar explícitamente por el símbolo de enlace C=C. En un ejemplo adicional, R¹ puede ser un grupo alqueno C₅-C₃₈, C₆-C₃₆, C₈-C₃₄, C₁₀-C₃₂, C₁₂-C₃₀, C₁₄-C₂₈, C₁₆-C₂₆ o C₁₈-C₂₄. En otro ejemplo más, el grupo alqueno de R¹ puede tener de 2 a 6, de 3 a 6, de 4 a 6 o de 5 a 6 dobles enlaces. Más aún, el grupo alqueno de R¹ puede tener desde 1, 2, 3, 4, 5 o 6 dobles enlaces, donde cualquiera de los valores indicados puede formar un punto final superior o inferior cuando sea apropiado.

Algunos ejemplos específicos de ácidos grasos insaturados y ésteres de los mismos que se pueden usar en los métodos divulgados en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido γ-linolénico, ácido araquidónico, ácido de Mead, ácido estearidónico, ácido α-eleoesteárico, ácido eleoesteárico, ácido pinolénico, ácido docosadiénico, ácido docosatetraenoico, ácido docosapentaenoico, ácido docosahexaenoico, ácido octadecadienoico, ácido octadecatrienoico, ácido eicosatetraenoico, ácido eicosapentaenoico o cualquier combinación de los mismos. En un aspecto, el éster de ácido graso insaturado se puede derivar de ácido linolénico

(18:3 ω 3), ácido octadecatetraenoico (18:4 ω 3), ácido eicosapentaenoico (20:5 ω 3) (EPA), ácido eicosatetraenoico (20:4 ω 3), ácido henicosapentaenoico (21:5 ω 3), ácido docosahexaenoico (22:6 ω 3) (DHA), ácido docosapentaenoico (22:5 ω 3) (DPA), incluyendo derivados y mezclas de los mismos.

5 Ejemplos adicionales de un ácido graso insaturado adecuado y ésteres del mismo que son adecuados en los métodos incluyen, pero no se limitan a, ácidos alénicos y acetilénicos, tales como C14: 2, 4, 5; C18: 5, 6 (labalénico); 5, 6, 16 (lamenalénico); C18: 6a (tarínico); 9a; 9a, 11t (ximenínico); 9a, 11a; 9a, 11a, 13c (boléquico); 9a, 11a, 13a, 15e, 8a, 10t (pirúlico) 9c, 12a (crepenínico); 9c, 12a, 14c (ácido deshidrocrepenínico); 6a, 9c, 12c; 6a, 9c, 12c, 15c, 8a, 11c, 14c y derivados Δ 17e, derivados 8-OH y derivados Δ 17e, 8-OH correspondientes.

10 Ácidos de cadena ramificada y ésteres de los mismos, particularmente isoácidos y anteisoácidos, ácidos ramificados polimetílicos, ácidos basados en fitol (p. ej., fitánico, pristánico), ácidos furanoides también son ácidos grasos adecuados, para el uso en los métodos divulgados en la presente memoria.

15 Más aún, ácidos grasos adecuados y ésteres de los mismos incluyen, pero no se limitan a, ácidos cíclicos, tales como ácidos grasos de ciclopropano, ácidos de ciclopropeno (p. ej., lactobacílico), esterúlico, malvático, esterculínico, 2-hidroxiesterculínico, aleprólico, aleprámico, alepréstico, aleprílico, aléprico, hidnocárpico, chaulmógrico, hormélico, manaico, góricico, oncóbico, ácidos ciclopentenílicos y ácidos ciclohexilalcanoicos.

Hidroxiácidos y ésteres de los mismos, particularmente butólico, ricinoleico, isorricinoleico, densipólico, lesquerólico y aurílico también son ácidos grasos adecuados que con la esterificación se pueden usar en los métodos divulgados en la presente memoria.

20 Epoxi-ácidos y ésteres, particularmente ácidos C18:1 y C18:2 y furanoides epoxidados son ejemplos adicionales que se pueden usar en los métodos divulgados.

25 El alcohol usado en cualquiera de los métodos divulgados en la presente memoria puede ser cualquier alcohol. En un ejemplo, el alcohol es un poliol, que se define como un compuesto que tiene dos o más grupos hidroxilo. Ejemplos de polioles útiles en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, pentaeritritol, dipentaeritritol, tripentaeritritol, tetrapentaeritritol, tris(hidroximetil)etano o tris(hidroximetil)propano. En otros ejemplos, el alcohol es un azúcar tal como, por ejemplo, una glucosamina, un metilglucósido u otro azúcar tal como, por ejemplo, sacarosa. En otro ejemplo, el poliol es glicerol.

30 La cantidad de ácido carboxílico/éster y alcohol usada variará dependiendo del ácido, el éster y el alcohol seleccionados. En un ejemplo, se puede usar una cantidad estequiométrica de ácido carboxílico o éster con relación al número de grupos hidroxilo presentes en el alcohol. Por ejemplo, si el alcohol es un diol, entonces dos equivalentes molares de ácido carboxílico o éster se pueden esterificar o transesterificar, respectivamente, con un equivalente molar de diol. Se puede usar un exceso de alcohol para alcanzar la esterificación o transesterificación máxima así como disminuir el tiempo de reacción global. En un aspecto, cuando el alcohol es glicerol, la relación molar de ácido carboxílico o éster a alcohol es de 1:1 a 10:1, de 1:1 a 9:1, de 1:1 a 8:1, de 1:1 a 7:1, de 1:1 a 6:1, de 1:1 a 5:1, de 1:1 a 4:1 o de 1:1 a 3:1.

35 La cantidad de la enzima inmovilizada (enzima y matriz juntas) también puede variar. En un ejemplo, la enzima inmovilizada es de 0,1% a 20% en peso del peso total de ácido carboxílico/éster y alcohol. En otros ejemplos, la enzima es 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20% en peso de la reacción total, donde cualquier valor puede formar un punto final de un intervalo.

40 El ácido carboxílico/éster, el alcohol y la enzima inmovilizada se pueden mezclar entre sí en cualquier orden. Dependiendo de la selección del ácido carboxílico/éster y el alcohol, puede ser deseable efectuar la esterificación o transesterificación mientras se remueve la mezcla de reacción. Por ejemplo, se puede añadir una solución de éster y alcohol una a otra bajo remoción seguido por la adición de la enzima inmovilizada. Además la mezcla de reacción se podría forzar para pasar a través del lecho de enzima inmovilizada y esto se podría ejecutar en un procedimiento bien continuo o bien discontinuo (individual o reciclado).

45 En ciertos aspectos, las reacciones de esterificación, transesterificación y interesterificación/intraesterificación pueden tener lugar a temperatura elevada. La temperatura elevada precisa puede depender del ácido carboxílico o éster particular que se use, el alcohol particular que se use, la cantidad o concentración de los reaccionantes, la preferencia y similares. Temperaturas adecuadas a las que se pueden producir la esterificación y la transesterificación incluyen, pero no se limitan a, de aproximadamente 50°C a aproximadamente 100°C, de aproximadamente 70°C a aproximadamente 90°C, de aproximadamente 80°C a aproximadamente 90°C o aproximadamente 85°C. En otro ejemplo, la temperatura de esterificación puede ser de aproximadamente 60°C a aproximadamente 70°C o aproximadamente 65°C. Al variar la temperatura, es posible reducir los tiempos de reacción dependiendo de la concentración de las materias primas. Así, los tiempos de reacción pueden variar de 2 horas a 72 horas, de 10 horas a 48, de 10 horas a 36, de 10 horas a 24 horas, de 15 horas a 24 horas, de 20 horas a 24 horas o 22 horas.

En otros ejemplos, el método implica esterificar ácido eicosapentaenoico 20:5 ω 3 (EPA), ácido docosahexaenoico 22:6 ω 3 (DHA), ácido docosapentaenoico 22:5 ω 3 (DPA) o cualquier mezcla de los mismos con glicerol, en donde el

ácido y el alcohol están presentes en una relación molar de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 5:1, en donde la reacción se remueve en presencia de la enzima inmovilizada a una temperatura de aproximadamente 60°C a aproximadamente 90°C durante de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 24 horas, en donde la enzima inmovilizada comprende una enzima derivada de *Candida antarctica* inmovilizada en una matriz de calidad alimentaria que comprende un copolímero de divinilbenceno y estireno.

En otro aspecto, el método implica transesterificar un éster etílico de ácido eicosapentaenoico 20:5 ω 3 (EPA), ácido docosahexaenoico 22:6 ω 3 (DHA), ácido docosapentaenoico 22:5 ω 3 (DPA) o cualquier mezcla de los mismos con glicerol, en donde el éster y el alcohol están presentes en una relación molar de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 5:1, en donde la reacción se remueve en presencia de la enzima inmovilizada a una temperatura de aproximadamente 70°C a aproximadamente 90°C durante de aproximadamente 20 horas a aproximadamente 24 horas, en donde la enzima inmovilizada comprende una enzima derivada de *Candida antarctica* inmovilizada en una matriz de calidad alimentaria que comprende un copolímero de divinilbenceno y estireno.

Según se analiza anteriormente, las enzimas de esterificación y transesterificación pueden ser enzimas costosas. Así, los modos para reutilizar la enzima serían de importancia comercial. Las enzimas inmovilizadas descritas en la presente memoria se pueden reutilizar varias veces. Por ejemplo, después de que la reacción de esterificación, transesterificación o interesterificación sea completa, la solución se puede separar por filtración y la enzima inmovilizada se puede reutilizar. Opcionalmente, la enzima inmovilizada se puede lavar con un disolvente adecuado y agua, lo que puede ser deseable dependiendo de la selección del éster y el alcohol usados. Por ejemplo, si el ácido/éster y/o el alcohol obstruyen la enzima inmovilizada, entonces sería deseable separar por lavado el éster o el alcohol a fin de incrementar la eficacia de la enzima inmovilizada. En un ejemplo, se puede usar agua para lavar la enzima inmovilizada. Con propósitos de almacenamiento, el producto se podría almacenar en presencia de conservantes alimentarios, p. ej., benzoato sódico, sorbato potásico, etc.

Los métodos descritos en la presente memoria son eficaces con respecto a producir ésteres a partir de ácidos carboxílicos u otros ésteres. Por ejemplo, después de que la reacción de esterificación, transesterificación o interesterificación/intraesterificación sea completa, el rendimiento de éster con relación a la materia prima es de aproximadamente 70 a aproximadamente 100%. Además, debido a que se usan matrices de calidad alimentaria, los transésteres resultantes producidos por los métodos de la presente memoria descritos no requieren etapas de purificación adicionales, no producen efectos secundarios no deseados y se pueden incorporar fácilmente en productos alimenticios, productos nutracéuticos y formulaciones farmacéuticas, que son ventajas adicionales de los métodos y las composiciones divulgados. Más aún, usar los métodos enzimáticos divulgados para producir triglicéridos de ácidos grasos, que a menudo están más biodisponibles que los ésteres etílicos correspondientes, puede dar como resultado triglicéridos que tienen mejor color y niveles inferiores de isómeros trans, CD, polímeros y productos secundarios. Los métodos divulgados también pueden dar como resultado productos esterificados, transesterificados, interesterificados y/o intraesterificados que tienen mejores propiedades sensoriales.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se indican posteriormente para ilustrar los métodos y los resultados según la materia divulgada. Estos ejemplos no pretenden ser inclusivos de todos los aspectos de la materia divulgada en la presente memoria, sino que en cambio ilustran métodos y resultados representativos. Estos ejemplos no pretenden excluir equivalentes y variaciones de la presente invención, que son evidentes para un experto en la especialidad.

Se han hecho esfuerzos para asegurar exactitud con respecto a los números (p. ej., cantidades, temperatura, etc.) pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones. A menos que se indique otra cosa, las partes son en peso, la temperatura es en °C o es a temperatura ambiente y la presión es o está cerca de la atmosférica. Hay numerosas variaciones y combinaciones de condiciones de reacción, p. ej., concentraciones de componentes, disolventes deseados, mezclas de disolventes, temperaturas, presiones y otros intervalo y condiciones de reacción que se pueden usar para optimizar la pureza y el rendimiento del producto obtenidos a partir del procedimiento deseado. Solamente se requerirá experimentación razonable y habitual para optimizar tales condiciones de procedimiento.

X03020EE (30% de EPA / 20% de DHA, ésteres etílicos), XO0355EE (3% de EPA / 55% de DHA, ésteres etílicos), EE4020 (40% de EPA / 20% de DHA, ésteres etílicos), FFA4020 (40% EPA / 20% DHA, ácidos grasos libres) se obtuvieron de Ocean Nutrition Canada, Mulgrave Nova Scotia. Los ésteres etílicos de partida X03020EE y XO0355EE se deben almacenar en un recipiente hermético con revestimiento de Teflon bajo nitrógeno. El glicerol tenía una pureza de 99,5%. En los Ejemplos 2-5, se usó NOVOZYME™435 fabricada por NOVOZYMES (Bagsvaerd, Dinamarca). En los siguientes ejemplos, las reacciones con NOVAZYM™435 se consideran comparativas.

Ejemplo 1: Preparación de enzima inmovilizada

La matriz de calidad alimentaria AMBERLITE™ XAD16HP (10 g, aproximadamente 60% de humedad) fabricada por Rohm and Haas se lavó con agua y se suspendió en 15 ml de solución que contenía 0,1% de ácido sórbico y 0,1%

de ácido benzoico, pH 4,8 (preparada mezclando 1 g de ácido benzoico, 1 g de ácido sórbico, hidróxido sódico y agua destilada (998 g)). Se añadió una solución de lipasa B de *Candida antarctica* (30 ml en una relación 4,5:1 p/p con la matriz) y la mezcla se removió suavemente durante 18 h a 20°C. El líquido se drenó, el material sólido se lavó con agua y finalmente se secó a temperatura ambiente bajo vacío a una presión de menos de 1 torr durante 16 horas.

Se prepararon enzimas inmovilizadas adicionales como se acaba de describir, excepto que se usó AMBERLITE™ FPX66 como la matriz de calidad alimentaria.

Ejemplo 2: Análisis de la esterificación/transesterificación

Estas enzimas inmovilizadas producidas en el Ejemplo 1 se probaron para determinar su capacidad para esterificar ácidos grasos y para transesterificar ésteres etílicos en triglicéridos. Las enzimas inmovilizadas se colocaron en un recipiente de reacción a escala de laboratorio y el ácido graso o el éster etílico y el alcohol se añadieron a la enzima inmovilizada. Se analizaron las cantidades de triglicérido (TG) así como di- y monoglicérido (DG y MG, respectivamente) producidas. La clase de lípido se midió mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) acoplada con un detector de dispersión de luz evaporativo (ELSD, por sus siglas en inglés) usando una columna YMC pack PVA-Sil (150 x 4,6 mm, 5 µ) o una columna Waters Spherisorb S3CN (150 x 2 mm). Estos resultados se muestran en las Tablas 4-7.

Tabla 4: Conversión de FFA en TG con enzima inmovilizada sobre AMBERLITE™ XAD16HP a 65-70°C durante 22 h.

Prueba	Componentes después de la reacción (%)			
	FFA	TG	DG	MG
1	4,3	91,0	4,7	0,0
2	4,8	91,7	3,5	0,0
3	3,5	93,1	3,5	0,0
4	3,7	92,9	3,4	0,0

Tabla 5: Conversión de EE en TG con enzima inmovilizada sobre AMBERLITE™ XAD16HP durante 24 horas

Prueba	Temp.	Componentes después de la reacción (%)			
		EE	TG	DG	MG
1	65-70°C	9,9	77,0	12,5	0,6
2	75-80°C	10,0	78,0	11,5	0,5
3	75-80°C	8,1	83,8	7,7	0,4
4	75-80°C	10,0	82,8	7,0	0,2

Tabla 6: Conversión de FFA en TG con enzima inmovilizada sobre AMBERLITE™ FPX66 a 65-70°C durante 22 horas

Prueba	Componentes después de la reacción (%)			
	FFA	TG	DG	MG
1	11,9	78,6	9,6	0,0
2	9,0	86,7	4,3	0,0
3	8,5	87,0	4,6	0,0

Tabla 7: Conversión de EE en TG con enzima inmovilizada sobre AMBERLITE™ FPX66 a 75-80°C durante 23-24 horas

Prueba	Componentes después de la reacción (%)			
	EE	TG	DG	MG
1	1,7	96,9	1,4	0,0
2	2,4	96,1	1,4	0,0
3	0,8	98,5	0,7	0,0
4	2,3	96,1	1,6	0,0

En un ejemplo a escala de fabricación adicional, las enzimas inmovilizadas se cargaron en un reactor de lecho de enzima fijo y el ácido graso o el éster etílico y el alcohol se bombearon en la enzima inmovilizada.

Ejemplo 3: Preparación a gran escala de enzima inmovilizada

Se usó un sistema de reactor a gran escala como el mostrado en la Figura 1. Se añadieron CALB LIPOZYME™ y agua destilada al recipiente de contención. Se añadió al reactor o los reactores enzimáticos de lecho fijo matriz de calidad alimentaria AMBERLITE™ FPX66 (se pusieron en marcha una partida de 4.000 kg y partidas de 8.000 kg). La mezcla enzimática líquida se recirculó a través del lecho de matriz en el reactor enzimático 24 horas o hasta que las muestras de proteína se nivelaran y se hicieran constantes. La solución enzimática restante se devolvió al recipiente de contención. A continuación, el agua filtrada se bombeó a través de los reactores enzimáticos para lavar las enzimas inmovilizadas. La enzima líquida restante se retiró del recipiente de contención.

Ejemplo 4: Conversión a gran escala de FFA en triglicéridos

Se añadió aceite de pescado con FFA al recipiente de contención del sistema descrito en el Ejemplo 3. El recipiente de contención se calentó hasta 70°C ± 5°C. Mientras se calentaba el recipiente, se inició la agitación y se añadió glicerol. Una vez que la adición de glicerol era completa, el contenido del recipiente de contención se agitó durante 15 minutos. El reactor o los reactores enzimáticos que contenían la solución de enzima inmovilizada se prepararon como en el Ejemplo 3 y estos se pueden reutilizar para varias conversiones enzimáticas. La secuencia del ciclo de conversión comenzó en este punto a lo largo de 24 horas. Durante este período, se tomaron muestras y se probó el % de FFA cada 3 horas. La conversión era completa cuando el % de FFA era 15% máx. A continuación, el aceite se extrajo por bombeo y se transfirió a un depósito de alimentación donde se esperó a que sufriera separación por arrastre de FFA en un depósito de evaporación.

Ejemplo 5: Ensayos de comportamiento de enzimas inmovilizadas

Se prepararon otras enzimas inmovilizadas diversas como se describe en los Ejemplos 1 y 3. Estas enzimas inmovilizadas, así como la enzima inmovilizada producida en los Ejemplos 1 y 3, se probaron para determinar su capacidad para esterificar ácidos grasos. La enzima inmovilizada se cargó en un reactor de lecho enzimático fijo y el

ácido graso y el alcohol se bombearon a través de la enzima inmovilizada. Se analizaron las cantidades de triglicérido (TG) así como di- y monoglicérido (DG y MG, respectivamente) producidas. Los resultados se muestran en las Tablas 8-10.

5

Tabla 8: (Ejemplo Comparativo) Conversión de FFA 4020 en triglicérido (TG) con 2% de CALB L NOVOZYME™ inmovilizada sobre XAD-1180

Condiciones de reacción: FFA 4020 a glicerol ~3 : 1 a 65-70°C durante 21 horas					
Nº de Pruebas	Enzima inmovilizada (enzima : matriz)	Componentes después de la reacción % (media)			
		FFA	TG	DG	MG
2	3 : 1 liofilizada	21,0	73,5	3,60	2,00
2	3 : 1 secada a 50°C	11,6	85,6	2,35	0,55
2	1,5 : 1 secada	17,8	65,9	16,3	0,00
2	1 : 1 secada	12,9	78,5	8,60	0,00
7	3 : 1	7,63	86,4	5,34	0,16
11	5 : 1	6,69	87,3	5,01	1,41

Tabla 9: (Ejemplo Comparativo) Conversión de EE4020 en triglicérido (TG) con 2% de CALB L NOVOZYME™ inmovilizada sobre XAD-1180

Condiciones de reacción: EE4020 a glicerol ~3 : 1 a 80-85°C durante 22 horas					
Nº de of Pruebas	Enzima inmovilizada (enzima : matriz)	Componentes después de la reacción % (media)			
		FFA	TG	DG	MG
1	5 : 1	11,7	62,4	25,4	0,5
4	1,5 : 1	39,3	6,03	43,8	10,7

10

Tabla 10: Conversión de FFA 4020 en triglicérido (TG) con 2% de CALB L NOVOZYME™ inmovilizada sobre diversas matrices

Condiciones de reacción: FFA4020 a glicerol ~3 : 1 a 65-70°C durante 22 horas							
Matriz	Enzima / agua (p/p)	Enzima / cuentas húmedas (p/p)	Nº de Pruebas	Componentes después de la reacción % (media)			
				FFA	TG	DG	MG
XAD16HP	1,5 : 1	3 : 1	4	6,9	87,88	4,78	0,00
XAD761	2 : 1	3 : 1	2	18,2	59,8	22,1	0,05
XAD4	2,25 : 1	3 : 1	1	76,0	0,9	10,4	10,5

Ejemplos Comparativos						
XAD16	2 : 1	3,5 : 1	1	4,3	94,5 1,2	0
XAD16	2,25 : 1	3 : 1	4	19,7	63,6 16,0	0,56
XAD16	2 : 1	2,67 : 1	2	23,7	49,9 24,7	0,95
XAD16	2,5 : 1	3,33 : 1	2	27,3	41,1 28,9	2,30
XAD16	3 : 1	3,33 : 1	1	18,8	71,8 9,40	0,00
XAD16 (5% de KCl lavado)	2,3 : 1	3 : 1	2	91,0	0,15 6,55	2,60
XAD16 (1% de KCl lavado)	2,3:1	3:1	2	73,0	0,50 19,2	7,40
XAD1180	2,25:1	3:1	2	7,7	92,4 1,65	0,2
KO ₂ CCH ₃		20%	1	51,3	0,5 38,0	10,1
NOVOZYME™	435		1	8,00	90,7 1,20	0,00

Ejemplo 6: (Ejemplo Comparativo) Transesterificación usando NOVOZYME™435

5 El aceite XO0355 EE (55 g), junto con glicerol (5 g), se puso en un recipiente de reacción y se añadió NOVOZYME™435 (1,2 g). Se aplicó un vacío (< 1 mbar) y la temperatura se elevó hasta 85°C. La mezcla de reacción se agitó a esta temperatura y presión durante 22 horas, a continuación el producto se separó de la enzima inmovilizada y la enzima inmovilizada residual estaba lista para ser usada en la siguiente partida.

Ejemplo 7: Efecto de variar las condiciones de reacción

10 Se investigó la reactividad de aceite de pescado de éster etílico bajo condiciones de reacción variables (Tabla 11). Se probaron las relaciones superiores de éster etílico a glicerol (p. ej., 4,5 - 1) para confirmar los hallazgos previos. La reacción se repitió con relaciones de EE / glicerol de 3,5 : 1 pero sólo a temperaturas alrededor de 60°C con 61% de rendimiento de TG y quedando 25% de EE de media. Una relación molar: 2,8 : 1 después de 22 horas a 70°C condujo a que la mezcla final consistiera en 6,3% de EE, 78,6% de TG, 12,2% de DG, 2,8% de MG, a 60-65°C. Sin embargo, los rendimientos eran considerablemente inferiores en otros dos experimentos separados, cuando la temperatura era inferior.

15 Tabla 11: (Comparativa) Transesterificación de concentrados de éster etílico en los triglicéridos correspondientes con 2% de NOVOZYME™ 435.

Relación molar EE /Glicerol	Temperatura de incubación	Tiempo (total)	Componentes después de la reacción % (media)				
			TG	DG	MG	EE	%TG*
R1-3,5 : 1**	56-60°C (principalmente 56°)	22 h	59,1	12,6	1,5	26,8	80,7
R2-3,5 : 1	65°C	22 h	67,1	4,9	0,6	27,4	92,4
R4-3,5 : 1	58-60°C (principalmente 58°)	22 h	44,1	19,4	3,7	32,8	65,6
R5-3,5 : 1	6-65°C (principalmente 65°)	22 h	63,2	15,9	1,9	19,1	78,0

ES 2 559 959 T3

Relación molar EE /Glicerol	Temperatura de incubación	Tiempo (total)	Componentes después de la reacción % (media)				
			TG	DG	MG	EE	%TG*
2,3 : 1	62-64°C	22 h	53,6	34,6	10,4	1,3	54,4
2,8 : 1	60-65°C	22 h	70,3	20,5	3,8	5,4	74,3
2,8 : 1	70°C	22 h	78,6	12,2	2,8	6,3	84,0
2,8 : 1	58-60°C	22 h	37,2	23,3	5,2	34,3	56,1
3,2 : 1	52-62°C (□8-10 h a 52°C)	22 h	51,0	20,6	2,0	26,4	69,3
3,3 : 1	60°C	22 h	35,6	1,3	0	63,2	96,4
3,3 : 1	60-65°C	7 h	22,7	9,2	1,0	67,1	69,0
3,5 : 1	~65-70°C	22 h	70,6	7,1	1,9	20,4	88,6
3,8 : 1	48-63°C (principalmente 48°)	22 h	59,4	4,7	1,6	34,3	90,4
4,5 : 1	~55°C	22 h	43,5	14,1	2,0	39,9	72,9
4,5 : 1	58-60°C	22 h	56,3	8,5	0,9	34,4	85,7
4,5 : 1	60-62°C	22 h	65,9	2,5	0,5	31,1	95,6
4,5 : 1	62-64°C	22 h	67,7	2,1	0,5	29,7	96,3
4,5 : 1	60-63°C	22 h	40,5	13,2	1,6	44,6	73,2
4,5 : 1	58-60°C	22 h	1,2	0,6	3,1	95,1	24,5
4,5 : 1	59-64°C (principalmente 59°)	20 h	51,7	8,0	0,9	39,4	85,3
4,5 : 1	65°C	22 h	69,2	1,5	0,3	29,1	97,5
4,5 : 1	60-62°C	22 h	58,0	27,5	5,1	9,4	64,0
4,5 : 1	60-65°C	8 h	43,6	7,3	1,0	48,2	84,0
5,5 : 1	52-62°C (principalmente 52°)	22 h	46,4	5,4	0,9	47,3	88,0
6,2 : 1	60,5°C	22 h	26,0	13,1	1,2	59,7	64,5
6,7 : 1	60°C	5 h	15,2	25,7	7,5	51,6	31,4
7 : 1	55-60°C (principalmente 55°)	22 h	1,3	1,1	2,8	94,9	25,0
9,0 : 1	60-62°C	22 h	45,4	12,4	2,0	40,2	75,9

ES 2 559 959 T3

Relación molar EE /Glicerol	Temperatura de incubación	Tiempo (total)	Componentes después de la reacción % (media)				
			TG	DG	MG	EE	%TG*
~ 2,8 : 1	55-67	22 h	66,3	19,6	4,1	10,1	
~2,8 : 1	70-75	22 h	69,5	21,5	4,1	4,9	
~2,8 : 1	70-75	7 h	14,0	25,6	8,1	52,3	
~ 2,8 : 1	70-75	7 h	5,9	26,5	12,8	54,8	
~ 2,8 : 1	50-62	22 h	53,3	22,3	5,6	18,7	
~ 2,8 : 1	55-63	22 h	50,7	27,1	7,0	15,2	
~ 2,8 : 1	55-65	22 h	47,3	29,8	6,9	16,0	
~ 2,8 : 1	55-67	22 h	53,3	27,9	6,4	12,3	
~ 2,8 : 1	50-65	22 h	40,1	29,3	9,2	21,4	
~ 2,8 : 1	55-67	22 h	59,6	25,8	5,9	8,7	
~ 2,8 : 1	55-65	22 h	45,6	29,7	7,2	17,5	
~ 2,8 : 1	55-65	22 h	42,0	32,6	8,1	17,3	
~ 2,8 : 1	55-65	22 h	47,6	29,7	6,5	16,2	
~ 2,8 : 1	55-65	22 h	51,8	28,4	5,2	14,6	
~ 2,8 : 1	55-65	22 h	54,3	29,1	6,0	10,6	
~ 2,8 : 1	55-65	22 h	51,3	28,2	6,3	14,2	
~ 2,8 : 1	55-65	22 h	46,1	29,2	6,2	18,5	
~ 2,8 : 1	55-65	22 h	46,7	27,5	6,3	19,4	
~ 2,8 : 1	70-75	3 h	7,7	28,2	7,9	56,2	
~ 2,8 : 1	70-75	22 h	79,2	15,8	2,2	2,8	
~ 2,8 : 1	70-75	27 h	76,6	18,1	2,4	2,9	
~ 2,8 : 1	70-75	44 h	79,2	16,9	1,9	2,1	
~ 2,8 : 1	70-75	48 h	79,2	16,7	1,8	2,3	
~ 2,8 : 1	70-75	51 h	79,7	16,9	1,6	1,8	
~ 2,8 : 1	70-75	3 h	18,9	38,6	9,9	32,6	
~ 2,8 : 1	70-75	22 h	70,1	19,4	3,4	7,1	

ES 2 559 959 T3

Relación molar EE /Glicerol	Temperatura de incubación	Tiempo (total)	Componentes después de la reacción % (media)				
			TG	DG	MG	EE	%TG*
~ 2,8 : 1	70-75	27 h	70,4	19,8	3,3	6,5	
~ 2,8 : 1	70-75	44 h	75,4	16,8	3,7	4,1	
~ 2,8 : 1	70-75	48 h	74,6	18,8	2,6	4,0	
~ 2,8 : 1	70-75	51 h	74,6	19,0	2,5	3,9	
~ 2,8 : 1	75-80	22 h	80,5	13,0	2,8	3,7	
~ 2,8 : 1	75-80	27 h	78,8	14,2	3,9	3,1	
~ 2,8 : 1	75-80	45 h	80,7	13,9	3,0	2,5	
~ 2,8 : 1	75-80	48 h	79,3	16,6	1,6	2,5	
~ 3,0 : 1	70-75	22 h	78,8	12,5	1,0	7,6	
~ 3,0 : 1	70-80	22 h	84,1	11,6	0,7	3,6	
~ 3,0 : 1	70-80	22 h	74,1	15,9	1,9	8,1	
~ 3,0 : 1	70-80	22 h	70,3	18,6	2,4	8,6	
~ 3,0 : 1	70-80	22 h	72,5	19,5	2,3	5,7	
~ 3,0 : 1	70-80	22 h	81,2	15,7	1,4	1,7	
~ 3,0 : 1	75	3 h	29,0	30,9	2,5	35,2	
~ 3,0 : 1	75	22 h	74,7	13,9	2,5	8,9	
~ 3,0 : 1	75	27 h	75,4	14,8	2,1	7,7	
~ 3,0 : 1	75	44 h	82,9	11,5	1,3	4,3	
~ 3,0 : 1	75	48 h	83,5	11,7	0,7	4,0	
~ 3,0 : 1	75	3 h	46,7	26,8	6,2	20,2	
~ 3,0 : 1	75	22 h	69,9	18,9	2,9	8,2	
~ 3,0 : 1	75	27 h	71,2	19,4	2,4	7,0	
~ 3,0 : 1	75-95	17 h	83,5	11,6	0,9	4,1	
~ 3,0 : 1	75-80	17 h	64,5	17,9	2,0	15,5	
~ 3,0 : 1	75-80	17 h	60,4	25,1	3,0	11,5	
~ 3,0 : 1	75-80	17 h	42,6	30,8	4,3	22,3	

ES 2 559 959 T3

Relación molar EE /Glicerol	Temperatura de incubación	Tiempo (total)	Componentes después de la reacción % (media)				
			TG	DG	MG	EE	%TG*
~ 3,0 : 1	75-80	17 h	58,4	25,3	3,1	13,3	
~ 3,0 : 1	80-95	17 h	80,9	12,9	2,1	4,1	
~ 3,0 : 1	80-95	22 h	81,8	13,8	0,8	3,6	
~ 3,0 : 1	80-85	17 h	75,2	15,2	1,8	7,8	
~ 3,0 : 1	80-85	17 h	71,4	20,1	1,9	6,5	
~3,0 : 1	80-85	17 h	71,3	20,9	1,8	6,0	
~ 3,0 : 1	80-85	17 h	62,9	23,2	2,3	11,7	
~ 3,0 : 1	80-85	17 h	11,1	0,0	0,0	88,9	
~ 3,0 : 1	80-85	17 h	47,3	30,9	3,6	18,1	
~ 3,0 : 1	80-85	22 h	74,5	17,7	1,3	6,6	
~ 3,0 : 1	90-95	20 h	52,3	28,6	3,8	15,3	
~ 3,0 : 1	80-95	17 h	73,1	17,1	1,1	8,7	
~ 3,0 : 1	80-95	17 h	75,2	21,9	1,7	1,3	
~ 3,0 : 1	80-95	17 h	78,4	18,6	1,1	1,9	
~ 3,0 : 1	80-90	17 h	65,3	22,1	1,6	11,0	
~ 3,0 : 1	80-95	17 h	72,4	28,6	3,8	3,2	
~ 3,0 : 1	80-95	17 h	73,9	22,2	1,3	2,6	
~ 3,0 : 1	80-112	17 h	73,3	23,2	1,5	2,0	
~ 3,0 : 1	75-90	17 h	58,8	27,9	3,0	10,3	
~ 3,0 : 1	80-95	17 h	73,5	18,4	0,8	7,3	
~ 3,0 : 1	80-104	17 h	49,6	31,5	2,5	16,4	
~ 3,0 : 1	80-90	17 h	32,1	40,0	3,1	24,8	
~ 3,0 : 1	78-90	17 h	12,4	49,9	3,7	34,0	
~ 3,0 : 1 (EE40/20)	80-90	17 h	4,9	56,9	1,8	36,5	
~ 3,0 : 1 (EE40/20)	80-90	17 h	1,4	32,6	17,9	48,0	
~ 3,0 : 1 (EE40/20)	80-92	17 h	1,3	19,5	21,9	57,3	

Relación molar EE /Glicerol	Temperatura de incubación	Tiempo (total)	Componentes después de la reacción % (media)				
			TG	DG	MG	EE	%TG*
~3,0 : 1 (EE40/20)	80-90	17 h	1,4	5,9	10,3	82,4	

Sumario de resultados

La temperatura de reacción recomendada es 85°C. La cantidad de 2% de la enzima de la masa de la mezcla de reacción proporcionó buenos resultados y se recomienda. Sin embargo, varios experimentos indicaron que incluso 1% se podía usar satisfactoriamente. Experimentos previos indicaron que los tiempos de reacción largos (aproximadamente 22 h) proporcionaban mejores resultados, aunque los períodos más cortos (p. ej., 7 h) parecían conducir a conversiones más pobres. Las conversiones a las temperaturas superiores pueden requerir menos tiempo. Se observó que las temperaturas inferiores producían grados de conversión inferiores, p. ej., cuando la temperatura caía durante la noche hasta 50°C (probablemente debido a las fluctuaciones en la red eléctrica y la temperatura ambiente nocturna en disminución). Inicialmente, se emplearon temperaturas de alrededor de 60°C. Hubo fluctuaciones de temperatura durante la noche y en muchos casos la temperatura se redujo al menos hasta 55°C. Las conversiones eran claramente mejores a temperaturas entre 70-75°C. Se debe tener en cuenta que la actividad inicial de la enzima alcanza un máximo alrededor de 75°C.

La enzima inmovilizada se reutilizó 5 veces cuando se usó una relación de EE/glicerol 3,5 : 1 en presencia de 2% de la enzima. No se usó disolvente (p. ej., hexano) para lavar la enzima para cada reacción. Puesto que la enzima no se lavó, puede darse el caso de que la enzima sea bloqueada por un componente de la mezcla de reacción.

A lo largo de esta solicitud, se hace referencia a diversas publicaciones.

Será evidente para los expertos en la especialidad que se pueden hacer diversas modificaciones y variaciones en la presente invención sin apartarse del alcance de la invención. Otras realizaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la especialidad considerando la memoria descriptiva y la práctica de la invención divulgada en la presente. Se pretende que la memoria descriptiva y los ejemplos se consideren solamente ejemplares, siendo indicado un alcance abierto de la invención por las siguientes reivindicaciones.

LISTA DE SECUENCIAS

SEQ ID N°:1

```

1  LPSGSDPAFS QPKSVLDAGL TCQGASPSSV SKPILLVPGT GTTGPQSFDS
   SS      S S HHHHHHTE EETBTGGG SSEEEEE T T HHHHHTT
51  NWIPLSTQLG YTPCWISPPP FMLNDTQVNT EYMVNAITAL YAGSGNNKLP
   THHHHHHHTT EEEEE TT TT S HHHHH HHHHHHHHHH HHHTTS EE
101 VLTWSQGGLV AQWGLTFFPS IRSKVDRMA FAPDYKGTVL AGPLDALAVS
   EEEETHHHHH HHHHHHHTGG GTTTB EEEE ES TT BST THHHHHTT B
151 APSVWQQTG SALTTALRNA GGLTQIVPTT NLYSATDEIV QPQVNSPLD
   HHHHHTBT T HHHHHHHH TTTB SS EE EEE TT SSS SSSTTT
201 SSYLFNGKNV QAQAVCGPLF VIDHAGSLTS QFSYVVGRSA LRSTTGQARS
   TTTTBTSEEE EHHHHH TT TTHHHH HHHHHHHHHH HH SSSS G
251 ADYGITDCNP LPANDLTPEQ KVAQAALLAP AAAAIVAGPK QNCEPDLMPY
   GGTGGG SB TTS HHH HHHHHTHHHH HHHHHHHS BSS HH
301 ARPFAVGKRT CSGIVTP
   HHTTTTT EE TTEE

```

5 Las siguientes cláusulas numeradas, que describen aspectos de los propósitos de los presentes inventores, son parte de la descripción.

1. Una enzima inmovilizada que comprende una enzima de esterificación, transesterificación o interesterificación/intraesterificación inmovilizada en una matriz de calidad alimentaria.

2. La enzima inmovilizada de la cláusula 1, en donde la enzima se deriva de un microorganismo.

10 3. La enzima inmovilizada de la cláusula 1, en la que el microorganismo comprende *Burkholderia sp.*, *Candida antarctica B*, *Candida rugosa*, *Candida cylindracea*, *Pseudomonas sp.*, *Candida antarctica A*, *Porcine pancreas*, *Humicola sp.*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Rhizopus javan.*, *Pseudomonas fluor*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida cylindracea*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Mucor jaenicus*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus sp.*, *Rhizopus japonicus*, *Rhizomucor miehi*, *Rhizopus niveus* o *penicillium camemberti*.

15 4. La enzima inmovilizada de la cláusula 1, en la que el microorganismo comprende *Candida antarctica*.

5. La enzima inmovilizada de la cláusula 1, en la que la enzima comprende lipasa B de *Candida antarctica*.

6. La enzima inmovilizada de la cláusula 1, en la que la matriz de calidad alimentaria comprende menos de 10% en peso de impurezas no polimerizables.

20 7. La enzima inmovilizada de la cláusula 1, en la que la matriz de calidad alimentaria comprende menos de 8% en peso de impurezas no polimerizables.

8. La enzima inmovilizada de la cláusula 1, en la que la matriz de calidad alimentaria comprende menos de 6% en peso de impurezas no polimerizables.

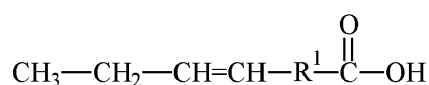
9. La enzima inmovilizada de la cláusula 1, en la que la matriz de calidad alimentaria comprende menos de 4% en peso de impurezas no polimerizables.

25 10. La enzima inmovilizada de la cláusula 1, en la que la matriz de calidad alimentaria comprende menos de 2% en peso de impurezas no polimerizables.

30 11. La enzima inmovilizada de la cláusula 1, en la que la matriz de calidad alimentaria comprende una resina de acrilato-acrilamida, una resina de poliacrilamida, una resina de intercambio iónico, una membrana de intercambio iónico perfluorada, una membrana de intercambio iónico, una resina de tamiz molecular, poli(ácido maleico) o la sal del mismo, polivinilpirrolidona, polivinilpirrolidona, copolímero de dimetilamina-epiclorhidrina, resina de estireno-divinilbenceno amidada clorometilada, poli(acrilato sódico) o monooleato de sorbitano.

12. La enzima inmovilizada de la cláusula 1, en la que la matriz de calidad alimentaria comprende un copolímero de divinilbenceno.
- 5 13. La enzima inmovilizada de la cláusula 1, en la que la matriz de calidad alimentaria comprende un copolímero de (1) divinilbenceno y (2) ácido acrílico, ácido metacrílico, acrilato de metilo, metacrilato de metilo, etilvinilbenceno o estireno.
14. La enzima inmovilizada de la cláusula 1, en la que la matriz de calidad alimentaria comprende un copolímero de divinilbenceno y estireno.
15. La enzima inmovilizada de la cláusula 1, en donde la enzima está unida covalentemente a la matriz de calidad alimentaria.
- 10 16. La enzima inmovilizada de la cláusula 1, en donde la enzima está unida no covalentemente a la matriz de calidad alimentaria.
17. La enzima inmovilizada de la cláusula 1, en la que la cantidad de enzima inmovilizada en la matriz es de 7,5 a 35 KUL/g de matriz basado en la diferencia en la concentración de enzima en la solución usada para interactuar con la matriz según se mide a 280 nm.
- 15 18. La enzima inmovilizada de la cláusula 1, en la que la enzima se deriva de *Candida antarctica* y la matriz de calidad alimentaria comprende un copolímero de divinilbenceno y estireno.
19. Un método para transesterificar un éster, que comprende hacer reaccionar el éster con un alcohol en presencia de una enzima inmovilizada de cualquiera de las cláusulas 1 a 18.
20. El método de la cláusula 19, en el que el éster comprende un éster de un ácido graso insaturado.
- 20 21. El método de la cláusula 20, en el que el ácido graso insaturado se deriva de aceite de pescado.
22. El método de la cláusula 20, en el que el ácido graso insaturado comprende al menos 20 átomos de carbono.
23. El método de la cláusula 20, en el que el ácido graso insaturado comprende al menos un par de enlaces insaturados interrumpidos por metileno.
24. El método de la cláusula 20, en el que el ácido graso insaturado es un ácido graso ω -3 graso.
- 25 25. El método de la cláusula 20, en el que el ácido graso insaturado comprende la fórmula:
- $$\text{CH}_3\text{—CH}_2\text{—CH=CH—R}^1\text{—}\overset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}}\text{—OH}$$
- en la que R^1 es un grupo alquilo o alquenoilo $\text{C}_3\text{—C}_{40}$ que comprende al menos un doble enlace.
26. El método de la cláusula 25, en el que R^1 tiene de 2 a 6 dobles enlaces.
- 30 27. El método de la cláusula 20, en el que el ácido graso insaturado es ácido ácido linoleico, ácido linolénico, ácido γ -linolénico, ácido araquidónico, ácido de Mead, ácido estearidónico, ácido α -eleosteárico, ácido eleosteárico, ácido pinolénico, ácido docosadiénico, ácido docosatetraenoico, ácido octadecadienoico, ácido octadecatrienoico, ácido eicosatetraenoico o cualquier combinación de los mismos.
- 35 28. El método de la cláusula 20, en el que el ácido graso insaturado comprende ácido eicosapentaenoico 20:5 ω 3 (EPA), ácido docosahexaenoico 22:6 ω 3 (DHA), ácido docosapentaenoico 22:5 ω 3 (DPA) o cualquier mezcla de los mismos.
29. El método de las cláusulas 20-28, en el que el éster del ácido graso insaturado comprende un éster alquílico $\text{C}_1\text{—C}_6$.
30. El método de la cláusula 19, en el que el alcohol comprende un poliol.

31. El método de la cláusula 19, en el que el alcohol comprende glicerol.
32. El método de la cláusula 19, en el que el éster y el alcohol están presentes en una relación molar de 1:1 a 10:1.
33. El método de la cláusula 19, en el que el éster y el alcohol están presentes en una relación molar de 2:1 a 5:1.
34. El método de la cláusula 19, en el que la enzima es de 0,1% a 20% en peso de la reacción.
- 5 35. El método de la cláusula 19, en el que la reacción se efectúa a una temperatura de 50°C a 100°C.
36. El método de la cláusula 19, en el que la reacción se efectúa a una temperatura de 70°C a 90°C.
37. El método de la cláusula 19, en el que la reacción se efectúa a una temperatura de 80°C a 90°C.
38. El método de la cláusula 19, en el que la reacción se efectúa de 2 horas a 72 horas.
39. El método de la cláusula 19, en el que la reacción se efectúa de 20 horas a 24 horas.
- 10 40. El método de la cláusula 19, en el que el éster y el alcohol se remueven en presencia de la enzima inmovilizada.
41. El método de la cláusula 19, en el que después de la transesterificación del éster, se filtra la solución que comprende el éster transesterificado y se la aísla la enzima inmovilizada.
42. El método de la cláusula 19, en el que, después de la reacción entre el éster y el alcohol, la cantidad de éster que se transesterifica es de 70 a 100%.
- 15 43. El método de la cláusula 19, en el que the éster comprende un éster etílico de ácido eicosapentaenoico 20:5 ω 3 (EPA), ácido docosahexaenoico 22:6 ω 3 (DHA), ácido docosapentaenoico 22:5 ω 3 (DPA) o cualquier mezcla de los mismos y el alcohol comprende glicerol, en el que el éster y el alcohol están presentes en una relación molar de 2:1 a 5:1, en el que la reacción se remueve en presencia de la enzima inmovilizada a una temperatura de 70°C a 90°C durante de 20 horas a 24 horas, en el que la enzima inmovilizada comprende una enzima derivada de *Candida antarctica* inmovilizada en una matriz de calidad alimentaria que comprende un copolímero de divinilbenceno y estireno.
- 20 44. Un método para esterificar un ácido carboxílico, que comprende hacer reaccionar el ácido con un alcohol en presencia de una enzima inmovilizada de cualquiera de las cláusulas 1 a 18.
45. El método de la cláusula 44, en el que el ácido carboxílico comprende un ácido graso insaturado.
- 25 46. El método de la cláusula 45, en el que el ácido graso insaturado se deriva de aceite de pescado.
47. El método de la cláusula 45, en el que el ácido graso insaturado comprende al menos 20 átomos de carbono.
48. El método de la cláusula 45, en el que el ácido graso insaturado comprende al menos un par de enlaces insaturados interrumpidos por metileno.
49. El método de la cláusula 45, en el que el ácido graso insaturado es un ácido graso ω -3.
- 30 50. El método de la cláusula 45, en el que el ácido graso insaturado comprende la fórmula:



en el que R¹ es un grupo alquilo o alquenoilo C₃-C₄₀ que comprende al menos un doble enlace.

51. El método de la cláusula 50, en el que R¹ tiene de 2 a 6 dobles enlaces.

52. El método de la cláusula 45, en el que el ácido graso insaturado es ácido linoleico, ácido linolénico, ácido γ -linolénico, ácido araquidónico, ácido de Mead, ácido estearidónico, ácido α -eleosteárico, ácido eleosteárico, ácido pinolénico, ácido docosadiénico, ácido docosatetraenoico, ácido octadecadienoico, ácido octadecatrienoico, ácido eicosatetraenoico o cualquier combinación de los mismos.
- 5 53. El método de la cláusula 45, en el que el ácido graso insaturado comprende ácido eicosapentaenoico 20:5 ω 3 (EPA), ácido docosahexaenoico 22:6 ω 3 (DHA), ácido docosapentaenoico 22:5 ω 3 (DPA) o cualquier mezcla de los mismos.
54. El método de la cláusulas 45-53, en el que el éster del ácido graso insaturado comprende un éster alquílico C₁-C₆.
- 10 55. El método de la cláusula 44, en el que el alcohol comprende un poliol.
56. El método de la cláusula 44, en el que el alcohol comprende glicerol.
57. El método de la cláusula 44, en el que el éster y el alcohol están presentes en una relación molar de 1:1 a 10:1.
58. El método de la cláusula 44, en el que el éster y el alcohol están presentes en una relación molar de 2:1 a 5:1.
59. El método de la cláusula 44, en el que la enzima es de 0,1% a 20% en peso de la reacción.
- 15 60. El método de la cláusula 44, en el que la reacción se efectúa a una temperatura de 50°C a 100°C.
61. El método de la cláusula 44, en el que la reacción se efectúa a una temperatura de 70°C a 90°C.
62. El método de la cláusula 44, en el que la reacción se efectúa a una temperatura de 80°C a 90°C.
63. El método de la cláusula 44, en el que la reacción se efectúa de 2 horas a 72 horas.
64. El método de la cláusula 44, en el que la reacción se efectúa de 20 horas a 24 horas.
- 20 65. El método de la cláusula 44, en el que el ácido carboxílico y el alcohol se remueven en presencia de la enzima inmovilizada.
66. El método de la cláusula 44, en el que después de la transesterificación del éster, se filtra la solución que comprende el éster transesterificado y se la aísla la enzima inmovilizada
- 25 67. El método de la cláusula 44, en el que, después de la reacción en el ácido carboxílico y el alcohol, la cantidad de ácido carboxílico que se esterifica es de 70 a 100%.
68. El método de la cláusula 44, en el que el ácido carboxílico comprende ácido eicosapentaenoico 20:5 ω 3 (EPA), ácido docosahexaenoico 22:6 ω 3 (DHA), ácido docosapentaenoico 22:5 ω 3 (DPA) o cualquier mezcla de los mismos y el alcohol comprende glicerol, en el que el éster y el alcohol están presentes en una relación molar de 2:1 a 5:1, en el que la reacción se remueve en presencia de la enzima inmovilizada a una temperatura de 60°C a 90°C durante de 2 horas a 24 horas, en el que la enzima inmovilizada comprende una enzima derivada de *Candida antarctica* inmovilizada en una matriz de calidad alimentaria que comprende un copolímero de divinilbenceno y estireno.
- 30 69. Un método para interesterificar dos o más ácidos carboxílicos o ésteres de los mismos diferentes, que comprende hacer reaccionar los ácidos carboxílicos o los ésteres entre sí en presencia de una enzima inmovilizada de cualquiera de las cláusulas 1 a 18.
- 35 70. Un método para intraesterificar un compuesto que comprende al menos dos grupos éster o un compuesto que comprende al menos un grupo ácido carboxílico y un grupo éster, que comprende poner en contacto el compuesto con la enzima inmovilizada de cualquiera de las cláusulas 1 a 18.
71. Un éster elaborado mediante el procedimiento de cualquiera de las cláusulas 19-70.

REIVINDICACIONES

1. Un método para esterificar un ácido graso, que comprende: hacer pasar una mezcla de reacción que comprende un ácido graso y un alcohol a través de un lecho de enzima inmovilizada, en el que la enzima inmovilizada comprende CALB inmovilizada sobre una matriz de calidad alimentaria que es un copolímero de (1) divinilbenceno y (2) etilvinilbenceno o (1) divinilbenceno y (2) estireno y en el que no se usa un tensioactivo en la preparación de la enzima inmovilizada.
5
2. El método según la reivindicación 1, en el que el ácido graso comprende un ácido graso insaturado.
3. El método según la reivindicación 2, en el que el ácido graso insaturado es un ácido graso ω -3.
4. El método según la reivindicación 2, en el que el ácido graso insaturado es ácido linoleico, ácido linolénico, ácido γ -linolénico, ácido araquidónico, ácido de Mead, ácido estearidónico, ácido α -eleosteárico, ácido eleosteárico, ácido pinolénico, ácido docosadiénico, ácido docosatetraenoico, ácido octadecadienoico, ácido octadecatrienoico, ácido eicosatetraenoico o cualquier combinación de los mismos.
10
5. El método según la reivindicación 2, en el que el ácido graso insaturado comprende ácido eicosapentaenoico 20:5 ω 3 (EPA), ácido docosahexaenoico 22:6 ω 3 (DHA), ácido docosapentaenoico 22:5 ω 3 (DPA) o cualquier mezcla de los mismos.
15
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5, en el que el alcohol comprende un poliol y/o glicerol.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, en el que el ácido graso y el alcohol están presentes en una relación molar de 1:1 a 10:1.
8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7, en el que la CALB es de 0,1% a 20% en peso de la reacción.
20
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 8, en el que la reacción se efectúa a una temperatura de 70°C a 90°C.
10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que, después de la esterificación del ácido carboxílico, se filtra la solución que comprende el éster y se aísla la enzima inmovilizada.

Figura 1

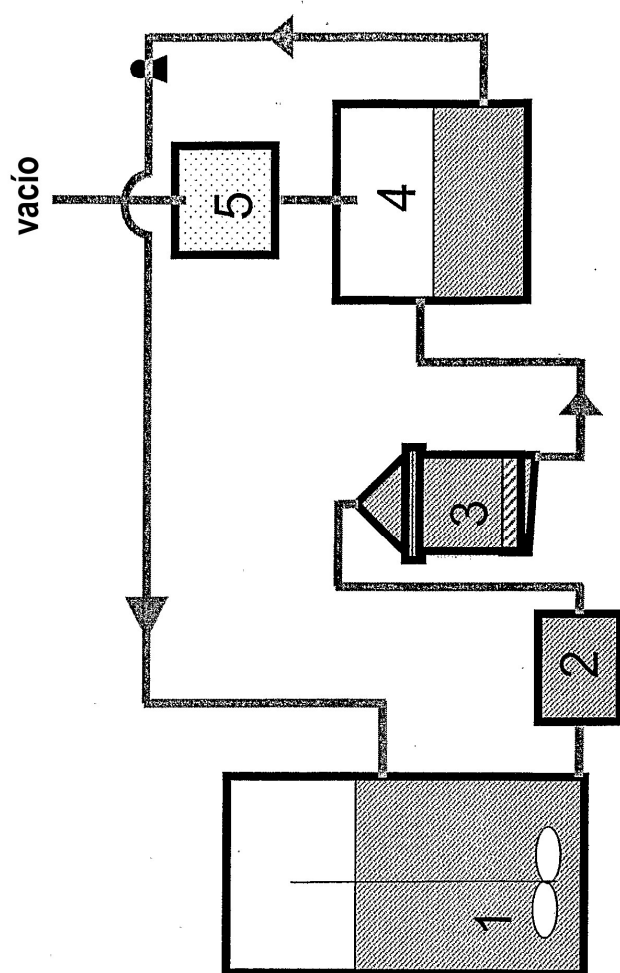


Figura 2

