

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 631**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.10.2013 PCT/EP2013/070408**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.04.2014 WO2014056756**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2013 E 13770914 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2906708**

54 Título: **Procedimiento en tres pasos para la síntesis enzimática de ésteres de ácidos grasos**

30 Prioridad:

10.10.2012 EP 12187899

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

26.06.2017

73 Titular/es:

**BASF SE (100.0%)
Carl-Bosch-Strasse 38
67056 Ludwigshafen am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

**KEMPERS, PETER;
SCHÖRKEN, ULRICH;
KAWA, ROLF;
SCHWARZER, JÖRG y
WOLF, THOMAS**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 619 631 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

Procedimiento en tres pasos para la síntesis enzimática de ésteres de ácidos grasos

La presente invención comprende un procedimiento para la producción de ésteres de alcoholes grasos y ácidos grasos, en el cual la parte predominante del agua que surge durante la síntesis es transportada en forma líquida.

- 5 La síntesis enzimática de ésteres de alcoholes grasos y ácidos grasos es conocida. La síntesis enzimática es un procedimiento amigable con el medio ambiente, en el que la síntesis ocurre bajo completa evaporación del agua de reacción formada.

10 La aplicación industrial de lipasas para la preparación de ésteres de ácidos grasos había sido descrita por ejemplo por Geoffrey Hills en Eur. J. Lipid Sci. Technol. 105, 2003, páginas 601-607. Los ésteres de ácidos grasos preparados, en particular miristilmiristato, son preparados en un procedimiento de lecho sólido, en el que los reactivos son bombeados varias veces a través de la columna, y el agua de reacción surgida es evaporada bajo vacío.

El documento US 4 826 767 A (HANSEN, T.T., 2 de mayo de 1989) manifiesta un procedimiento para la preparación de ésteres de alcoholes grasos y ácidos grasos, que comprende la etapa:

- 15 i) Reacción de alcoholes grasos de la fórmula R^1-OH , en la que R^1 es un grupo hidrocarburo alifático lineal o ramificado con 6 a 22 átomos de carbono, y ácidos grasos de la fórmula R^2-COOH , en la que R^2 es un grupo hidrocarburo alifático lineal o ramificado con 6 a 22 átomos de carbono, en presencia de lipasa, bajo vacío a una temperatura de 60 a 80 °C.

20 El documento WO 2007/017167 A2 (COGNIS IP MANAGEMENT GMBH, 15 de febrero de 2007) manifiesta un procedimiento para la preparación de ésteres de alcoholes y ácidos grasos, que comprende las etapas:

- i) Reacción de alcoholes de la fórmula R^1-OH , en la que R^1 es un grupo hidrocarburo alifático lineal o ramificado con 1 a 4 átomos de carbono, y ácidos grasos de la fórmula R^2-COOH , en la que R^2 es un grupo hidrocarburo alifático lineal o ramificado con 6 a 22 átomos de carbono, en presencia de lipasa a una temperatura en el intervalo de 20 a 70 °C, hasta que se alcanza el equilibrio de reacción,
- 25 ii) eliminación del agua formada en la reacción y del alcohol que no reaccionó,
- iii) nueva adición de alcohol y
- iv) completar la reacción en presencia de un catalizador químico, bajo vacío a una temperatura de 150 a 250 °C.

30 Los ésteres de ácidos grasos son usados en medida creciente en productos cosméticos para el cuidado de la piel, como lípidos o bien emolientes. Para satisfacer los elevados requerimientos del mercado respecto a las propiedades sensoriales y óptima compatibilidad dermatológica, se desarrollan y prueban continuamente nuevos lípidos y mezclas de lípidos. A ellos pertenecen también tecnologías innovadoras para la preparación de estos ésteres de ácidos grasos.

35 Como ya se explicó, en la síntesis de ésteres de alcoholes grasos y ácidos grasos surge agua, la cual tiene que ser retirada, para desplazar el equilibrio de reacción en dirección de la síntesis completa. En la preparación de ésteres de ácidos grasos catalizada por enzimas tiene que trabajarse a temperaturas relativamente bajas, para mantener la óptima estabilidad del enzima. A consecuencia de ello se requiere un vacío muy fuerte, para evaporar el agua. Esta evaporación es muy intensiva en energía.

40 Se ha mostrado además, que surgen problemas cuando se aumenta la escala en reactores de lote. En reactores típicos de producción con 10-100 m³ la evaporación del agua ocurre por la disminución de la presión, condicionada por la altura de llenado, sólo en las capas superiores. Se ha mostrado que la reacción es muy rápida hasta un rendimiento de 80-90% y transcurre típicamente en menos de cinco horas. Sin embargo, eso tiene como consecuencia que la cantidad que se forma de agua en un reactor de producción durante este tiempo, no puede ser eliminada técnicamente o lo es sólo con un costo muy grande en equipos. Además, debido a la baja temperatura interior en el reactor el suministro de energía necesario que se requiere para la evaporación del agua de reacción,

45 es recuperada sólo difícilmente en el sistema.

Otro problema que se debe ver es que el catalizador enzimático a elevadas temperaturas es sólo muy poco estable o bien pierde actividad. Se sabe que las enzimas son muy sensibles a la temperatura. Con ello, la síntesis de ésteres no puede tener lugar a temperaturas mayores a 60-80°C. Se ha comprobado en particular que la estabilidad en el largo plazo de las enzimas en presencia de alcoholes grasos de cadena corta y ácidos grasos de cadena corta (C₈/C₁₀) ya a bajas temperaturas, aproximadamente desde 40°C, desciende de forma que de modo óptimo la reacción debería ser realizada a temperaturas de 40°C.

50

Partiendo de estos problemas o bien desventajas de la síntesis enzimática del estado de la técnica para los ésteres, se ve el objetivo de la presente invención como la generación una tecnología con la cual sea posible preparar ésteres de alcoholes grasos y ácidos grasos, en la que se garantice un bajo consumo de energía total, no tenga lugar ningún problema en el aumento de la escala en reactores de lote grande y se garantice una estabilidad mejorada de la enzima.

5

Este objetivo ha sido logrado de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 1.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de ésteres de alcoholes grasos y ácidos grasos, que comprende las etapas:

10 Reacción de alcoholes grasos de la fórmula R^1-OH , en la que R^1 es un hidrocarburo alifático lineal o ramificado con 6 a 22 átomos de carbono, y ácidos grasos de la fórmula R^2-COOH , en la que R^2 es un grupo hidrocarburo alifático lineal o ramificado con 6 a 22 átomos de carbono, en presencia de lipasa a una temperatura en el intervalo de 30 a 50 °C, hasta que se alcanza el equilibrio de reacción;

eliminación del agua formada en la reacción y

completar la reacción bajo vacío a una temperatura de 50 a 80 °C.

15 Las reivindicaciones a continuación definen formas preferidas de realización del procedimiento de acuerdo con la invención.

20 El procedimiento de acuerdo con la invención para la preparación de ésteres de alcoholes grasos y ácidos grasos representa una solución eficaz para los problemas o bien desventajas, que se han materializado en los correspondientes procedimientos del estado de la técnica. El presente procedimiento es un proceso enzimático de tres pasos, en el cual primero sin vacío a una baja temperatura se realiza la síntesis hasta el equilibrio de reacción. En una segunda etapa se retira el agua de reacción. En el siguiente, tercer paso de reacción se sintetiza el éster de ácido graso a temperatura más alta que en el paso 1 bajo vacío, hasta alcanzar rendimiento total.

La figura 1 muestra el cromatograma de GC de un éster preparado de acuerdo con la invención según purificación por destilación.

25 En una forma preferida de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, se realiza la síntesis en una atmósfera de gas de arrastre, para completar la reacción, es decir por consiguiente para alcanzar rendimiento completo. Como gases de arrastre pueden usarse todos los gases de arrastre corrientes. Son ejemplos de gases de arrastre adecuados nitrógeno, aire, dióxido de carbono y argón, en los que se usa preferiblemente nitrógeno como gas de arrastre.

30 Una característica esencial del procedimiento de acuerdo con la invención consiste en que en la primera etapa se trabaja primero sin vacío, hasta alcanzar el equilibrio de reacción. Justo después de eliminar el agua formada en la reacción, por ejemplo mediante decantación, de acuerdo con la invención se inicia nuevamente la reacción, en la que se aplica nuevamente un vacío. Para completar así la reacción se aplica una presión 100 a 10.000 Pa. En una forma preferida de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, para completar la reacción se aplica una presión de 1.500 a 4.500 Pa.

35

La reacción, que es realizada al principio sin vacío, es ejecutada a temperaturas relativamente bajas. Preferiblemente se elige un intervalo de temperatura de 35 a 45°C.

Idealmente, para completar la reacción se aplica un intervalo de temperatura mayor, de 55 a 65° C.

40 El procedimiento de acuerdo con la invención ocurre en presencia de una lipasa. Una lipasa preferida es la Lipasa B, preferiblemente de Candida antarctica. La lipasa es usada preferiblemente en forma inmovilizada. Un procedimiento preferido para la inmovilización es por ejemplo la adsorción sobre un material soporte. Son ejemplos de materiales de soporte Accurel MP 1000 y Lewatit VPOC 1600. En la práctica, ha probado ser ventajoso cuando en la síntesis, la lipasa inmovilizada es usada en una cantidad de 0,5 a 5,0 % en peso. Una ventaja particular del catalizador enzimático inmovilizado sobre un soporte consiste en que durante la eliminación del agua formada en la

45

El procedimiento de acuerdo con la invención puede ser ejecutado por ejemplo como sigue:

En la primera etapa de la síntesis enzimática, se mueve mecánicamente en el reactor de lote, por ejemplo se agita hasta que se alcanza el equilibrio de reacción. En esta etapa se alcanza un rendimiento de por lo menos 80% de producto de éster.

50 En la etapa intermedia de la eliminación del agua formada en la reacción se detiene el movimiento mecánico de la

carga, después de lo cual se deja decantar el agua preferiblemente por 0,5 a 2 horas. Idealmente se descarga el agua por un escape de piso, en el que se retiene la lipasa inmovilizada, por ejemplo mediante una criba en el reactor o unidad de filtro.

5 La última etapa en la que se completa la reacción bajo vacío, es ejecutada en el mismo reactor de lote hasta un rendimiento de por lo menos 95 %, preferiblemente mayor a 95 % de rendimiento del producto de éster. Idealmente, la lipasa del primer paso puede ser usada nuevamente, de modo que visto desde el punto de vista económico, la lipasa inmovilizada puede ser usada nuevamente en la síntesis total.

10 Los productos de partida empleados en la síntesis de ésteres, alcoholes grasos y ácidos grasos pueden ser alcoholes grasos o ácidos grasos técnicos. Sin embargo, se prefieren alcoholes grasos y ácidos grasos, que son obtenidos a partir de materias primas renovables.

Se entienden por alcoholes grasos los alcoholes alifáticos primarios de la fórmula,



15 en la cual R^1 representa un radical hidrocarburo alifático, lineal o ramificado con 6 a 22 átomos de carbono. Se incluyen así mismo radicales hidrocarburo insaturados con por lo menos un doble enlace. Son ejemplos típicos capronalcohol, caprilalcohol, 2-etilhexilalcohol, caprinalcohol, laurilalcohol, isotridecilalcohol, miristilalcohol, cetilalcohol, palmoleilalcohol, estearilalcohol, isoestearilalcohol, oleilalcohol, elaidilalcohol, petroselinilalcohol, linoleilalcohol, linolenilalcohol, elaeostearilalcohol, araquilalcohol, gadoleil-alcohol, behenilalcohol, erucilalcohol y brasidilalcohol así como sus mezclas. Se prefieren alcoholes grasos con 8 a 18 átomos de carbono.

Se entienden por ácidos grasos los ácidos carboxílicos alifáticos de la fórmula,



25 en la cual R^2 representa un radical hidrocarburo alifático, lineal o ramificado con 6 a 22 átomos de carbono. Se incluyen así mismo radicales hidrocarburo insaturados con por lo menos un doble enlace. Son ejemplos típicos ácido caprónico, ácido caprílico, ácido 2-etilhexanoico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido isotridecanoico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido palmoleico, ácido esteárico, ácido isoesteárico, ácido oleico, ácido eláidico, ácido petrosélico, ácido linoleico, ácido linoléico, ácido elaeosteárico, ácido araquínico, ácido gadoleico, ácido behénico y ácido erúxico así como sus mezclas. Se prefieren ácidos grasos técnicos con 8 a 18 átomos de carbono.

El procedimiento de acuerdo con la invención para la preparación de los ésteres ocurre preferiblemente en el procedimiento de un recipiente. Un reactor preferido aquí es el reactor de lote o un reactor de lote con bucle de lecho sólido.

30 Para el procesamiento de los ésteres de ácidos grasos preparados de acuerdo con la invención pueden ejecutarse otras etapas de purificación y conservación. A ellos pertenecen por ejemplo una destilación preliminar para la eliminación de los reactivos que no reaccionaron. De este modo puede ocurrir también una destilación de producto para el mejoramiento del color. Se ha comprobado que puede ejecutarse también una desodorización para optimizar el olor de manera exitosa. Así, puede ser dado el caso deseable la adición de antioxidantes (como por ejemplo tocoferol) para la estabilización del producto.

40 El procedimiento de acuerdo con la invención tiene muchas ventajas respecto a los procedimientos conocidos para la preparación de los ésteres de ácidos grasos. Un progreso esencial consiste en que se obtiene un consumo total de energía extraordinariamente bajo puesto que se evapora menos agua, en contraposición al procedimiento del estado en la técnica, en el cual se ejecuta la totalidad de la reacción bajo vacío. En la etapa intermedia del segundo paso, es decir en la eliminación del agua, puede separarse esta de manera ventajosa mediante un escape de piso, puesto que el agua se separa muy rápidamente de los ésteres hidrófobos. En reactores de lote grandes se alcanzan mediante este procedimiento tiempos de reacción más cortos, comparados con la evaporación completa del agua de reacción. El rendimiento en el equilibrio de la reacción es prácticamente independiente del tamaño de lote, influye en él principalmente la mezcla.

45 Otra ventaja que se ve es que se alcanza una estabilidad de enzima extraordinariamente mejorada. El fundamento de ello es que en la primera etapa del procedimiento se trabaja a temperatura claramente menor que en el tercer paso. Además, en el tercer paso, la concentración de los componentes que generan inactivación, como por ejemplo sustancias de partida, es claramente menor.

50 Finalmente, se obtiene un rendimiento mucho mayor. Esto es atribuido a que se trabaja a temperatura más elevada en la tercera etapa. Con ello, es posible un rendimiento superior a 99 % de producto. El uso adicional de un gas de arrastre causa además la elevación del rendimiento final.

Los siguientes ejemplos sirven para la ilustración del procedimiento de acuerdo con la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: estabilidad de largo plazo de la enzima en el procedimiento de 3 pasos (escala de laboratorio)

5 Se agitaron a temperatura ambiente durante la noche Lewatit VPOC 1600 (Lanxess) y lipasa B comercialmente disponible de Candida antarctica (Lipozym CalB L de Novozymes) en relación de cantidad 1:1, en 20 veces la cantidad de agua. Se separó por filtración la enzima inmovilizada y se usó directamente para la síntesis.

10 En un reactor de 1 litro con agitador de aletas se hicieron reaccionar 650 g de una mezcla equimolar de octanol y ácido graso (mezcla técnica de ácido octanoico y ácido decanoico) con 2 % en peso de producto inmovilizado de enzima. Se agitó la mezcla por 4 h a 45 °C bajo presión normal. Después de 4 h se detuvo el agitador y se tomó una muestra para la determinación del número ácido. Después de 30 min se retiró la fase acuosa del reactor y se inició nuevamente la reacción. Se aumentó la temperatura a 60 °C, se aplicó un vacío de 20 mbar con bomba de aceite y se aplicó gas nitrógeno a la mezcla de reacción. Se agitó la carga por otras 18 h a condiciones constantes. Después de ese tiempo de reacción se retiró la carga de reacción, se determinó el rendimiento mediante medición del número ácido y con la misma enzima se inició una nueva carga bajo las mismas condiciones. En total se
15 realizaron 10 cargas con la misma enzima. El número ácido de la mezcla alcohol graso/ácido graso estuvo en 210.

Carga	Número ácido 4 h	Rendimiento 4 h	Número ácido 22 h	Rendimiento 22 h
1	26,8	87,20%	0,7	99,70%
2	25,9	87,70%	0,6	99,70%
3	25,8	87,70%	3	98,60%
4	25,8	87,70%	0,7	99,70%
5	26,5	87,40%	4,8	97,70%
6	26,9	87,20%	0,9	99,60%
7	26,3	87,50%	5,1	97,60%
8	28,3	86,50%	2	99%
9	25,9	87,70%	1,6	99,20%
10	26,7	87,3, %	1,8	99,10%

20 Después de un tiempo de reacción de 4 h la reacción alcanzó en 10 ciclos aproximadamente el estado de equilibrio de escasamente por debajo de 90 % del rendimiento. Después de un tiempo de reacción total de 22 h, mediante eliminación del agua bajo vacío se alcanzó en todas las 10 cargas un rendimiento > 97 %. En 10 cargas no se observó ningún descenso significativo de la actividad enzimática.

Ejemplo 2: Síntesis según el procedimiento de 3 pasos en un reactor de 10 m³

25 El reactor de 10 m³ fue equipado con un agitador de aletas, una camisa doble de calentamiento, una alimentación de gas nitrógeno en el piso del reactor y una instalación de vacío-radiador. Adicionalmente, en el escape de piso, se instalaron cribas de división para la retención del catalizador. En el mismo reactor se realizó la inmovilización de la enzima y la reacción.

Se colocaron en el reactor previamente 140 kg de Accurel MP 1000 y 1500 kg de etanol y se agitó por 0,5 h, después de lo cual se retiró el etanol mediante el escape de piso. Se añadieron al reactor 3000 kg de agua y bajo agitación se agregaron 150 kg de Lipozym CalB L. Se realizó la inmovilización por 16 h a 25 °C. Se retiró del reactor la solución acuosa y se lavó con agua una vez la enzima inmovilizada retenida.

30 Se añadieron al reactor a la totalidad de la enzima inmovilizada 6550 kg de una mezcla de octanol y ácido graso (mezcla técnica de ácido octanoico y ácido decanoico). Se agitó la mezcla por 4 h a 45 °C bajo presión normal. Después de 4 h se detuvo el agitador y se tomó una muestra para la determinación del número ácido. Después de 30 min se retiró la fase acuosa del reactor (aproximadamente 350 kg) y se inició nuevamente la reacción. Se aumentó la temperatura a 60 °C, se aplicó una línea de vacío de aproximadamente 30 mbar y se aplicó gas nitrógeno a la mezcla de reacción. Se incubó la carga por otras 12 h con agitación. Después de ese tiempo de
35 reacción se retiró la carga de reacción a través de la criba de división, y se filtró finamente en un filtro de saco. En total se realizaron 9 cargas con la misma enzima sin establecerse una pérdida significativa de actividad enzima.

Después de un tiempo de reacción de 4 h todas las cargas exhibían un número ácido de 25 - 30, lo cual

corresponde a un rendimiento de > 85 %. Después de terminada la reacción todas las cargas tenían un número ácido de < 2, lo cual corresponde a un rendimiento de por lo menos 99 %, referido al ácido graso. El producto de reacción era claro y aproximadamente incoloro. En total se fabricaron aproximadamente 52.000 kg de producto con un rendimiento del más de 98 %.

5 Ejemplo 3: calidad de producto del éster fabricado según el procedimiento de acuerdo con la invención

Al producto del Ejemplo 2 se realizó nuevamente desodorización y purificación mediante destilación. Para ello se condujo el producto a través de una destilación de producción consistente en tres columnas conectadas sucesivamente. Se dosificó el producto con una rata de flujo de 2000 kg/h y en la primera columna se tomó una parte consistente en reactivos que no reaccionaron, con una rata de 90 kg/h. En la segunda columna se destiló en la cabeza el éster para el mejoramiento del color y en la tercera columna se realizó la desodorización del éster a 120°C con 10 % de vapor, para el mejoramiento del olor.

El producto así obtenido (mezcla de octilcanoato y octildecanoato) tenía un número de saponificación de 210, un número ácido < 0,1, un número de hidroxilo < 0,1 y un número de peróxido < 0,1. El número de color según Hazen estuvo en 10 y el punto de turbidez estuvo en - 12°C. El contenido de ésteres según análisis por GC estuvo en 99,4 % (Fig. 1). De esta figura se reconocen los dos picos principales de octilcanoato (tr ~ 6 min) y octildecanoato (tr ~7 min).

Ejemplo 4: dependencia de la estabilidad del enzima frente a la temperatura

Se agitaron a temperatura ambiente durante la noche Lewatit VPOC 1600 (Lanxess) y lipasa B comercialmente disponible de Candida antarctica (Lipozym CalB L de Novozymes) en relación de cantidad 1:1, en 20 veces la cantidad de agua. Se separó por filtración la enzima inmovilizada y se usó directamente para la síntesis.

En matraces que podían cerrarse se hicieron reaccionar en cada caso 50 g de una mezcla equimolar de octanol y ácido graso (mezcla técnica de ácido octanoico y ácido decanoico) con 2 % en peso de producto inmovilizado de enzima (1 g). Se sacudieron las mezclas por 22 h a 30°C, 45°C y paralelamente a 60°C. Después de ese tiempo de reacción se separó por filtración la carga y se determinó el rendimiento mediante medición de número ácido. En total se realizaron 9 cargas con la misma enzima a las 3 temperaturas. El número ácido inicial de la mezcla alcohol graso / ácidos grasos estuvo en 210.

Carga	Número ácido 30 °C	Rendimiento 30 °C	Número ácido 45 °C	Rendimiento 45 °C	Número ácido 60 °C	Rendimiento 60 °C
1	30,9	85,3 %	32,8	84,4 %	35,3	83,2 %
2	26	87,6 %	40,8	80,6 %	34,7	83,5 %
3	24,3	88,4 %	32,6	84,5 %	36,2	82,8 %
4	26,4	87,4 %	29,4	86%	36,4	82,7 %
5	26,8	87,2%	29,7	85,9 %	91,3	56,5 %
6	31,2	85,1 %	31,2	85,1 %	155,2	26,1 %
7	25,9	87,7 %	30,5	85,5 %	151,8	27,7 %
8	26,9	87,2 %	29,7	85,9 %	147,6	29,7 %
9	30,8	85,3 %	29,2	86,1 %	173,5	17,4 %

En las reacciones a 30 °C y 45 °C no se observa después de 22 h de tiempo de reacción en las 9 cargas ningún descenso significativo de la actividad enzimática. A 60 °C se observa desde la 5ª carga un claro descenso en la actividad, después de 9 cargas se alcanza menos de 25 % del rendimiento inicial.

Ejemplo 5: Dependencia de la estabilidad del enzima frente a la temperatura

Se incubó Accurel MP 1000 (membrana) por 1 h en un exceso de 10 veces de etanol y después se separó por filtración. Se agitaron a temperatura ambiente durante la noche el Accurel MP 1000 húmedo con etanol y lipasa B comercialmente disponible de Candida antarctica (Lipozym CalB L de Novozymes) en relación de cantidad 1:1, en 20 veces la cantidad de agua. Se separó por filtración la enzima inmovilizada y se usó directamente para la síntesis. En matraces que podían cerrarse se hicieron reaccionar en cada caso 50 g de una mezcla equimolar de octanol y ácido graso (mezcla técnica de ácido octanoico y ácido decanoico) con 2 % en peso de producto inmovilizado de enzima (1 g). Se sacudieron las mezclas por 22 h a 30°C, 45°C y paralelamente a 60°C. Después de ese tiempo de reacción se separó por filtración la carga y se determinó el rendimiento mediante medición de número ácido. En total se realizaron 9 cargas con la misma enzima a las 3 temperaturas. El número ácido inicial de la mezcla alcohol

graso / ácidos grasos estuvo en 210.

Carga	Número ácido	Rendimiento	Número ácido	Rendimiento	Número ácido	Rendimiento
	30 °C	30 °C	45 °C	45 °C	60 °C	60 °C
1	27,2	87%	33	84,3 %	36,3	82,7 %
2	25,8	87,8 %	30,7	85,4 %	38,2	81,8 %
3	28,1	86,6 %	32	84,8 %	35	83,3 %
4	33	84,3 %	30,6	85,4 %	34,2	83,7 %
5	25	88,1 %	30,6	85,4 %	47,5	77,4 %
6	24,4	88,4 %	30,8	85,3 %	95,6	54,5 %
7	26,3	87,5 %	30	85,7 %	135,9	35,3 %
8	26,3	87,5 %	30,3	85,6%	143,6	31,6%
9	26,7	87,3 %	30,2	85,6 %	149,4	28,9 %

5 En las reacciones a 30 °C y 45 °C no se observa después de 22 h de tiempo de reacción en las 9 cargas ningún descenso significativo de la actividad enzimática. A 60 °C se observa desde la 5ª carga un ligero descenso y desde la 6ª carga un claro descenso en la actividad después de 9 cargas se alcanza aún solo aproximadamente 35 % del rendimiento inicial.

10 Se realizó otra carga a 60 °C y un vacío de 20 mbar en un reactor de doble camisa. Por carga se usaron 800 g de la mezcla de reactivos descrita anteriormente y 2 % de producto inmovilizado de lipasa B de Candida antártica sobre el Accurel MP 1000. En total se realizaron 8 cargas bajo agitación continua y aplicación de gas nitrógeno. Se tomaron en cada caso muestras después de 3 h y 22 h. No se observó una acumulación de agua.

Carga	Número ácido 3 h	Rendimiento 3	Número ácido 22 h	Rendimiento 22
1	8,9	95,8 %	3,1	98,5 %
2	8,5	95,9 %	5,1	97,6 %
3	9,9	95,3 %	0,4	99,8 %
4	25,0	88,1 %	0,4	99,8 %
5	16,6	92,1 %	0,6	99,7 %
6	91,9	56,2 %	5,2	97,5 %
7	169,6	19,2 %	40,5	80,7 %
8	170,2	19%	66,3	68,4 %

15 También bajo condiciones de vacío y eliminación continua del agua ocurrió a la temperatura de reacción de 60 °C una rápida desactivación del catalizador. Ya después de 4 ciclos, se percibe en la toma de muestras después de 3 h un retardo en la velocidad de reacción, después de 6 - 7 ciclos después de 22 h tampoco se alcanza rendimiento total.

20 Los Ejemplos 1, 4 y 5 fueron ejecutados con cantidades comparables de enzima y con la misma mezcla de reactivos. En la forma de operar de 3 pasos de la síntesis de éster (Ejemplo 1) con una reacción en equilibrio a 45 °C y otra reacción bajo vacío a 60 °C, después de 10 ciclos de reacción no se percibe descenso significativo. Contra ello, la reacción directa a 60 °C tanto con el soporte Lewatit VPOC 1600 (Ejemplo 4) como Accurel MP 1000 (Ejemplo 5) ya después de 5 ciclos condujo a una reducción significativa de la actividad enzimática.

25 De la comparación se muestra que en particular los reactivos usados en los ejemplos ejercen una influencia de desactivación sobre la enzima. El octanol tiene un fuerte carácter disolvente y ácido octanoico así como ácido decanoico son aún ácidos muy fuertes. Al respecto, la desactivación de la enzima es fuertemente dependiente de la temperatura elegida de reacción. Mediante la síntesis de tres pasos, en la cual en la primera etapa > 80 % de los reactivos reaccionan a baja temperatura y entonces el restante 10 - 20 % de los reactivos reacciona a una temperatura superior, conduce a una estabilidad claramente mejorada de la enzima en comparación con la reacción directa de los reactivos a mayor temperatura. La forma de operar en tres pasos es adecuada en particular para la reacción técnica, puesto que la eliminación de agua bajo vacío en la segunda etapa de reacción funciona claramente mejor que a menor temperatura.

En otras pruebas de almacenamiento se confirmó que la enzima tiene una mejor estabilidad en el éster producido que en la mezcla de reactivos. El almacenamiento por 1 mes a 45 °C en la mezcla de producto, del producto inmovilizado condujo a una reducción significativa de la actividad enzimática.

Ejemplo de comparación 1: síntesis de éster bajo vacío en un reactor de 10 m³

5 La inmovilización y la reacción fueron ejecutadas en el mismo reactor como se describe en el Ejemplo 2. La inmovilización fue ejecutada así mismo como se describe en el Ejemplo 2 y la mezcla de reactivos así como la relación de biocatalizador y reactivos fueron idénticas.

10 Se añadieron en el reactor a la totalidad del producto inmovilizado de enzima, 6550 kg de una mezcla de octanol y ácidos grasos (mezcla técnica de ácido octanoico y ácido decanoico). Se agitó la mezcla por 4 h a 45 °C y aplicación de gas nitrógeno, a un vacío por irradiación de 30 mbar. Después de 4 h se tomó una muestra y se analizó la cantidad de agua presente. El número ácido de la muestra estuvo en 26, lo cual corresponde a un rendimiento > 87 %. Se mostró que después de 4 h se acumuló agua en el reactor: aproximadamente 75 % de la cantidad formada de agua no pudo ser eliminada del reactor a la temperatura de 45°C, mediante la bomba de vacío. Para la eliminación del agua formada inicialmente mediante evaporación a la temperatura indicada fueron necesarias aproximadamente 16 h. Justo después de la completa eliminación de la fase acuosa, pudo el sistema reaccionar nuevamente.

20 Se ha mostrado que en reactores típicos de producción para ésteres cosméticos y técnicos, que exhiben un tamaño de 20 - 100 m³, tarda mucho la eliminación de agua debido al nivel de llenado más alto y a la desfavorable relación superficie a volumen. Sólo mediante la elevación de la temperatura de reacción a por ejemplo 80 - 100 °C puede eliminarse más rápidamente el agua. Puesto que sin embargo aquí la desactivación de la enzima es muy fuerte, esta variante el procedimiento no es una solución adecuada.

25 Como se mostró en el Ejemplo 2 de acuerdo con la invención, se detiene la reacción después de 4 h, de modo que la fase acuosa puede ser eliminada del reactor dentro de un tiempo más corto. También a baja temperatura (30 - 45 °C) se alcanza el equilibrio de reacción dentro de aproximadamente 4 h. Después de la separación del agua puede aumentarse la temperatura de reacción para la mejor separación de la fase acuosa, a por ejemplo 60 °C, sin una desactivación significativa de la enzima, puesto que ya la mayor parte de los reactivos han reaccionado. Con ello puede ejecutarse la reacción total dentro de un período de 12 - 20 h.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de ésteres de alcoholes grasos y ácidos grasos, que comprende las etapas:
 - reacción de alcoholes grasos de la fórmula R^1-OH , en la que R^1 es un grupo hidrocarburo alifático lineal o ramificado con 6 a 22 átomos de carbono, y ácidos grasos de la fórmula R^2-COOH , en la que R^2 es un grupo hidrocarburo alifático lineal o ramificado con 6 a 22 átomos de carbono, en presencia de lipasa a una temperatura en el intervalo de 30 a 50 °C, hasta que se alcanza el equilibrio de reacción;
 - eliminación del agua formada en la reacción y
 - completar la reacción bajo vacío a una temperatura de 50 a 80 °C.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque se completa la reacción en una atmósfera de gas de arrastre.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque como gas de arrastre se usa nitrógeno, aire, dióxido de carbono o argón.
4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque para completar la reacción se aplica una presión de 100 a 10.000 Pa.
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque para completar la reacción se aplica una presión de 1.500 a 4.500 Pa.
6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la reacción es ejecutada a una temperatura en el intervalo de 35 a 45 °C.
7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque para completar la reacción, ésta es ejecutada a una temperatura en el intervalo de 55 a 65 °C.
8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque se usa la lipasa inmovilizada.
9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque la lipasa inmovilizada es usada en una cantidad de 0,5 a 5,0 % en peso.
10. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque como alcoholes grasos se usan aquellos cuyo grupo alquilo o alquenilo exhibe 8 a 18 átomos de carbono.
11. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque como ácidos grasos se usan aquellos cuyo grupo alquilo o alquenilo exhibe 8 a 18 átomos de carbono.
12. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque la preparación del éster ocurre en el método de un recipiente.
13. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque además se ejecutan etapas de purificación y conservación.
14. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado porque se ejecuta una destilación preliminar, una destilación de producto para mejorar el color, una eliminación de olores para la optimización del olor y/o una adición de antioxidantes.

