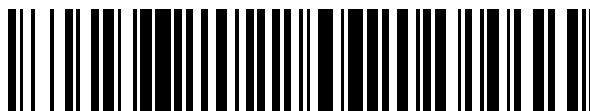


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 802**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2011 PCT/IL2011/000699**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2013 WO13030816**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2011 E 11764620 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 2751275**

54 Título: **Transesterificación enzimática con lipasas inmovilizadas sobre resinas hidrófobas en soluciones acuosas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.02.2017**

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

72 Inventor/es:  
**BASHEER, SOBHI;  
EGBARIEH, AHMAD y  
MASRI, RAMEZ**

74 Agente/Representante:  
**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 601 802 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**

Transesterificación enzimática con lipasas inmovilizadas sobre resinas hidrófobas en soluciones acuosas

**Campo de la invención**

5 Se divulga un procedimiento enzimático para la producción de ésteres de alquilo de ácidos grasos para su uso en industrias de biocombustibles, alimentarias y de detergentes. En este procedimiento, una fuente de ácidos grasos y un alcohol o donante de alcohol se hacen reaccionar en presencia de enzimas inmovilizadas sobre una resina hidrófoba, en presencia de un tampón acuoso alcalino o agua. El procedimiento divulgado se puede hacer funcionar tanto por lotes como continuamente utilizando un tanque de agitación continua o reactores en columna de lecho empacado.

**Antecedentes de la invención**

10 Se ha descrito la inmovilización de enzimas mediante un gran número de técnicas que intentan básicamente reducir la contribución a los costes de las enzimas en los procedimientos enzimáticos globales; facilitando la recuperación de las enzimas a partir de los productos; y permitir el funcionamiento continuo del procedimiento.

Las técnicas de inmovilización están en general divididas de acuerdo con lo siguiente:

- 15
1. Adsorción física de enzimas a soportes sólidos, tales como sílice y polímeros insolubles.
  2. Adsorción en resinas de intercambio iónico.
  3. Enlace covalente de las enzimas a un material de soporte sólido, tales como soportes inorgánicos o poliméricos epoxidados.
  4. Atrapamiento de enzimas en un polímero en crecimiento.
- 20
5. Confinamiento de enzimas en un reactor de membranas o en geles semipermeables.
  6. Reticulación de cristales (CLECS) o agregados (CLEAS) de enzimas.

Todos los procedimientos de inmovilización de enzimas anteriormente mencionados están comprendidos por las siguientes etapas:

- 25
1. Disolver la enzima en un sistema tampón adecuado con respecto al pH, temperatura, tipo de sales de tampón y fuerza iónica.
  2. Añadir el soporte sólido a la solución enzimática y mezclar durante algún tiempo hasta que las moléculas enzimáticas estén inmovilizadas sobre el soporte sólido.
  3. Eliminar mediante filtración el soporte sólido que contiene la enzima inmovilizada.
  4. Lavar el soporte con un tampón adecuado para eliminar las moléculas enzimáticas débilmente unidas y a continuación secar el soporte sólido.
- 30

Se han inmovilizado enzimas interfaciales, principalmente lipasas, siguiendo las técnicas anteriormente mencionadas. Estas preparaciones de enzimas inmovilizadas ofrecidas poseen una baja actividad sintética y un tiempo de vida media en funcionamiento corto. Se han aplicado diferentes procedimientos de activación en un intento de aumentar la actividad y la estabilidad sintética de las lipasas inmovilizadas y otras enzimas interfaciales. Estos procedimientos incluyen:

- 35
1. Unir los grupos superficiales de enzimas con restos hidrófobos tales como ácidos grasos o polietilenglicol.
  2. Revestir la superficie de las enzimas con tensioactivos, tales como ésteres de ácidos grasos de polioles.
  3. Poner en contacto enzimas con soportes hidrófobos, normalmente polipropileno, que se han pretratado con disolventes hidrófilos, tales como etanol o isopropanol.

40 Ninguno de los procedimientos anteriormente mencionados ha proporcionado resultados satisfactorios con respecto a la estabilización y a la rentabilidad de las enzimas interfaciales inmovilizadas, a fin de llevar a cabo las conversiones enzimáticas inversas en cantidades industriales. Asimismo, se ha notificado que la mayoría de las enzimas, cuando se inmovilizan de acuerdo con los procedimientos anteriormente mencionados, pierden bien una parte significativa de su actividad sintética o bien no presentan su comportamiento de actividad completo debido a determinadas restricciones impuestas por el procedimiento de inmovilización, o debido a la presencia de determinados inhibidores enzimáticos en el medio de reacción.

45

Otro inconveniente importante de las lipasas y fosfolipasas es su baja tolerancia hacia los sustratos hidrófilos, en particular alcoholes de cadena corta y ácidos grasos de cadena corta (por debajo de C4). Se ha observado en muchos estudios de investigación que los alcoholes de cadena corta y ácidos grasos de cadena corta, tales como metanol y ácido acético, respectivamente, son responsables de separar las moléculas de agua esenciales de la estructura cuaternaria de dichas enzimas, llevando a su desnaturalización y consiguientemente a la pérdida de su actividad catalítica. Este inconveniente ha impedido la aplicación de lipasas para la producción de cantidades comerciales de "biodiesel" de ésteres metílicos de ácidos grasos utilizando triglicéridos de aceite y metanol como sustratos.

50

Un inconveniente adicional de utilizar lipasas inmovilizadas para la transesterificación/esterificación de una fuente de ácido graso con un alcohol libre es la acumulación de glicerol y los subproductos acuosos formados sobre el biocatalizador y por tanto impidiendo el libre acceso de los sustratos al sitio activo de la enzima inmovilizada. Dichos biocatalizadores generalmente pierden su comportamiento catalítico tras unos pocos ciclos cuando se usa el mismo lote de biocatalizador.

El documento WO/2011/107977 describe un procedimiento enzimático para la producción de ésteres de alquilo de ácidos grasos para el uso en industrias de biocombustibles, alimentarias y de detergentes, en cuyo procedimiento, una fuente de ácidos grasos u un alcohol o donante de alcohol se hacen reaccionar en presencia de lipasa(s) inmovilizada(s) sobre una resina hidrófoba, en presencia de un tampón acuoso alcalino o agua.

El documento US 2009/0133322 describe un procedimiento para la preparación de ésteres de alquilo de ácidos grasos de cadena corta en un sistema exento de disolvente, haciendo reaccionar una fuente de ácido graso con un alcohol libre de cadena corta, en presencia de una preparación de lipasa que comprende al menos dos lipasas inmovilizadas sobre un soporte adecuado, teniendo al menos una de las lipasas una afinidad aumentada por glicéridos parciales y estando al menos una de las lipasas específicas de la posición sn-1,3

El documento US 2010/0209982 se refiere a preparaciones de lipasas modificadas y fosfolipasas inmovilizadas sobre un soporte sólido, en el cual la enzima se rodea de un microambiente hidrófobo y se protege de la desactivación y/o de la agregación en presencia de agentes hidrófilos, sustratos y/o productos de reacción. La enzima se protege uniéndose covalentemente a los grupos lípidos que la revisten, o inmovilizándose o incluyéndose en un soporte sólido hidrófobo. Las enzimas se pueden usar eficazmente en la preparación de biodiesel.

El documento EP2050823 divulga una reacción de transesterificación donde la lipasa puede inmovilizarse sobre sepiolita. Se puede añadir una base para conseguir un pH entre 8 y 13.

Salis y col, J. Molecular Catalysis B: Enzymatic 57 (2009) 262-269, divulgan estudios llevados a cabo para investigar la influencia de la superficie del soporte sobre la carga y la actividad enzimática de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* inmovilizada. No existe una clara divulgación de los sistemas que comprenden 5 % en peso o más de agua.

Foresti y col, Enzyme and Microbial Technology, 41 (2007) 62-70, divulgan sistemas específicos inmovilizados en polipropileno que se basan en un sistema de reacción en dos fases líquidas.

Los presentes inventores han desarrollado preparaciones de enzimas inmovilizadas especiales, que presentan buena estabilidad durante muchos ciclos de producción, y actividad persistente. Se divulgan ejemplos de dichas preparaciones enzimáticas, *entre otros*, en los documentos WO 2008/084470, WO 2008/139455 y WO 2009/069116.

Las condiciones bajo las cuales se lleva a cabo la reacción catalítica pueden afectar adversamente la estabilidad y la eficacia de las preparaciones de enzimas inmovilizadas. Es importante tener preparaciones de enzimas que retengan la estabilidad y la actividad en las condiciones de reacción.

Estos y otros objetos de la invención serán evidentes a medida que prosigue la descripción.

### **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona un procedimiento para la transesterificación/ esterificación de una fuente de ácido graso con un alcohol, para formar ésteres de alquilo de ácidos grasos, que comprende bien

(A) hacer reaccionar una fuente de ácido graso y un alcohol o donante de alcohol en presencia de una preparación de lipasa inmovilizada, en el que la preparación de lipasa inmovilizada comprende al menos una lipasa inmovilizada sobre un soporte poroso hidrófobo y el medio de reacción contiene una solución acuosa de tampón alcalino en más de un 5 % en peso de la fuente de ácido graso; o

(B) hacer reaccionar una fuente de ácido graso y un alcohol o un donante de alcohol en presencia de una preparación de lipasa inmovilizada, en el que la preparación de lipasa inmovilizada comprende al menos una lipasa inmovilizada sobre un soporte poroso hidrófobo y el medio de reacción contiene agua en más de un 5 % en peso de la fuente de ácido graso.

En una realización, el procedimiento comprende (A) y la solución acuosa de tampón tiene un pH de 7 a 11.

En otra realización, el procedimiento comprende (A) y la cantidad de dicha solución de tampón alcalino en el medio de reacción es de más del 5 % en peso y de hasta el 99 % en peso de la fuente de ácido graso.

En una realización adicional, el procedimiento comprende (B) y el agua está en la forma de una solución acuosa de sales disueltas y el pH del sistema de reacción o de la solución acuosa es de 3 a 11.

En una realización adicional, el procedimiento comprende (B) o el procedimiento de la reivindicación 4, en el que el medio de reacción contiene el agua o la solución acuosa de sales disueltas en más de un 5 % en peso y hasta un 99 % en peso de la fuente de ácidos grasos. Preferentemente, dicho alcohol es un alcohol de alquilo C1-C6 de

cadena corta, y dicho donante de alcohol es un monoalquil éster, o un carbonato de dialquilo, que sirve también como una fuente de reactivo moderadamente alcalino en el medio de reacción.

En el procedimiento de la invención la mencionada solución acuosa de tampón alcalino puede ser una solución acuosa de tampón alcalino. La mencionada solución acuosa de tampón alcalino puede estar contenida en la mezcla de reacción en una cantidad de hasta un 99 % en peso de la fuente de ácido graso, por ejemplo, hasta el 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 12 %, 10 % y 8 %. Como alternativa, la mencionada solución acuosa de tampón alcalino puede estar contenida en la mezcla de reacción en una cantidad de más de un 5 % en peso de la fuente de ácido graso, más de un 6 %, 8 %, 10 %, 12 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, y hasta el 99 %. La solución acuosa tamponante puede tener un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 11, por ejemplo, uno cualquiera de 7-8,5, 7-9, 7-9,5, 7-10 y 7-11. En el procedimiento de la invención, el pKa del reactivo moderadamente alcalino suplementado que comprende la solución tamponante puede ser mayor o igual al pKa de los ácidos libres presentes en la fuente de ácido graso.

El medio de reacción del procedimiento de la presente invención puede comprender agua. El agua está en la forma de agua destilada o de agua que contiene diversas sales disueltas, con un pH de entre 3 a 11. El medio de reacción puede contener el agua o solución acuosa en una cantidad de hasta un 99 % en peso de la fuente de ácido graso, por ejemplo, hasta el 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 12 %, 10 % y 8 %. Como alternativa, el agua o la solución acuosa pueden estar contenidas en la mezcla de reacción en una cantidad de más de un 5 % en peso de la fuente de ácido graso, más de un 6 %, 8 %, 10 %, 12 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, y hasta el 99 %.

En todas las realizaciones y aspectos de la invención, el alcohol puede ser un alcohol de cadena corta, por ejemplo, alcohol de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, más específicamente alcohol de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, particularmente metanol o etanol. Cuando dicho alcohol es metanol y dichos ésteres de ácidos grasos resultantes son ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME - Biocombustible). El alcohol puede ser también un alcohol graso de cadena intermedia (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>) o alcoholes grasos de cadena larga (C<sub>12</sub>-C<sub>22</sub>). El donante de alcohol puede ser un monoalquil éster o un carbonato de dialquilo, tal como carbonato de dimetilo o carbonato de dietilo.

En todas las realizaciones y aspectos de la invención, dicha lipasa inmovilizada es capaz de catalizar la esterificación de los ácidos grasos libres para dar como resultado ésteres de alquilo de ácidos grasos y agua como subproductos, y la transesterificación de triglicéridos, glicéridos parciales, ésteres de ceras, y fosfolípidos para dar como resultado ésteres de alquilo de ácidos grasos y glicerol, y alcoholes grasos de cadena larga y glicerofosfolípidos como subproductos, respectivamente.

En todas las realizaciones y aspectos de la invención relacionados con el uso de un tampón alcalino o una solución alcalina, la cantidad de dicho tampón o solución alcalina en el medio de reacción es más de 0,001 % en peso de la fuente de ácido graso.

En todas las realizaciones y aspectos de la invención, dicha al menos una lipasa puede ser una lipasa derivada de una cualquiera de *Rhizomucor miehei*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus niveus*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium camembertii*, *Alcaligenes sp.*, *Acromobacter sp.*, *Burkholderia sp.*, *Thermomyces lanuginosus*, *Chromobacterium viscosum*, *Candida antarctica B*, *Candida rugosa*, *Candida antarctica A*, semillas de papaya y pancreatina. La preparación de lipasa puede comprender al menos dos lipasas que pueden inmovilizarse por separado sobre un soporte hidrófobo o coinmovilizarse sobre el mismo soporte hidrófobo. Las mencionadas lipasas son capaces de catalizar de forma simultánea o consecutiva la esterificación de los ácidos grasos libres para dar como resultado ésteres de alquilo de ácidos grasos y agua como subproducto, y la transesterificación de triglicéridos y glicéridos parciales para dar como resultado ésteres de alquilo de ácidos grasos y glicerol como subproductos, y/o la transesterificación de fosfolípidos para dar como resultado ésteres de alquilo de ácidos grasos y lisofosfolípidos y glicerofosfolípidos como subproductos.

En todas las realizaciones y aspectos de la invención, dicho soporte puede ser uno cualquiera de un soporte basado en un polímero alifático hidrófobo y un soporte basado en un polímero aromático hidrófobo. El mencionado soporte de polímero hidrófobo puede comprender cadenas orgánicas lineales o ramificadas. El mencionado soporte puede comprender cadenas de polímeros o copolímeros orgánicos macrorreticulares. El mencionado soporte puede ser un soporte inorgánico poroso o no poroso, que puede ser hidrófobo o estar revestido con un material orgánico hidrófobo. El mencionado material orgánico puede ser una cadena orgánica hidrófoba lineal, ramificada, o funcionalizada.

En todas las realizaciones y aspectos de la invención donde se usa una solución tamponada alcalina, la mencionada solución acuosa tamponada alcalina puede ser una solución de una sal alcalina inorgánica o una base inorgánica. La mencionada solución tamponada alcalina puede ser una solución de uno cualquiera de un hidróxido metálico alcalino, carbonato, bicarbonato, fosfato, sulfato, acetato y citrato, sales de ácidos grasos, aminas primarias, secundarias y terciarias, y cualquiera de sus mezclas. En realizaciones específicas, la mencionada solución tamponada alcalina puede ser una solución de una base débil seleccionada entre bicarbonatos y carbonatos de sodio o potasio. En algunas realizaciones específicas del procedimiento de la invención, la mencionada solución tamponada alcalina puede añadirse a dicha fuente ácida en un estado de premezcla o directamente al medio de

reacción.

5 En todas las realizaciones y aspectos de la invención donde se usa una solución tamponada alcalina, el contenido de dicha solución tamponada alcalina en el medio de reacción de transesterificación/esterificación puede estar en una cantidad de más de 0,001 % en peso de la materia prima oleosa, por ejemplo, 1-30 % en peso, 1-20 % en peso, 1-10 % en peso, 1-5 % en peso o 1-2 % en peso de la materia prima oleosa, o cantidades de más de un 5 % en peso de la materia prima oleosa, por ejemplo, más de un 6 %, 7 %, 8 %, 10 %, 12 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 % y 50 % en peso de la materia prima oleosa.

10 En algunas realizaciones de la invención, la fuente de ácido graso puede mezclarse en primer lugar con la solución tamponada alcalina o con el agua o la solución acuosa, y la mezcla puede tratarse a continuación con dicha preparación de lipasa inmovilizada, seguido por la adición de dicho alcohol y permitiendo que la reacción continúe en condiciones adecuadas hasta que dicha fuente de ácido graso se convierta en ésteres de ácidos grasos.

15 En todas las realizaciones y aspectos de la invención, dicha fuente de ácidos grasos puede ser una cualquiera de un aceite vegetal, grasas animales, aceite de algas, aceite de pescado, aceites residuales y cualquier mezcla de los anteriores. La mencionada fuente de ácido graso puede comprender ácidos grasos libres, monoglicéridos, diglicéridos o triglicéridos, sus mezclas en cualquier relación, en ausencia o presencia de otros derivados de ácidos grasos minoritarios tales como fosfolípidos, ésteres de ceras y ésteres de esteroides. La fuente de ácido graso puede ser no refinada, refinada, decolorada, desodorizada o cualquiera de sus combinaciones.

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

20 En todas las realizaciones y aspectos de la invención, la mencionada fuente de ácido graso puede premezclarse con dicho alcohol o donante de alcohol y con dicho agua o solución tamponada en un recipiente de preparación prerreacción para formar una emulsión que se puede alimentar junto con dicha preparación de lipasa inmovilizada en un recipiente de reacción transesterificación/esterificación.

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

Se describe también en el presente documento un sistema para la transesterificación/ esterificación de un ácido graso con un alcohol, para formar ésteres de alquilo de ácidos grasos, que comprende:

30 un recipiente de reacción configurado para hacer reaccionar un medio de reacción incluyendo un ácido graso y al menos uno de un alcohol y un donante de alcohol en presencia de una preparación de lipasa inmovilizada, en el que la preparación de lipasa inmovilizada comprende al menos una lipasa inmovilizada sobre un soporte poroso hidrófobo y el medio de reacción contiene al menos uno de una solución tamponada alcalina acuosa y agua.

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

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

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

40 C. Adicional o alternativamente a las características A o B, dicho medio de reacción comprende una mezcla, dicho sistema comprende además un recipiente prerreacción en comunicación de fluidos selectiva con dicho recipiente de reacción, estando configurado dicho vaso de prerreacción para premezclar al menos el ácido graso y al menos uno de un alcohol y un donante de alcohol para formar dicha mezcla, y para administrar selectivamente dicha mezcla a dicho recipiente de reacción al menos durante el funcionamiento de dicho sistema para la producción de dichos ésteres de alquilo de ácidos grasos. El sistema puede comprender además

45 opcionalmente una fuente de ácido graso en comunicación de fluidos selectiva con dicho recipiente de reacción y configurada para administrar selectivamente el ácido graso a dicho recipiente de prerreacción al menos durante dicho funcionamiento de dicho sistema, y una fuente de alcohol en comunicación de fluidos selectiva con dicho recipiente de prerreacción y configurada para administrar selectivamente el al menos uno de un alcohol y un donante de alcohol a dicho recipiente de prerreacción al menos durante dicho funcionamiento de dicho sistema.

50 El sistema puede comprender además opcionalmente una fuente tamponada en comunicación de fluidos selectiva con dicho recipiente de prerreacción y configurada para administrar selectivamente al menos uno de una solución tamponada alcalina acuosa y agua a dicho recipiente de prerreacción que se va a incluir en dicha mezcla al menos dicho funcionamiento de dicho sistema.

55 D. Adicional o alternativamente a las características A a C, el sistema puede configurarse para administrar selectivamente uno o más del ácido graso y/o el al menos uno de un alcohol y un donante de alcohol y/o el al menos uno de una solución tamponada alcalina acuosa y agua a dicho recipiente de prerreacción cada uno tanto de manera continua como en lotes discretos, al menos durante dicho funcionamiento de dicho sistema.

E. Adicional o alternativamente a las características A a D, el recipiente de prerreacción puede configurarse para

administrar selectivamente dicha mezcla a dicho recipiente de reacción de una manera continua y/o en lotes discretos, al menos durante el funcionamiento de dicho sistema.

F. Adicional o alternativamente a las características A a E, el sistema se puede configurar para administrar de forma selectiva y directa a dicho recipiente de reacción al menos uno del ácido graso; el al menos uno de un alcohol y un donante de alcohol; y la al menos una de una solución tamponada alcalina acuosa y agua.

G. Adicional o alternativamente a las características A a F, el recipiente de reacción puede comprender un sistema de regulación térmica configurado para mantener el medio de reacción en dicho recipiente de reacción en un intervalo de temperatura seleccionado.

H. Adicional o alternativamente a las características A a G, el sistema puede comprender opcionalmente además una disposición de retención configurada para retener la preparación de lipasa inmovilizada en dicho recipiente de reacción al menos durante el funcionamiento de dicho sistema.

I. Adicional o alternativamente a las características A a H, el sistema comprende además un recipiente de separación de producto en comunicación de fluidos selectiva con dicho recipiente de reacción, estando configurado dicho sistema para administrar selectivamente una mezcla de reacción que incluye productos de reacción de dicho recipiente de reacción a dicho recipiente de separación de producto, y en el que dicho recipiente de separación de producto se configura para separar selectivamente el rendimiento de los ésteres de alquilo de ácidos grasos de la mezcla de reacción administrada a los anteriores. Por ejemplo, el recipiente de separación del producto puede ser uno de un sistema de separación por centrifuga y gravedad.

J. Adicional o alternativamente a las características A a I, el recipiente de reacción se configura para administrar selectivamente dicha mezcla de reacción a dicho recipiente de separación de producto de una manera continua y/o en lotes discretos al menos durante dicho funcionamiento de dicho sistema.

K. Adicional o alternativamente a las características I a J, el sistema se configura para administrar selectivamente dicho rendimiento de ésteres de alquilo de ácidos grasos desde dicho recipiente de separación de producto. Por ejemplo, el sistema se configura para administrar selectivamente dicho rendimiento de ésteres de alquilo de ácidos grasos desde dicho recipiente de separación de producto de una manera continua y/o en lotes discretos.

L. Adicional o alternativamente a las características A a K, el sistema se configura para aumentar dicho rendimiento de los ésteres de alquilo de ácidos grasos de la mezcla de reacción administrada a dicho recipiente de separación de producto. En una configuración del sistema que tiene esta característica, el sistema se configura para redirigir dicho rendimiento de los ésteres de alquilo de ácidos grasos a dicho recipiente de reacción para aumentar además dicho rendimiento de dichos ésteres de alquilo de ácidos grasos de la mezcla de reacción posteriormente administrada a dicho recipiente de separación de producto. En otra configuración del sistema que tiene esta característica, el sistema se configura para redirigir selectivamente dicho rendimiento de los ésteres de alquilo de ácidos grasos a un módulo reactor auxiliar, en el que dicho módulo reactor auxiliar comprende un recipiente reactor auxiliar y un recipiente de separación de producto auxiliar, en el que dicho rendimiento aumentado adicional de los ésteres de alquilo de ácidos grasos se administra posteriormente de forma selectiva mediante dicho recipiente de separación de producto auxiliar.

### **Breve descripción de las figuras**

A fin de comprender la invención y de ver cómo puede llevarse a cabo en la práctica, se describirán ahora las realizaciones, por medio de un único ejemplo no limitante, con referencia a los dibujos acompañantes, en los que:

Figura 1: La conversión del aceite de soja en ésteres metílicos de ácidos grasos y glicerol después de 6 horas de reacción utilizando el mismo lote de biocatalizador (*Thermomyces lanuginosus* (TL) inmovilizado sobre un soporte de DVB-PS) en múltiples lotes experimentales, a diferentes concentraciones de solución de bicarbonato de sodio de 0.1 M. Se añadió metanol a la mezcla de reacción en una etapa en una relación en base molar de 1:3 entre aceite y metanol.

Abreviaturas: Conv. - conversión; Cic. - ciclo; Sol. - solución

Figura 2: La conversión de aceite de soja en biodiesel y glicerol después de 6 horas de reacción utilizando el mismo lote de biocatalizador (*Pseudomonas sp.* (SP) inmovilizado sobre un soporte de DVB-PS) en múltiples lotes experimentales a diferentes concentraciones de una solución de bicarbonato de sodio 0,1 M. Se añadió metanol a la mezcla de reacción en una etapa sobre una relación en base molar de 1:3 entre aceite y metanol.

Abreviaturas: Conv. - conversión; Cic. - ciclo; Sol. - solución

Figura 3: La conversión de aceite de soja en biodiesel y glicerol después de 6 horas de reacción utilizando el mismo lote de biocatalizador (*Thermomyces lanuginosus* (TL) inmovilizado sobre un soporte de DVB-PS) en múltiples lotes experimentales a diferentes concentraciones de agua destilada en la mezcla de reacción. Se añadió metanol a la mezcla de reacción en una etapa sobre una relación en base molar de 1:3 entre aceite y metanol.

Abreviaturas: Conv. - conversión; Cic. - ciclo; Agu. - agua

Figura 4: La conversión de ácido oleico en biodiesel y agua tras 6 horas de reacción utilizando el mismo lote de biocatalizador (*Thermomyces lanuginosus* (TL) inmovilizado sobre un soporte de DVB-PS) en múltiples lotes experimentales en diferentes concentraciones de solución de bicarbonato de sodio. Se añadió metanol 0,1 M a la mezcla de reacción en una etapa sobre la relación en base molar de 1:3 entre aceite y metanol.

Abreviaturas: Conv. - conversión; Cic. - ciclo; Sol. - solución

Figura 5: La conversión de diferentes mezclas de triglicéridos de ácido oleico y aceite de soja en biodiesel, glicerol y agua después de 6 horas de reacción utilizando el mismo lote de biocatalizador *Thermomyces*

*lanuginosus* (TL) inmovilizado sobre un soporte de DVB-PS) en múltiples lotes experimentales en presencia de una solución de bicarbonato de sodio al 8 % en peso 0,1 M. Se añadió metanol a la mezcla de reacción en una etapa sobre una relación en base molar de 1:3 entre aceite y metanol.

Abreviaturas: Conv. - conversión; Cic. - ciclo; Ac. ol. Ácido oleico

5 Figura 6: La conversión de los aceites brutos que contienen fosfolípidos en biodiesel y glicerol después de 6 horas de reacción utilizando el mismo lote de biocatalizador (*Thermomyces lanuginosus* (TL) inmovilizado sobre un soporte de DVBPS) en múltiples lotes experimentales en presencia de una solución de bicarbonato de sodio al 8 % en peso. Se añadió metanol 0,1 M a la mezcla de reacción en una etapa sobre una relación en base molar de 1:3 entre aceite y metanol.

10 Abreviaturas: Conv. - conversión; Cic. - ciclo; RS- BO - aceite de soja refinado; CSBO - aceite de soja bruto; RSBO - aceite de soja refinado; PL - fosfolípidos; O - aceite;

15 Figura 7: La conversión de aceite de soja en biodiesel y glicerol después de 6 horas de reacción utilizando el mismo lote de biocatalizador *Thermomyces lanuginosus* (TL) inmovilizado sobre un soporte de DVB-PS) en múltiples lotes experimentales a diferentes valores de pH de una solución de bicarbonato de sodio 0,1 M. La concentración de tampón en el medio de reacción era del 8 % en peso del aceite. Se añadió metanol a la mezcla de reacción en una etapa sobre una relación en base molar de 1:3 entre aceite y metanol.

Abreviaturas: Conv. - conversión; Cic. - ciclo

20 Figura 8: La conversión de aceite de soja en biodiesel y glicerol después de 6 horas de reacción utilizando el mismo lote de biocatalizador (*Thermomyces lanuginosus* (TL) inmovilizado sobre un soporte de DVB-PS) en múltiples lotes experimentales a diferentes concentraciones de una solución de bicarbonato de sodio 0,1 M. La concentración de tampón en el medio de reacción era de 8 % en peso de aceite. Se añadió metanol a la mezcla de reacción en una etapa sobre una relación en base molar de 1:3 entre aceite y metanol.

Abreviaturas: Conv. - conversión; Cic. - ciclo; Acet. - acetato

25 La Fig. 9: ilustra esquemáticamente un sistema para la producción de ésteres de alquilo de ácidos grasos.

La Fig. 10 ilustra esquemáticamente un sistema para la producción de ésteres de alquilo de ácidos grasos.

### **Descripción detallada de la invención**

En la búsqueda de la mejora de procedimientos industriales catalizados enzimáticamente, particularmente, procedimientos para transesterificación/esterificación de una fuente de ácidos grasos con un alcohol en presencia de lipasa(s), inmovilizada(s), los presentes inventores han desarrollado condiciones específicas bajo las cuales, la estabilidad de la(s) lipasa(s) inmovilizadas se preserva sobre las puntuaciones de los ciclos de producción.

En una realización de la invención, la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de ésteres de alquilo de ácidos grasos, particularmente ésteres de alquilo de ácidos grasos de cadena corta, tales como ésteres metílicos y etílicos de ácidos grasos (biodiesel) en un sistema microacuoso alcalino exento de disolvente. En realizaciones específicas, el sistema microacuoso alcalino es un sistema microacuoso alcalino suave. El procedimiento comprende proporcionar una fuente de ácido graso y hacer reaccionar esta con un alcohol libre o un donante de alcohol, en presencia de una preparación de lipasa inmovilizada, en las mencionadas condiciones alcalinas o alcalinas suaves. Sin pretender quedar vinculado por teoría alguna, el pretratamiento de la fuente de ácido graso con una solución tamponada alcalina da como resultado la neutralización de ácidos que pueden tener un efecto inhibitorio sobre la enzima. La cantidad de alcohol necesaria para finalizar la reacción hasta una conversión del 100 % se puede añadir por etapas o en un lote. Además, el alcohol puede ser un alcohol de cadena corta, por ejemplo, metanol o etanol. Se pueden usar otros donantes de alcohol en la reacción con la fuente de ácido graso en presencia de una hidrolasa y permitiendo que proceda la reacción en las condiciones adecuadas, hasta que dicha fuente de ácido graso se convierta en ésteres de alquilo de ácidos grasos, específicamente, ésteres de metilo de ácidos grasos (FAME) o ésteres de etilo de ácidos grasos, en el que dicha preparación de hidrolasa comprende una o más lipasas, inmovilizadas por separado o juntas sobre un soporte basado en polímero hidrófobo poroso macrorreticular adecuado.

En una realización adicional, la reacción de transesterificación/esterificación entre la fuente de ácido graso y el alcohol o donante de alcohol se lleva a cabo en un microambiente acuoso, con adición de agua a la mezcla de reacción. En las realizaciones específicas se puede añadir agua en una cantidad superior a 0,0001 % en peso (sobre la base de la fuente de ácido graso). Por agua, como se usa aquí, se entiende agua pura o agua destilada, y también "soluciones acuosas" (denominadas también soluciones acuosas), que pueden ser, pero no de forma limitativa, agua corriente, agua de mar o agua procedente de cualquier otro recurso o depósito de agua natural, agua desalinizada, agua purificada química o enzimáticamente o agua tratada, y cualesquiera otras soluciones acuosas, por ejemplo, soluciones salinas disueltas. El pH del sistema de reacción o de la solución puede variar, y puede ser, por ejemplo, aproximadamente 3-11, por ejemplo 4-10, 5-10, 5-9, 6-10, 6-9, o 7-9.

El procedimiento de la invención puede llevarse a cabo eliminando continuamente a la vez el glicerol formado y cualquier agua en exceso procedente de la mezcla de reacción. La conversión de los grupos acilo de los ácidos grasos o de los ácidos grasos libres comprendido en dicha fuente de ácidos grasos en alquilo de ácidos grasos, específicamente ésteres metílicos, se puede vigilar en diversos puntos temporales durante la reacción. El medio de reacción puede retirarse por medios adecuados en cualquier punto temporal deseado durante la reacción, deteniendo por tanto la reacción, y los ésteres metílicos de ácidos grasos formados y opcionalmente el glicerol formado se aíslan del medio de reacción. La reacción puede detenerse específicamente cuando la conversión de los

grupos acilo de los ácidos grasos o los ácidos grasos libres comprendidos en dicha fuente de ácidos grasos en ésteres metílicos de ácidos grasos ha alcanzado al menos un 70 %, por ejemplo, al menos un 85 %, o al menos un 90 %.

5 El sistema de reacciones puede ser similar al descrito en la patente WO 2009/069116 en tramitación junto con la presente. Por ejemplo, el sistema de producción puede usar un reactor tanque agitado con filtro de vidrio o acero inoxidable sinterizado en la parte inferior que retiene el biocatalizador en el reactor, sin embargo, permite al medio de reacción la permeación a través del reactor. Dicha configuración del reactor permite que los subproductos, específicamente glicerol y agua, que se autodesorben a partir de la enzima inmovilizada, para hundirse en la parte inferior del reactor, y permear a través del filtro. El resultado es la eliminación continua del glicerol formado desorbido y también del agua en exceso, fuera del medio de reacción, conduciendo al cambio de la reacción hacia la síntesis, alcanzando de esta forma conversiones por encima del 98 %. El biocatalizador utilizado es este reactor puede estar comprendido por lipasas de un solo tipo o de varios tipos, en consideración a su especificidad de posición, así como a su origen, tal como se describe en el presente documento. De forma alternativa, se pueden usar dos reactores tanque agitado consecutivos con un filtro en la parte inferior. Se puede usar un tanque de sedimentación o centrífuga entre los dos reactores. El primer reactor puede contener un biocatalizador inmovilizado comprendido por un solo tipo o varios tipos de lipasas. El papel del tanque de sedimentación o la centrífuga entre ambos reactores es eliminar el glicerol formado y el agua en exceso del medio de reacción, conduciendo a un aumento en la conversión de las materias primas en sus ésteres de alquilo de ácidos grasos correspondientes por encima del 98 % en el segundo reactor en un tiempo de reacción razonable. Se describen a continuación algunos sistemas y procedimientos de reacción específicos.

Los términos "mezcla de reacción", "sistema de reacción" y "medio de reacción" se pueden usar en el presente documento como sinónimos.

25 El uso de lipasas inmovilizadas sobre resinas hidrófobas en presencia de una solución tamponada alcalina o agua, como en las realizaciones del procedimiento de invención, asegura una elevada estabilidad de la enzima y también evita la acumulación de sustancias hidrófilas, tal como agua y el subproducto de glicerol formado, sobre el biocatalizador. En todos los aspectos y realizaciones del procedimiento de la invención en el que se usa tampón alcalino o alcalino suave, se usa en más de una solución tamponante alcalina o alcalina suave al 5 %, por ejemplo, pero no de forma limitativa a 5-50 %, 5-45 %, 5-40 %, 5-35 %, 5-30 %, 5-25 %, 5-20 %, 5-15 %, 5-10 %, 5-8 %, tales como pero no de forma limitativa al 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 10 %, 12 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, o 70 %. Los niveles de la solución tamponada alcalina o alcalina suave pueden ser de hasta un 99 % en peso. en todos los aspectos y realizaciones de la invención donde se utilizan agua o una solución acuosa, el agua o la solución acuosa se usan a niveles de más del 5 %, por ejemplo, 5-50 %, 5-50 %, 5-50 %, 5-30 %, 5-30 %, 5-30 %, 5-20 %, 5-20 %, 5-20 %, tal como más del 6 %, 7 %, 8 %, 10 %, 12 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, o 70 %. Los niveles de agua o de solución acuosa en la mezcla de reacción pueden ser de hasta un 99 % en peso. Como se ha mencionado, cuando se usa una solución alcalina, esta puede neutralizar los ácidos normalmente presentes en la fuente de ácidos grasos o los producidos debido a reacciones secundarias. La eliminación activa continua de estos subproductos puede aumentar además la eficacia del procedimiento. El glicerol aislado puede utilizarse industrialmente.

40 La fuente de ácido graso utilizada en el procedimiento de la invención puede comprender al menos uno de aceite de soja, aceite de canola, aceite de algas, aceite de semillas de colza, aceite de oliva, aceite de ricino, aceite de palma, aceite de girasol, aceite de cacahuete, aceite de semillas de algodón, aceite de *Jatropha*, aceite de maíz bruto, aceite de pescado, grasas derivadas de animales, aceite de cocina usado, grasa amarilla, triglicéridos de aceite derivados de fuentes vegetales no comestibles, glicéridos parciales y ácidos grasos libres derivados de aquellos aceites o de cualquier mezcla de al menos dos de los anteriores, en cualquier relación deseada.

45 Se presenta un ejemplo para el uso del aceite bruto como fuente de ácidos grasos en la Fig. 6, donde se usa aceite de soja bruto. Esta figura muestra también el uso de fosfolípidos que contienen aceite, a diversas concentraciones, como la fuente de ácido graso. Se ilustra el uso de una mezcla de ácidos grasos libres con aceite, a modo de ejemplo, en la Fig. 5, donde una mezcla de ácido oleico con aceite, a diversas concentraciones, y también de ácido oleico per se (100 %) sirvió como la fuente de ácido graso.

50 En todos los procedimientos de la invención, los ésteres de alquilo de ácidos grasos de cadena corta formados por la reacción son específicamente ésteres de metilo, etilo, *iso*-propilo o butilo (biodiesel). Otros alcoholes grasos de cadena media (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>) y alcoholes grasos de cadena larga (C<sub>12</sub>-C<sub>22</sub>) pueden utilizarse también en el procedimiento de producción de la presente invención. Estos alcoholes más largos pueden ser específicamente adecuados en la producción de ceras, por ejemplo, para productos cosméticos.

55 Las lipasas pueden ser lipasas derivadas de *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizomucor miehei*, *Mucor miehei*, *Pseudomonas* sp., *Rhizopus* sp., *Mucor javanicus*, *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger*, *Chromobacterium viscosum*, *Acromobacter* sp., *Burkholderia* sp., *Candida antarctica A*, *Candida antarctica B*, *Candida rugosa*, *Alcaligenes* sp., *Penicillium camembertii*, semillas de papaya y pancreatina, pero no están limitados a lo anterior.



Las lipasas pueden inmovilizarse juntas sobre un soporte adecuado, de forma específica un soporte basado en un polímero alifático hidrófobo o un soporte polimérico aromático hidrófobo. Cada una de dichas lipasas puede inmovilizarse sobre un soporte adecuado, en el que los soportes sobre los cuales se inmovilizan son idénticos o diferentes. Las lipasas empleadas pueden ser *regioespecíficas* de su sustrato, o aleatorias. Cuando se usa más de una lipasa, las lipasas pueden inmovilizarse sobre el mismo o en diferentes soportes hidrófobos. Las lipasas coinmovilizadas sobre el mismo soporte pueden presentar selectividades de sustrato idénticas o diferentes o *regioespecificidades* en sus sustratos.

Las lipasas pueden ser *regioespecíficas* (o específicas de sitio), utilizarse cada una sola o en combinación con lipasas de la misma o diferente especificidad de sitio. Cuando se hace referencia a las posiciones sn-1, sn-2 o sn-3, estas son posiciones en la estructura del glicerol de los diversos glicéridos. Por lo tanto, las lipasas usadas en el procedimiento de la invención pueden poseer una selectividad hacia la posición sn-2 mayor que la de las lipasas aleatorias, es decir, su aceptación cataliza la reacción entre el alcohol o el alcohol donante con el grupo acilo graso de la posición sn-2, mientras que las lipasas aleatorias presentan la misma actividad de transesterificación para los grupos acilo grasos en las tres posiciones de la estructura del glicerol. Algunas lipasas presentan únicamente actividad posicional sobre la posición sn-2, especialmente en las condiciones específicas determinadas por los sustratos, productos, etc. Otras lipasas utilizadas en el procedimiento de la invención son las específicas de la posición sn-1,3. Se pueden usar solas o junto con una lipasa aleatoria, específicamente la lipasa que tiene afinidad con los glicéridos parciales, y opcionalmente una tercera lipasa con una elevada afinidad por la posición sn-2.

El soporte es específicamente un soporte hidrófobo poroso y macrorreticular, que pueden ser tanto orgánicos como inorgánicos. Los ejemplos de soportes son soportes inorgánicos porosos, tales como, pero no se limitan a soportes basados en sílice y/o alúmina, y soportes orgánicos hidrófobos tales como, pero no de forma limitativa, soportes poliméricos o basados en polímeros. Los soportes pueden contener opcionalmente grupos funcionales activos seleccionados entre grupos epoxi y/o grupos aldehído, o grupos iónicos.

El soporte insoluble utilizado en los procedimientos de la invención es específicamente un soporte poroso y un soporte basado en un polímero alifático o aromático hidrófobo reticular, tal como AmberliteR XAD 1600 y SepabeadsR SP70 comprendidos ambos por una resina microrreticular porosa preparada a partir de divinilbenceno o a partir de una mezcla de divinilbenceno y poliestireno, AmberliteR XAD 7HP comprendida por un polímero acrílico alifático microrreticular, y un polímero alifático poroso tal como polipropileno poroso (AccureIR).

El soporte puede ser un polímero hidrófobo reticular comprendido por divinilbenceno, o una mezcla de divinilbenceno y estireno, y un polímero alifático hidrófobo reticular comprendido por polímeros acrílicos alifáticos o polialqueno, tal como polipropileno. Los soportes específicos son matrices porosas, de un tamaño de poro en el intervalo de 25-1000 Å, y más específicamente en el intervalo de 80-200 Å. El soporte puede ser también sílice hidrófoba porosa en polvo o granular u otros óxidos inorgánicos. El soporte puede ser también sílice hidrofobizada porosa en polvo o granular u otros óxidos inorgánicos. En realizaciones específicas, el área superficial de las resinas de soporte es mayor de 100 m<sup>2</sup>/g.

La cantidad de solución acuosa alcalina o alcalina suave que se va a suplementar en la reacción de transesterificación/esterificación catalizada por lipasa entre la fuente de ácidos grasos y el alcohol se ajusta generalmente de acuerdo con las otras condiciones de reacción, los materiales de partida, el biocatalizador, etc. Se puede variar esta cantidad, como se enumera e ilustra en el presente documento. Se prepara esta solución alcalina, por ejemplo, a partir de una base o sal alcalina inorgánica o a partir de una base orgánica. Las bases y sales inorgánicas son, por ejemplo, hidróxidos de metales alcalinos, carbonatos, bicarbonatos, fosfatos, sulfatos, acetatos y citratos. Las bases orgánicas pueden ser, por ejemplo, aminas primarias, secundarias o terciarias. Se contemplan también las mezclas de estos agentes alcalinos. En el procedimiento de acuerdo con la invención, el pH del microambiente de la enzima inmovilizada se mantiene a valores alcalinos o alcalinos suaves. La adición del agua destilada al sistema de reacción mejora el rendimiento de las lipasas inmovilizadas sobre un soporte hidrófobo (resinas). Como se ilustra en la Fig. 3, se puede añadir agua incluso en cantidades elevadas, a la vez que se preserva la estabilidad del biocatalizador (enzima inmovilizada), por ejemplo, en un contenido de agua del 30 % en peso, el mismo lote de biocatalizador presentó un 60 % de actividad de conversión tras como mucho 50 ciclos. La adición de diversos tampones alcalinos, con diferentes valores de pH dependiendo del tipo de base utilizado, dio como resultado también la estabilización de las lipasas inmovilizadas sobre soportes hidrófobos (resinas), tal como se muestra, por ejemplo, en las Figs. 1, 2 y 4, que muestran que elevados niveles de soluciones alcalinas acuosas no perjudican la actividad del biocatalizador, con, por ejemplo, aproximadamente de tasas de conversión del 60 %, en el mismo lote de biocatalizador, al 30 % en peso de una solución de bicarbonato de sodio 0,1 M en el sistema de reacción, después de más de como mucho 50 ciclos de la reacción. Sin pretender quedar vinculado por teoría alguna, se necesitan elevadas concentraciones de agua a medida que la enzima puede hidrolizar preferentemente además los enlaces éster en las formas de glicéridos y esterificar consecutivamente los ácidos grasos libres formados con el alcohol suplementado. El agua añadida puede suprimir también la extracción de moléculas de agua esenciales para mantener la configuración catalítica enzimática favorecida. Los tampones de carbonato y bicarbonato son ejemplos de bases suaves que son eficaces para aumentar la estabilidad de las lipasas inmovilizadas sobre soportes hidrófobos. Se describen en el presente documento otras bases adecuadas. La solución alcalina suave como se usa en el presente documento es generalmente una solución con un pH de entre 7 a aproximadamente 11, por ejemplo, 7-8,5, 7-9, 7-9,5, 7-10 o 7-11. En general, la cantidad de solución acuosa

alcalina o alcalina suave utilizada se expresa en porcentajes en peso (% en peso) sobre la base de la cantidad de aceite utilizado en la reacción.

5 El uso de lipasas inmovilizadas sobre soportes basados en polímeros hidrófobos porosos (resinas) en presencia de una solución alcalina o alcalina suave, así como en presencia de agua o soluciones acuosas como se define en el presente documento, en las cantidades enumeradas anteriormente e ilustradas también específicamente, da como resultado la estabilización de la actividad de los biocatalizadores en las reacciones de transesterificación/esterificación entre la fuente de ácidos grasos y el alcohol. Esto se muestra en los siguientes ejemplos.

10 La fuente de ácido graso es al menos una de triglicéridos, glicéridos parciales, ácidos grasos libres, fosfolípidos, ésteres y amidas de ácidos grasos o una mezcla comprendida por al menos dos fuentes de aminoácidos.

La producción de ésteres de alquilo de ácidos grasos se lleva a cabo mediante transesterificación o esterificación, ya sea simultánea o secuencialmente. Bajo dicho sistema de reacción, la actividad del biocatalizador se mantiene sin pérdidas de actividad significativas en múltiples usos y evita también la acumulación de subproductos de glicerol y agua u otros compuestos hidrófilos sobre el biocatalizador.

15 La presente invención proporciona procedimientos que emplean enzimas interfaciales inmovilizadas que retienen una elevada actividad y estabilidad sobre muchos ciclos de producción. Específicamente, se usa la preparación de lipasas y fosfolipasas, en las reacciones de transesterificación/esterificación. Estas reacciones pueden emplearse en la producción de artículos alimentarios, cosméticos y biocombustibles ("biodiesel"). De especial interés, estas enzimas se pueden usar para la síntesis de ésteres de alquilo de ácidos grasos de cadena corta para su uso como "biodiesel".

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

25 En una realización de la invención se proporciona un procedimiento para reacciones de transesterificación/esterificación simultáneas o secuenciales de una fuente de ácido graso con un alcohol utilizando uno o más tipos de lipasas, inmovilizadas sobre un soporte hidrófobo (resina), en presencia de una solución acuosa alcalina o alcalina suave, para obtener el producto deseado, concretamente, ésteres de alquilo de ácidos grasos, aproximándose a completar las conversiones durante un tiempo de reacción razonable, habitualmente por debajo de 5 horas. Una solución alcalina suave, por ejemplo, una solución 0,001 M, 0,1 M, 0,5 M o 1 M de bicarbonato de sodio, puede estar presente en el sistema de reacción en una cantidad de más de un 5 % en peso de la cantidad de aceite utilizada en la reacción, por ejemplo, 6 %, 8 %, 10 %, 12 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 % o 50 % en peso.

35 Como se muestra en los siguientes Ejemplos, el tiempo de vida en funcionamiento de las lipasas puede extenderse también utilizando un soporte de resina hidrófoba para la inmovilización de la lipasa en combinación con el uso de una solución tamponada alcalina o alcalina suave, en los diversos niveles e intervalos y subintervalos de concentraciones enumeradas e ilustradas en el presente documento, en el medio de reacción de transesterificación/esterificación. Como se muestra además en los siguientes Ejemplos, el contenido de agua de la mezcla de reacción puede aumentarse con respecto al valor del pH. Por lo tanto, en otra realización, la estabilidad del biocatalizador aumenta con el aumento en el contenido del agua del sistema de reacción añadiendo agua, en los diversos niveles e intervalos y subintervalos de concentraciones enumerados e ilustrados en el presente documento. Los resultados muestran que la adición de una solución alcalina (Figs. 1, 2, 4) o agua (Fig. 3) da como resultado el mantenimiento de la actividad y estabilidad enzimática durante muchos ciclos de la reacción.

45 El alcohol o donante de alcohol empleado en los procedimientos de la invención puede ser un alcohol de alquilo de cadena corta, específicamente alcohol de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, más específicamente alcohol de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, y particularmente metanol o etanol o el alcohol donante puede ser monoalquil éster o carbonato de dialquilo, tal como carbonato de dimetilo. Un donante de alcohol tal como por ejemplo carbonato de dialquilo puede servir como una fuente para la alcalinidad o alcalinidad suave del sistema de reacción.

50 Se describe también en el presente documento un sistema para la producción de ésteres de alquilo de ácidos grasos. Con referencia a la Fig. 9, un primer ejemplo de dicho sistema, designado generalmente con la referencia numérica **100**, comprende un recipiente reactor **120**, un recipiente de preparación prerreacción **140**, y un recipiente de separación del producto **160**. El recipiente de preparación prerreacción 140 se configura para recibir materiales de alimentación y tampón (y/u agua), para formar una emulsión adecuada a partir del anterior, y para alimentar la emulsión preparada PE (denominada también en el presente documento alimento emulsionado) al recipiente del reactor 120. En particular, dichos materiales de alimentación puede incluir ácidos grasos FA (por ejemplo, aceite de cocina usado) a partir de una fuente de ácido graso 182 y alcohol AL (por ejemplo, metanol) a partir de una fuente de alcohol 184, y tampón (y/o agua) BU a partir de una fuente de solución acuosa de tampón 186, proporcionada a través de líneas de suministro adecuadas 152, 154, 156, respectivamente, en comunicación de fluidos con dicho recipiente de preparación prerreacción 140 mediante las entradas de recipientes 172, 174, 176, respectivamente y

las válvulas adecuadas (no se muestran).

El recipiente de preparación de prereacción 140 define un volumen interno V1 en el que la mezcla de reacción, incluyendo los materiales de alimentación y la solución acuosa de tampón, proporcionada en el anterior mediante entradas del recipiente 172, 174, 176, se mezclan juntos por medio de un sistema de agitación adecuado 142, impulsado por una fuente de energía (no se muestra), para formar la emulsión de PE. El recipiente de preparación de la prereacción 140 comprende una camisa externa 149 a través de la cual puede hacerse circular un fluido de trabajo adecuado para mantener el volumen V1 en una temperatura en estado estacionario deseada. Por ejemplo, el fluido de trabajo puede ser aceite o agua, calentado o enfriado en un recipiente diferente (no se muestra) y bombeado a través de la camisa 149 mediante puertos de entrada y salida adecuados (no se muestran). En variaciones alternativas de este ejemplo, el recipiente de preparación prereacción 140 puede comprender un sistema de elementos de calentamiento y/o enfriamiento, por ejemplo, elementos de calentamiento y/o enfriamiento alimentados eléctricamente, en vez de o además de la camisa 149.

El recipiente reactor 120 se configura para recibir la emulsión preparada PE a partir de un recipiente de preparación prereacción 140, para hacer reaccionar los materiales de alimentación en presencia de un biocatalizador BC adecuado para producir productos de reacción RP, y para alimentar los productos de reacción RP a partir de la mezcla de reacción al recipiente de preparación del producto 160. Una línea de salida 148 proporciona una comunicación de fluidos selectiva entre el recipiente de preparación prereacción 140 y el recipiente reactor 120 mediante válvulas adecuadas (no se muestran) y permite que la emulsión preparada PE se prepare mediante el recipiente de preparación prereacción 140 que se va a alimentar al recipiente reactor 120 según se desee.

El recipiente de reacción 120 define un volumen interno V2 en el que la emulsión preparada PE en la mezcla de reacción, proporcionada en el anterior mediante entradas del recipiente 122, se hace reaccionar, y la mezcla de reacción puede agitarse por medio de un sistema de agitación adecuado 124, impulsado por una fuente de energía (no se muestra) para formar los productos de reacción RP. El biocatalizador BC puede comprender una enzima adecuada y se proporciona en la forma de perlas de enzimas inmovilizadas que permanecen en el recipiente reactor 120 hasta que llegan a ser ineficaces o no son suficientemente eficaces, después de lo cual se pueden eliminar y sustituir con un nuevo biocatalizador BC. Por ejemplo, el biocatalizador BC puede comprender una lipasa derivada de Thermomyces lanuginosus inmovilizada sobre una resina basada en poliestireno-divinilbenceno porosa e hidrófoba.

El recipiente reactor 120 comprende un sistema de regulación térmica en la forma de una camisa externa 129 mediante la cual se puede hacer circular un fluido de trabajo adecuado para mantener el volumen V2 a una temperatura en estado estacionario deseada. Por ejemplo, el fluido de trabajo puede ser aceite o agua, calentado o enfriado en un recipiente diferente (no se muestra) y bombeado a través de la camisa 129 mediante puertos de entrada y salida adecuados 123. En variaciones alternativas de este ejemplo, el sistema de regulación térmica comprende un sistema de elementos de calentamiento y/o enfriamiento, por ejemplo, elementos de calentamiento y/o enfriamiento alimentados eléctricamente, en vez de o además de la camisa 129.

La parte inferior del recipiente reactor 120 comprende una salida 127, y se proporciona un dispositivo de retención adecuado en la forma de filtro 125 anteriormente de la salida 127 configurada para, filtrar la mezcla de reacción. En particular los productos de reacción RP antes de eliminarse del recipiente reactor 120, y para prevenir que se elimine el biocatalizador BC con los productos de reacción RP.

El recipiente de separación del producto 160 se configura para separarlo, a partir de los productos de reacción RP, el producto P deseado (éster de alquilo de ácido graso) a partir de subproductos que incluyen agua en exceso y glicerol G. La línea de salida 147 proporciona comunicación de fluidos selectiva entre el recipiente de separación del producto 160 y el recipiente reactor 120 mediante válvulas adecuadas (no se muestra) y permite a los productos de reacción RP alimentarse al recipiente de separación de producto 160 a partir del recipiente reactor 120 según se desea. En este ejemplo, el recipiente de separación del producto 160 comprende un sistema de separación por centrífuga o gravedad para llevar a cabo la separación anteriormente mencionada, e incluye una primera salida 162 para hacer salir el producto P, y una segunda salida 164 para recoger el agua en exceso y el glicerol G. El producto P puede recogerse mediante el tapón 163.

El sistema puede hacerse funcionar de esta manera en un modo de producción continuo, en el que la emulsión preparada PE se alimenta en el recipiente reactor 120 y el producto deseado P se recoge de una manera continua mediante el tapón 163. La emulsión PE puede prepararse y administrarse de una manera continua en el recipiente reactor 120 para hacer que aumente el volumen de reactivo en el anterior a la misma velocidad que los productos de reacción RP que se eliminan de la salida 127. Como alternativa, puede prepararse la emulsión PE y administrarse en lotes al recipiente reactor 120 para hacer que aumente el volumen de reactivo en la mezcla de reacción a intervalos discretos por lo cual, el nivel de reactivos en el recipiente 120 disminuye a un nivel mínimo concreto tras la eliminación continua de los productos de reacción RP mediante la salida 127. Por supuesto, es también posible hacer funcionar el sistema 100 para proporcionar el producto deseado P en lotes más bien que continuamente.

Como alternativa, el sistema 100 se puede hacer funcionar en un modo de rendimiento potenciado, en el que el producto P es, en vez de recogerse de forma inmediata mediante el tapón 163, redirigirse al recipiente reactor 120

mediante un sistema de redireccionamiento opcional, incluyendo la línea **165**, entrada del recipiente **121** y válvula **166**, en el que la válvula **166** puede hacerse funcionar selectivamente para desviar el producto **P** del tapón **163**. Cuando se redirigen al recipiente reactor **120**, el producto **P** puede hacerse reaccionar además con el anterior con el alcohol **AL**, proporcionado mediante una línea separada (no se muestra) a partir de la fuente **184**, a partir de una fuente de alcohol diferente (no se muestra), o a partir de una fuente **184** en el recipiente de preparación prerreacción **140**, para producir un rendimiento mayor del producto **P**, que se puede separar de nuevo a partir de los subproductos utilizando el recipiente de separación de producto **160**. Cuando se proporciona el alcohol mediante el recipiente de preparación **140**, el último se vacía en primer lugar de la emulsión preparada **PE**, y las válvulas adecuadas evitan los ácidos grasos **FA** y opcionalmente se proporciona un tampón acuoso por las fuentes respectivas **182** y **186**. Se pueden proporcionar bombas adecuadas o alimentaciones por gravedad para transportar selectivamente los materiales respectivos a través de las líneas respectivas **152**, **154**, **156**, **148**, **147**, **165**, y monitores controladores adecuados (no se muestra) y controles de funcionamiento del sistema.

En al menos algunas variaciones alternativas del primer ejemplo, el recipiente de preparación prerreacción **140** puede ser integral con el recipiente reactor **120**. Por ejemplo, los respectivos volúmenes internos **V1** y **V2** pueden separarse por una pared que tiene una disposición abierta que corresponde a la línea **148**. Como alternativa, los respectivos volúmenes internos **V1** y **V2** pueden ser contiguos, pero el volumen interno **V1** está suficientemente separado del biocatalizador **BC** para proporcionar un tiempo suficiente para que se forme la emulsión **PE** antes de alcanzar el biocatalizador **BC**.

En variaciones alternativas del primer ejemplo, se pueden proporcionar uno, dos o todos los ácidos grasos **FA**, el alcohol **AL**, y el tampón acuoso **BU** directamente al recipiente reactor **120**, derivando el recipiente de preparación prerreacción **140**. Por ejemplo, uno o más de la fuente de ácido graso **182**, la fuente de alcohol **184**, y la fuente de tampón acuoso **186**, pueden estar en comunicación de fluidos directamente con el recipiente reactor **120** mediante líneas de suministro adecuadas (no se muestran) derivando el recipiente de preparación prerreacción **140**.

Se aprecia que todos los componentes del sistema **100** de acuerdo con el primer ejemplo, o sus variaciones alternativas, son de una forma adecuada y se preparan a partir de materiales adecuados como se conoce en la materia, tales como para permitir que cada componente lleve a cabo las funciones respectivas en las condiciones respectivas, que incluyen la temperatura, presión, pH y así sucesivamente.

Con referencia a la Fig. 10, un segundo ejemplo del sistema, designado con la referencia número 200, comprende todos los elementos y características del primer ejemplo, incluyendo sus variaciones alternativas, incluyendo todos los componentes numerados de forma similar como en la Fig. 9, *mutatis mutandis*, con algunas diferencias. Por ejemplo, el sistema **200** comprende también: un recipiente reactor **120**, un recipiente de preparación prerreacción **140**, un recipiente de separación del producto **160**, una fuente de ácidos grasos **182**, la fuente de alcohol **184**, una fuente de una solución acuosa de tampón **186**, líneas de suministro **152**, **154**, **156**, entradas del recipiente **172**, **174**, **176**, sistema de agitación **142**, camisa externa **149**, línea de salida **148** entrada del recipiente **122**, sistema de agitación **124**, biocatalizador **BC** camisa externa **129**, puertos de entrada y salida **123**, salida **127**, filtro **125**, línea de salida **147** primera salida **162** segunda salida **164**; como se divulga en el primer ejemplo, *mutatis mutandis*.

Sin embargo, en el segundo ejemplo, se omiten la línea **165**, el tapón **163** y la válvula **166** del primer ejemplo y en vez de que se conecte un módulo de reactor auxiliar 300 a la primera salida **162** del recipiente de separación del producto **160**.

El módulo del reactor auxiliar **300** comprende un recipiente de reactor auxiliar **220** y un recipiente de separación del producto auxiliar **260**, que en este ejemplo son sustancialmente similares al recipiente reactor **120** y al recipiente de separación de producto **160**, *mutatis mutandis*. En funcionamiento, el producto deseado **P** procedente del recipiente de separación de producto **160** se dirige al recipiente reactor auxiliar **220** mediante la línea **266**, la válvula **267** y la entrada del recipiente **221**. Cuando se dirige al recipiente reactor **220**, el producto **P** puede hacerse reaccionar además con el anterior con el alcohol **AL**, proporcionado mediante una línea separada (no se muestra) a partir de una fuente **184** o a partir de una fuente de alcohol diferente (no se muestra), para producir adicionalmente productos reaccionados **FRP**. La línea **249** permite a los productos reaccionados **FRP** adicionales transportarse al recipiente de separación de producto auxiliar **260**, que funciona a continuación para separar un rendimiento mayor del producto **P** en subproductos.

El sistema 200 puede hacerse funcionar de una manera similar a la del sistema **100**, *mutatis mutandis*.

Debe destacarse que, como se usa en esta memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen las referencias plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa.

A lo largo de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones que siguen, a no ser que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que la palabra "comprende", o sus variaciones tales como "comprenden" y "que comprende", implica la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros indicados, pero no la exclusión de cualquier otro entero o etapa o grupo de enteros o etapas.

## Ejemplos

### General

5 Todos los experimentos se llevaron a cabo tanto en tubos de vidrio de 30 ml de volumen con fondo con un filtro de vidrio centrado o en reactores agitados mecánicamente de 500 ml de volumen con fondo con un filtro de vidrio sinterizado de porosidad de 150-250 mm. El medio de reacción típico contenía una fuente de ácido graso, alcohol, normalmente, metanol o etanol en una base molar 1:1 en relación con el ácido graso independientemente libre o unido a una estructura de glicerol (para los ácidos grasos y monoglicéridos libres 1:1, para los diglicéridos 1:2 y para los triglicéridos 1:3 en favor del alcohol). La fuente de ácido graso se premezcló con diferentes cantidades de tampón alcalino, bicarbonato de sodio en realizaciones específicas. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de lipasa inmovilizada sobre una resina hidrófoba (10-15 % en peso) y el medio de reacción se sacudió tanto mecánicamente como se agitó a 30 °C. La cantidad de alcohol se añadió igualmente en tres etapas con una hora de separación entre las mismas, salvo que se indique otra cosa. Se siguieron las conversiones de la reacción tomando muestras procedentes del medio de reacción en intervalos de tiempo diferentes y analizando los componentes de los ácidos grasos. La conversión en biodiesel se calculó como: 100\* del área máxima de la suma de ésteres de alquilo de ácidos grasos de todas las áreas máximas.

10 Inmovilización de las lipasas Se inmovilizaron las lipasas siguiendo procedimientos normalizados donde la lipasa derivada de un determinado microorganismo se solubiliza en solución tampón 0,1 M a un determinado valor de pH, por ejemplo 7,5. Una resina de polímero orgánico o inorgánico se introdujo en la solución de lipasa. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 8 horas. Se añadió opcionalmente acetona fría a la mezcla a fin de aumentar la precipitación enzimática de proteínas sobre la resina. La mezcla se filtró y las perlas de enzimas se secaron para reducir el contenido de agua a menos del 5 %.

20 Se utilizaron diferentes resinas incluyendo resinas de polímeros hidrófobos basadas en poliestireno/divinilbenceno, parafina o cualquiera de sus combinaciones, para obtener resinas de características hidrófobas. Las resinas hidrófobas típicas utilizadas incluyeron AmberliteR XAD 1600 (Rohm & Haas, EE.UU.) y SepabeadsR SP70 (Resindion, Italia). Las resinas hidrófilas típicas utilizadas incluyeron DuoliteR D568 (Rohm & Haas) y gel de sílice poroso. Se pueden inmovilizar lipasas por separado sobre una resina o diferentes lipasas se coinmovilizan sobre la misma resina.

### Ejemplo 1

30 A. La conversión del aceite de soja en biodiesel y glicerol después de 6 horas de reacción utilizando el mismo lote de biocatalizador en múltiples lotes experimentales.

*Condiciones de reacción:* Aceite de soja refinado y decolorado (20 g) que contenía diferentes concentraciones de solución de bicarbonato de sodio 0,1 M. Se añadió metanol (2,5 ml) en una etapa. Se usó lipasa derivada de *Thermomyces lanuginosus* inmovilizada sobre una resina basada en poliestireno-divinilbenceno hidrófoba y porosa, (10 % en peso). El medio de reacción se agitó a 300 rpm y 30 °C. En la Fig. 1 se muestran los resultados.

35 B. La conversión del aceite de soja en biodiesel y glicerol después de 6 horas de reacción utilizando el mismo lote de biocatalizador en múltiples lotes experimentales. *Condiciones de reacción:* Aceite de soja refinado y decolorado (20 g) que contenía diferentes concentraciones de solución de bicarbonato de sodio 0,1 M. Se añadió metanol (2,5 ml) en una etapa. Se usó lipasa derivada de *Pseudomonas sp.* inmovilizada sobre una resina porosa basada en poliestireno-divinilbenceno, (10 % en peso). El medio de reacción se agitó a 300 rpm y 30 °C. En la Fig. 2 se muestran los resultados.

40 Las Figs. 1 y 2 muestran que la cantidad de bicarbonato de sodio en el medio de reacción tiene un papel principal sobre la vida operativa de las lipasas *Thermomyces lanuginosus* y *Pseudomonas sp.* inmovilizadas sobre resinas hidrófobas. Esto se puede observar en las Figs. 1 y 2, que en ausencia de una solución alcalina suave, ambas lipasas inmovilizadas perdieron drásticamente su actividad tras unos pocos ciclos, mientras que las mismas lipasas inmovilizadas mantuvieron su actividad de transesterificación sobre múltiples usos en presencia de una solución de bicarbonato de sodio como una base en el sistema de reacción. Los resultados de ambas enzimas inmovilizadas muestran que aumentando la cantidad de solución de bicarbonato de sodio en el medio de reacción en el intervalo de 0 - 30 % en peso da como resultado una actividad de transesterificación de la enzima aumentada en múltiples usos del mismo lote de enzima inmovilizada. Aumentar la cantidad de solución de bicarbonato de sodio en más de un 30 % en peso conduce a disminuir la actividad de la enzima. Sin pretender quedar vinculado por teoría alguna, esta disminución puede probablemente atribuirse al lavado de la enzima procedente de la resina.

### Ejemplo 2

La conversión del aceite de soja en biodiesel y glicerol después de 6 horas de reacción utilizando el mismo lote de biocatalizador en múltiples lotes experimentales.

55 *Condiciones de reacción:* Aceite de soja refinado y decolorado (20 g) que contenía diferentes concentraciones de agua destilada. Se añadió metanol (2,5 ml) en una etapa. Se utilizó lipasa derivada de *Thermomyces lanuginosus*

inmovilizada sobre una resina basada en poliestireno-divinilbenceno porosa e hidrófoba. (10 % en peso). El medio de reacción se agitó a 300 rpm y 30 °C. En la Fig. 3 se muestran los resultados.

La Fig. 3 muestra que la cantidad de agua en el medio de reacción tiene un papel principal sobre la vida operativa de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* inmovilizada sobre resinas hidrófobas. Se puede observar en la Fig. 3 que en ausencia de agua, la lipasa inmovilizada pierde drásticamente su actividad después de unos pocos ciclos, mientras que la misma lipasa inmovilizada mantiene su actividad de transesterificación sobre múltiples usos en presencia de agua en el sistema de reacción. Los resultados para la enzima inmovilizada muestran que aumentar la cantidad de agua en el medio de reacción en el intervalo de 0 - 30 % da como resultado una actividad aumentada de transesterificación de la enzima en múltiples usos del mismo lote de la enzima inmovilizada, aumentando a la vez la cantidad de agua por encima del 30 % en peso, condujo a disminuir la actividad enzimática.

### Ejemplo 3

La conversión del aceite de soja en biodiesel y agua después de 6 horas de reacción utilizando el mismo lote de biocatalizador en múltiples lotes experimentales.

*Condiciones de reacción:* Aceite de soja refinado y decolorado (20 g) que contiene diferentes concentraciones de solución de bicarbonato de sodio 0,1 M. Se añadió metanol (2,5 ml) en una etapa. Se usó lipasa derivada de *Thermomyces lanuginosus* inmovilizada sobre una resina basada en poliestireno-divinilbenceno hidrófoba y porosa, (10 % en peso). El medio de reacción se agitó a 300 rpm y 30 °C. En la Fig. 4 se muestran los resultados.

La Fig. 4 muestra que la concentración de la solución de bicarbonato de sodio en el medio de reacción tiene un papel principal en la determinación de la actividad de esterificación de *Thermomyces lanuginosus* inmovilizada sobre una resina basada en poliestireno-divinilbenceno porosa e hidrófoba. Se puede observar en la Fig. 4 que en ausencia de agua en el sistema de reacción la lipasa inmovilizada sobre resina hidrófoba pierde su actividad bruscamente cuando se usa en múltiples lotes experimentales. Aumentar la concentración de la solución de bicarbonato de sodio en el intervalo de 0-205 en peso dio como resultado un aumento en la actividad de esterificación del biocatalizador en múltiples usos. Aumentar la cantidad de fase acuosa por encima del 30 % en peso dio como resultado la pérdida de actividad de la enzima en múltiples usos, debido con mayor probabilidad al lavado de la enzima a partir de la resina

### Ejemplo 4

La conversión de mezclas de triglicéridos de ácido oleico y aceite de soja en biodiesel, glicerol y agua después de 6 horas de reacción utilizando el mismo lote de biocatalizador en múltiples lotes experimentales.

*Condiciones de reacción:* Aceite de soja refinado y decolorado conteniendo diferentes concentraciones de ácido oleico (20 g) se suplementó con 8 % en peso de solución de bicarbonato de sodio 0,1 M. Se añadió metanol (2,5 ml) en una etapa. Se usó lipasa derivada de *Thermomyces lanuginosus* inmovilizada sobre una resina basada en poliestireno-divinilbenceno hidrófoba y porosa, (10 % en peso). El medio de reacción se agitó a 300 rpm y 30 °C. En la Fig. 5 se muestran los resultados.

La Fig. 5 muestra que la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* inmovilizada sobre una resina de lipasa hidrófoba y porosa y en presencia de una solución tampón es capaz de esterificar y transesterificar los ácidos grasos libres, y los glicéridos para formar biodiesel y subproductos de glicerol y agua. Los resultados muestran también que las lipasas inmovilizadas mantienen su actividad catalítica sin pérdidas significativas de actividad en múltiples usos del mismo lote de biocatalizador durante 50 ciclos.

### Ejemplo 5

La conversión de los aceites brutos que contienen fosfolípidos en biodiesel y glicerol después de 6 horas de reacción utilizando el mismo lote de biocatalizador en múltiples lotes experimentales.

*Condiciones de reacción:* El aceite de soja bruto que contiene diferentes concentraciones de fosfolípidos (20 g) se suplementó con 8 % en peso de solución de bicarbonato de sodio 0,1 M. Se añadió metanol (2,5 ml) en una etapa. Se utilizó lipasa derivada de *Thermomyces lanuginosus* inmovilizada sobre una resina basada en poliestireno-divinilbenceno porosa e hidrófoba. (10 % en peso). El medio de reacción se agitó a 300 rpm y 30 °C. En la Fig. 6 se muestran los resultados.

La Fig. 6 muestra la actividad de transesterificación de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* inmovilizada sobre una resina de divinilbenceno-poliestireno porosa e hidrófoba. Los análisis de los resultados en contraste con los informes de bibliografía previos de las lipasas inmovilizadas sobre resinas hidrófobas en presencia de una solución de bicarbonato de sodio son capaces de transesterificar glicéridos incluyendo fosfolípidos para dar como resultado biodiesel, y los subproductos de glicerol y glicerofosfolípidos. Asimismo, los resultados muestran que las lipasas mantienen su actividad catalítica de transesterificación cuando el mismo lote de enzima inmovilizada se usa en múltiples etapas.

**Ejemplo 6**

A. La conversión de aceite de soja en biodiesel y glicerol utilizando el mismo lote de biocatalizador (*Thermomyces lanuginosus* (TL) inmovilizado sobre un soporte de DVB-PS) en múltiples lotes experimentales a diferentes valores de pH para una solución de bicarbonato de sodio 0,1 M.

5 *Condiciones de reacción:* Aceite de soja refinado y decolorado (20 g) que contenía 8 % en peso de solución de bicarbonato de sodio 0,1 M a diferentes valores de pH. Se añadió metanol (2,5 ml) en una etapa. Se usó lipasa derivada de *Thermomyces lanuginosus* inmovilizada sobre una resina basada en poliestireno-divinilbenceno hidrófoba y porosa, (10 % en peso). El medio de reacción se agitó a 300 rpm y 30 °C. En la Fig. 7 se muestran los resultados.

10 B. La conversión de aceite de soja en biodiesel y glicerol utilizando el mismo lote de biocatalizador (*Thermomyces lanuginosus* (TL) inmovilizado sobre un soporte de DVB-PS) en múltiples lotes experimentales a diferentes valores de pH para una solución de acetato de sodio 0,1 M.

15 *Condiciones de reacción:* Aceite de soja refinado y decolorado (20 g) que contenía 8 % en peso de solución de acetato de sodio 0,1 M a diferentes valores de pH. Se añadió metanol (2,5 ml) en una etapa. Se usó lipasa derivada de *Thermomyces lanuginosus* inmovilizada sobre una resina basada en poliestireno-divinilbenceno hidrófoba y porosa, (10 % en peso). El medio de reacción se agitó a 300 rpm y 30 °C. En la Fig. 8 se muestran los resultados.

20 Los resultados presentados en la Fig. 7 muestran que, a valores de pH por encima de 5,5, el biocatalizador ha retenido más del 60 % de su actividad de transesterificación inicial después de 50 ciclos utilizando el mismo lote de enzima. Los resultados muestran claramente que existía una disminución lineal en la actividad enzimática a un valor de pH de 5,5 y la actividad enzimática alcanzada fue de un 20 % por debajo de la actividad enzimática inicial.

Se han observado rasgos similares cuando se utilizó el tampón acetato a valores de pH por encima de 6,5 cuando la enzima ha retenido más de un 50 % de su actividad inicial después de 50 usos repetidos (Fig. 8). Los resultados presentados en la Fig. 8 muestran también que cuando se usó la solución de acetato de sodio de pH 5,5, la actividad enzimática era baja y se mantuvo sin embargo constante después de 50 ciclos de uso repetido.

25

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la transesterificación/esterificación de una fuente de ácido graso con un alcohol, para formar ésteres de alquilo de ácidos grasos, que comprende
- 5 (A) hacer reaccionar una fuente de ácido graso y un alcohol o un donante de alcohol en presencia de una preparación de lipasa inmovilizada, en el que la preparación de lipasa inmovilizada comprende al menos una lipasa inmovilizada sobre un soporte poroso hidrófobo y el medio de reacción contiene una solución acuosa de tampón alcalino en más de un 5 % en peso de la fuente de ácido graso; o
- 10 (B) hacer reaccionar una fuente de ácido graso y un alcohol o un donante de alcohol en presencia de una preparación de lipasa inmovilizada, en el que la preparación de lipasa inmovilizada comprende al menos una lipasa inmovilizada sobre un soporte poroso hidrófobo y el medio de reacción contiene agua en más de un 5 % en peso de la fuente de ácido graso.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende (A) y la solución acuosa de tampón tiene un pH de 7 a 11.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende (A) y la cantidad de dicha solución de tampón alcalino en el medio de reacción es de más del 5 % en peso y de hasta el 99 % en peso de la fuente de ácido graso.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende (B) y el agua está en la forma de una solución acuosa de sales disueltas y el pH del sistema de reacción o de la solución acuosa es de 3 a 11.
- 20 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende (B) o el procedimiento de la reivindicación 4, en el que el medio de reacción contiene el agua o la solución acuosa de sales disueltas en más de un 5 % en peso y hasta un 99 % en peso de la fuente de ácidos grasos.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho alcohol es un alcohol de alquilo C1-C6 de cadena corta, y dicho donante de alcohol es un monoalquil éster, o un carbonato de dialquilo, que
- 25 sirve también como una fuente de reactivo moderadamente alcalino en el medio de reacción.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha al menos una lipasa es una lipasa derivada de una cualquiera de *Rhizomucor miehei*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus niveus*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium camembertii*, *Alcaligenes sp.*, *Acromobacter sp.*, *Burkholderia sp.*, *Thermomyces lanuginosus*, *Chromobacterium viscosum*, *Candida antarctica B*, *Candida rugosa*, *Candida antarctica*
- 30 A, semillas de papaya y pancreatina.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha al menos una lipasa inmovilizada es capaz de catalizar la esterificación de los ácidos grasos libres para dar como resultado ésteres de alquilo de ácidos grasos y agua como subproductos, y la transesterificación de triglicéridos y glicéridos parciales para dar como resultado ésteres de alquilo de ácidos grasos y glicerol como subproductos.
- 35 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha preparación de lipasa comprende al menos dos lipasas.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho soporte puede ser uno cualquiera de entre un soporte basado en un polímero alifático hidrófobo y un soporte basado en un polímero aromático hidrófobo.
- 40 11. El procedimiento de la reivindicación 1 a 6, en el que dicha solución acuosa de tampón alcalino es una solución de una base débil seleccionada entre bicarbonatos y carbonatos de sodio o potasio.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que dicha fuente de ácido graso es uno cualquiera de un aceite vegetal, grasas animales, aceite de algas, aceite de pescado, aceites residuales y cualquier mezcla de los anteriores.
- 45 13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que dicha fuente de ácido graso comprende ácidos grasos libres, monoglicéridos, diglicéridos o triglicéridos, sus mezclas en cualquier relación, en ausencia o presencia de otros derivados de ácidos grasos menores, tales como fosfolípidos y ésteres de esteroides, en el que dicha fuente de ácido graso es sin refinar, refinada, decolorada, desodorizada o cualquiera de sus combinaciones.
- 50 14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho alcohol es metanol y dichos ésteres de ácidos grasos resultantes son ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME - biodiesel) o dicho alcohol es un alcohol graso de cadena intermedia (C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>) o un alcohol graso de cadena larga (C<sub>12</sub>-C<sub>22</sub>).



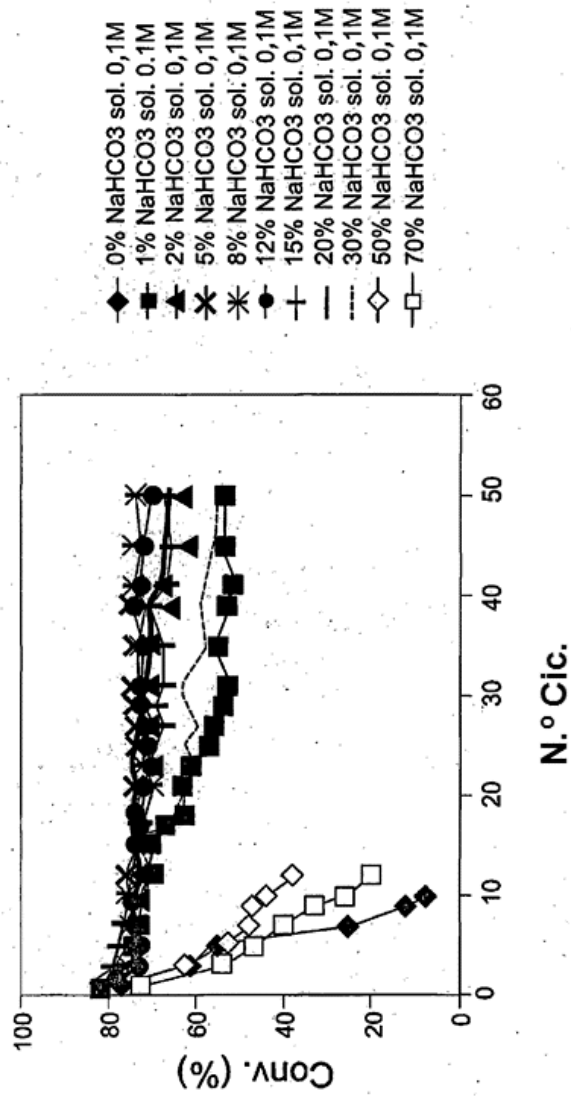


Fig. 1

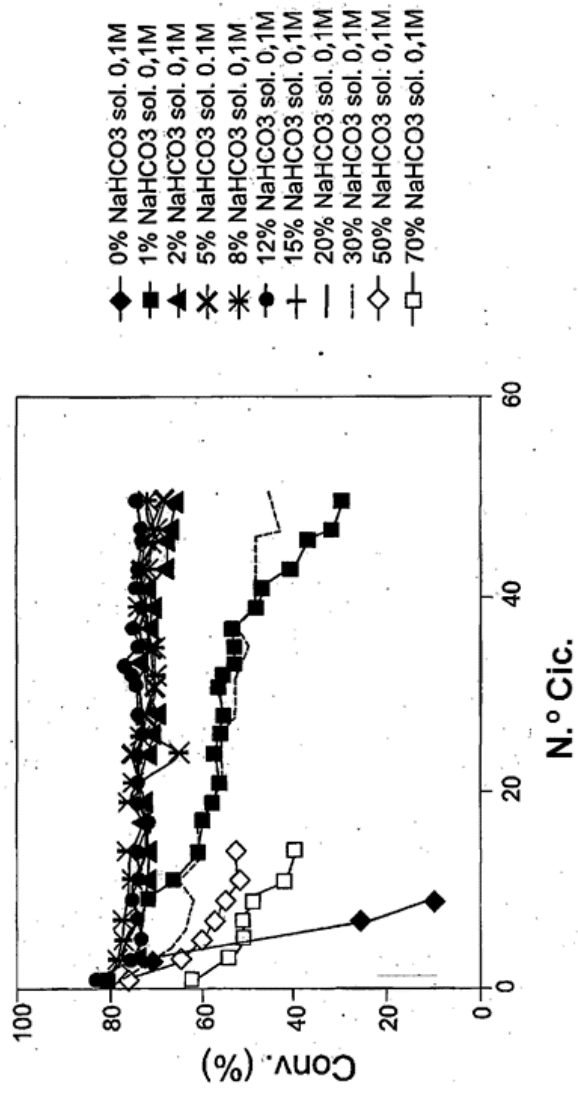


Fig. 2

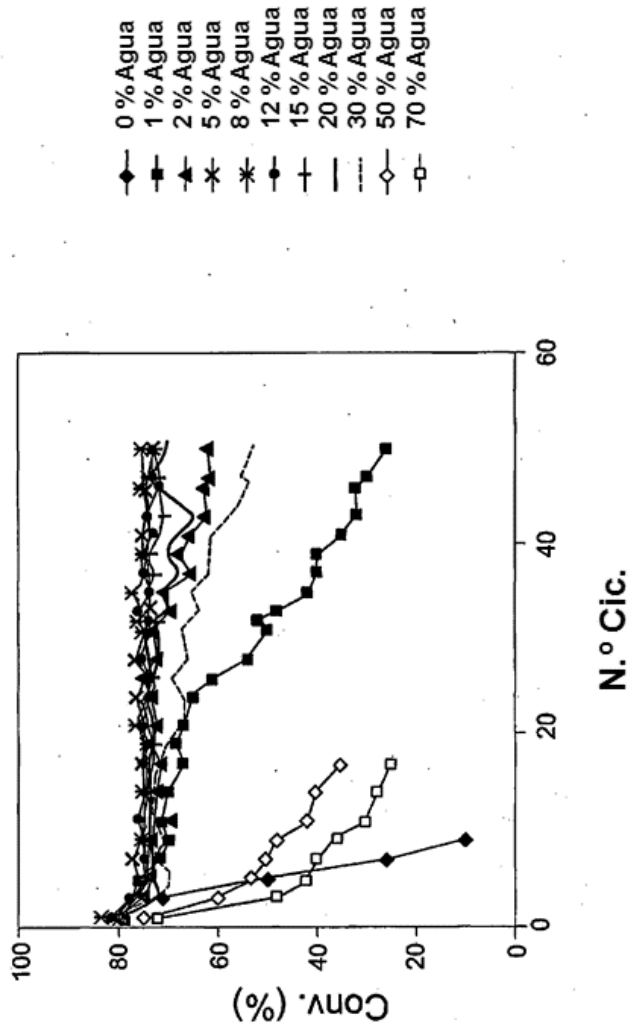


Fig. 3

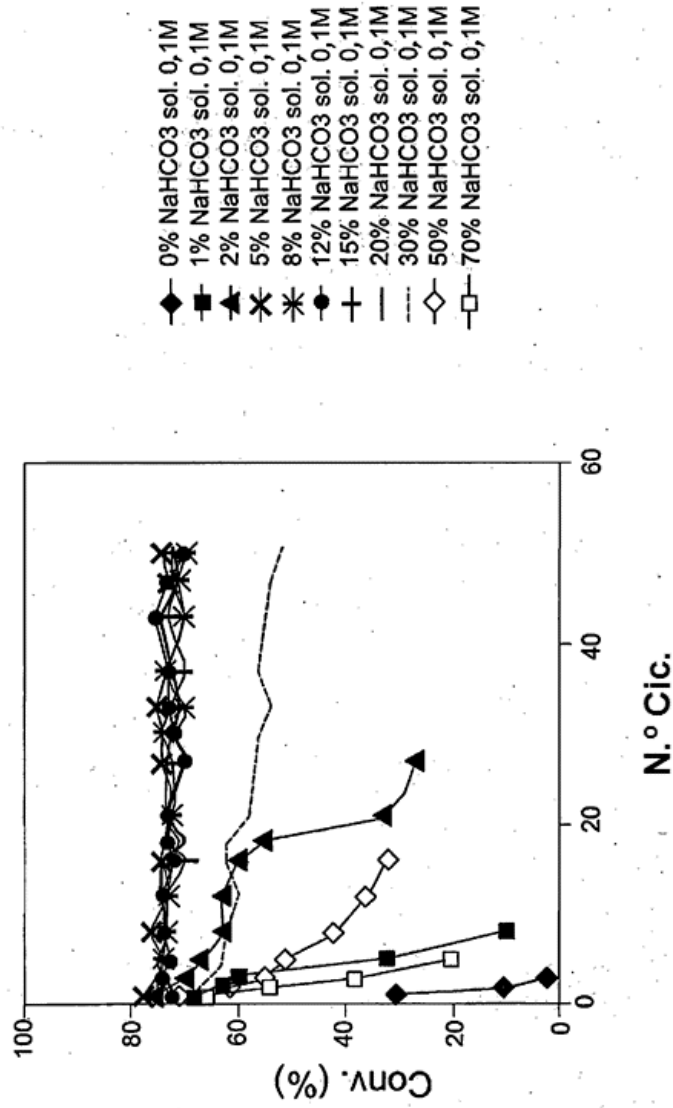


Fig. 4

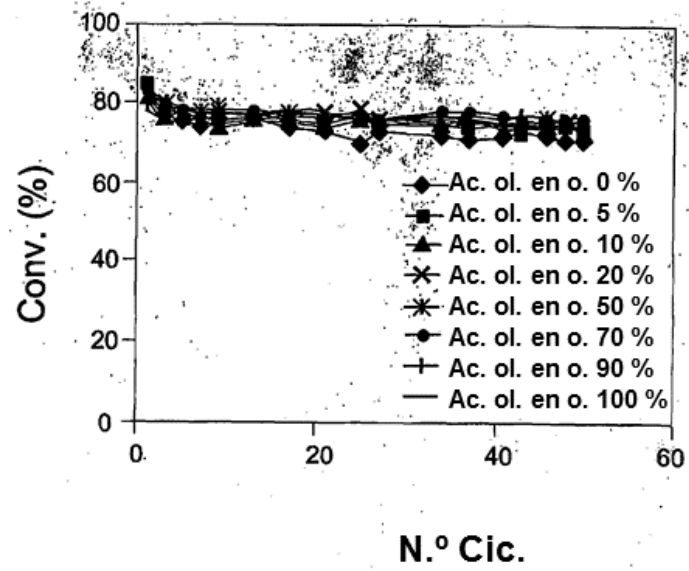


Figura 5

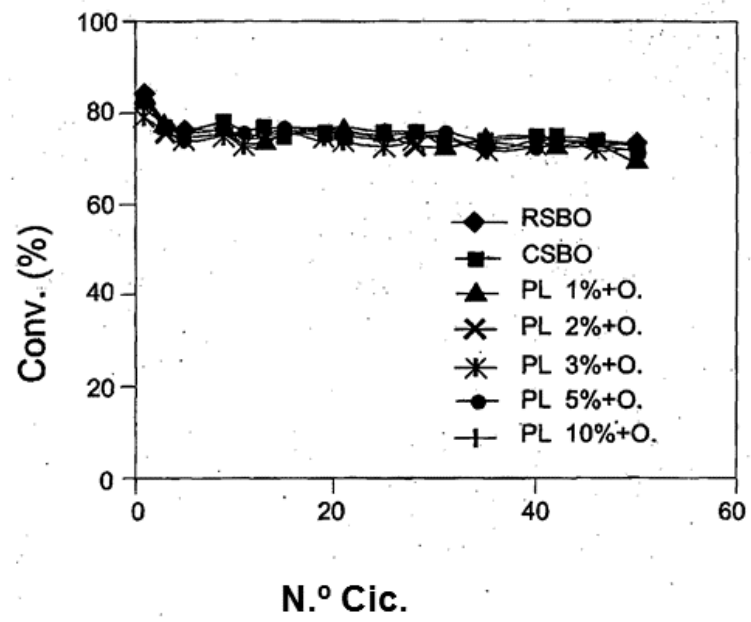


Figura 6

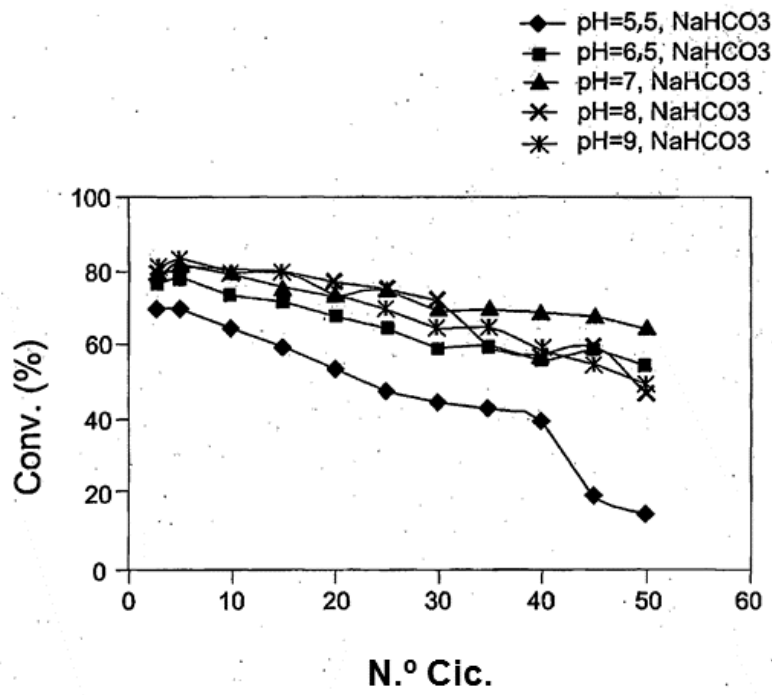


Figura 7.

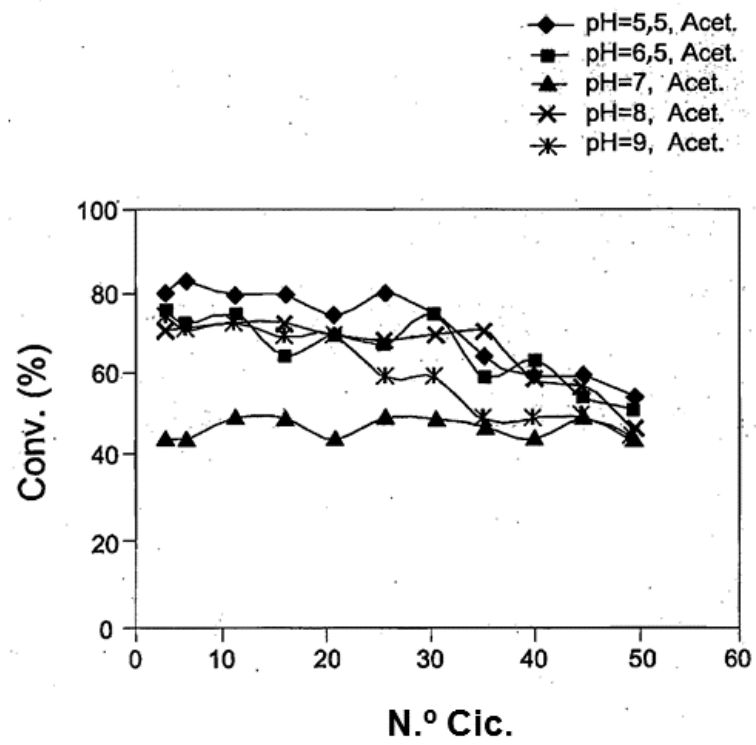


Figura 8



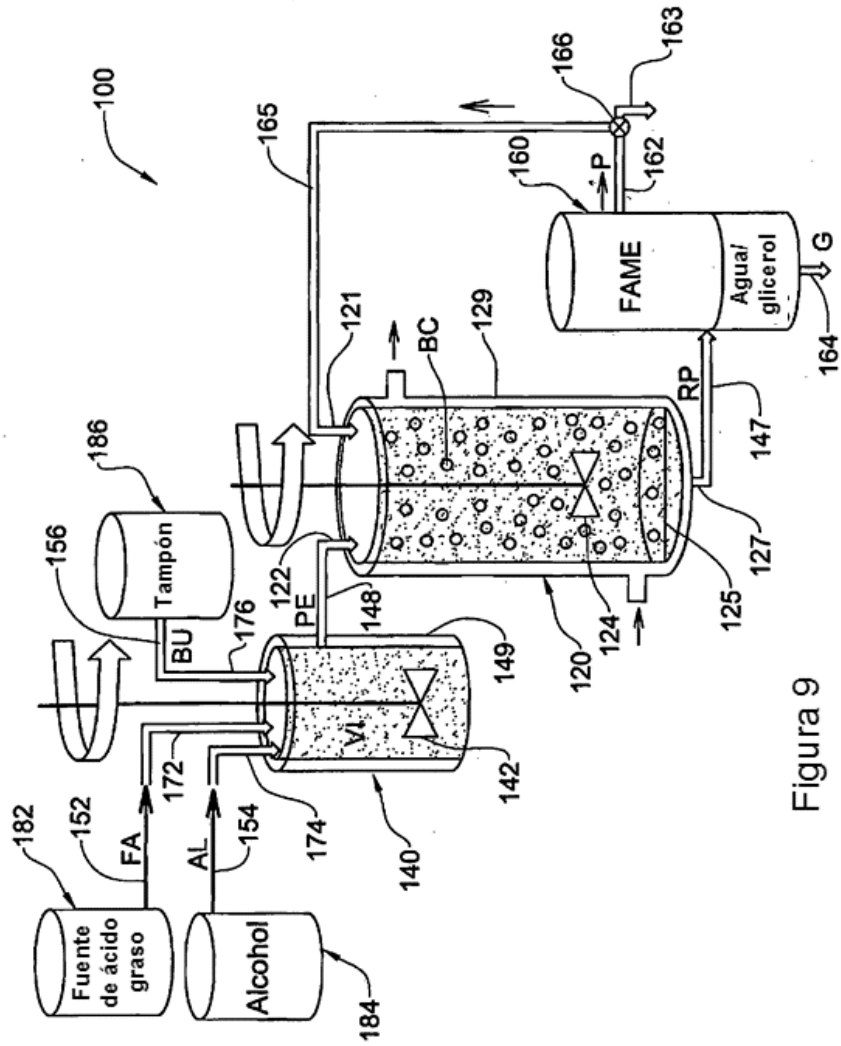


Figura 9

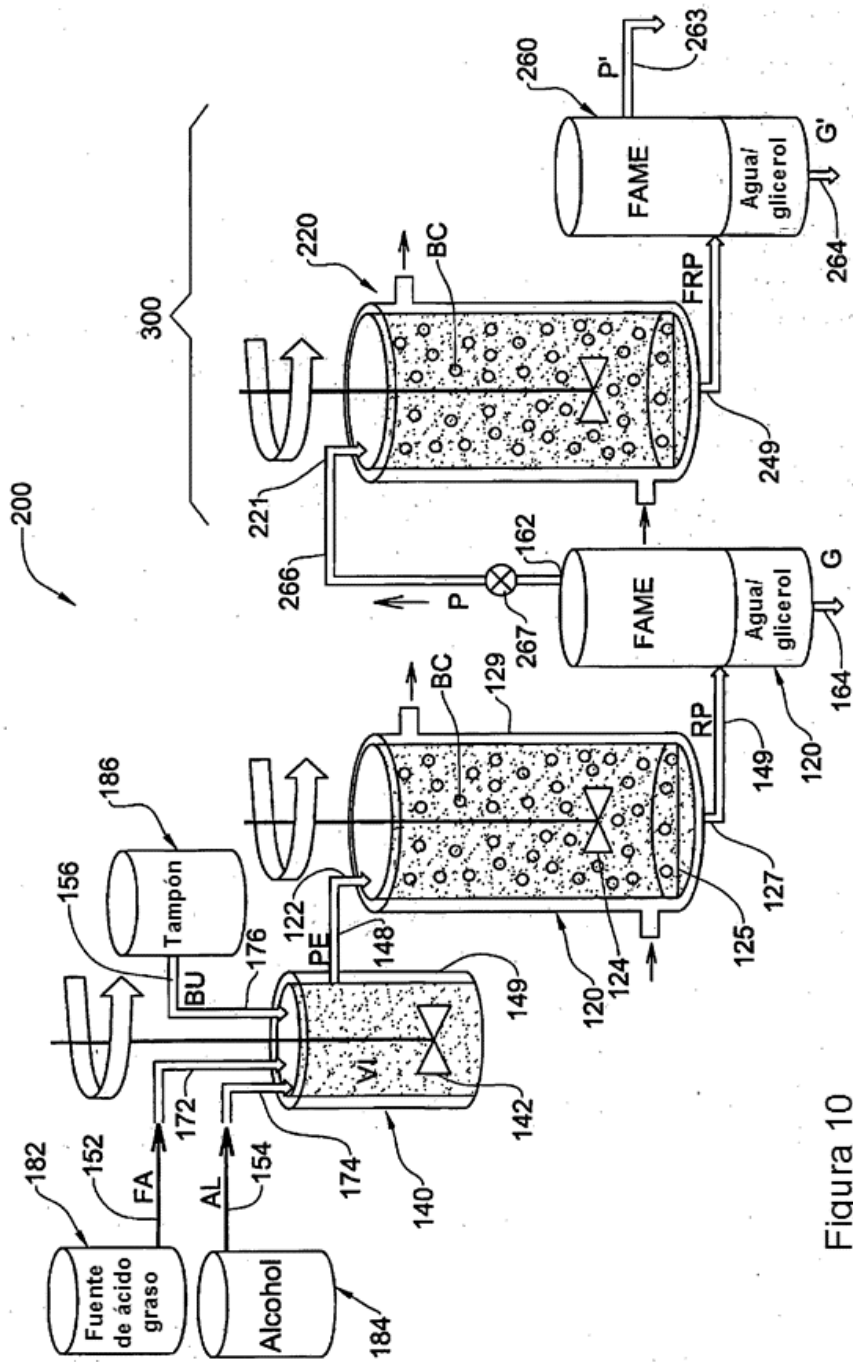


Figura 10