(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 336 012**

(51) Int. Cl.:
C12N 9/20 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **05728493 .7**
(96) Fecha de presentación : **08.04.2005**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1734114**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **20.12.2006**

(54) Título: **Polvo de lipasa, procedimiento para su producción y su uso.**

(30) Prioridad: **08.04.2004 JP 2004-114443**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.04.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.04.2010

(73) Titular/es: **The Nisshin OilliO Group, Ltd.**
23-1, Shinkawa 1-chome
Chuo-ku, Tokyo 104-8285, JP

(72) Inventor/es: **Suzuki, Junko;**
Negishi, Satoshi;
Arai, Yuri y
Sakurai, Chika

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Polvo de lipasa, procedimiento para su producción y su uso.

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a un polvo de lipasa (lipasa como polvo) que puede ser usado de forma apropiada en las diversas reacciones de esterificación tales como una reacción de trans-esterificación; métodos para producir el mismo; y una composición de lipasa donde el polvo de lipasa está sumergido o impregnado (o empapado) en aceite graso; un método de trans-esterificación de aceite graso, que comprende la etapa de usar el polvo de lipasa, y similares.

Antecedentes de la invención

Las lipasas son ampliamente usadas en las reacciones tales como la esterificación de varios ácidos carboxílicos tales como ácidos grasos con alcoholes tales como monoalcoholes y polialcoholes, y trans-esterificación entre carboxilatos plurales. En éstas, el método de trans-esterificación es una importante tecnología no sólo para reformar aceites grasos animales y vegetales sino también como métodos para producir varios ésteres grasos, ésteres de azúcares y esteroides. Cuando una lipasa, que es una enzima hidrolítica de ácidos grasos, se usa como catalizador de las reacciones de más arriba, la esterificación se puede llevar a cabo bajo la condición suave tal como a temperatura ambiente a aproximadamente 70ºC. Por lo tanto, la lipasa puede inhibir mejor las reacciones secundarias y reducir los costes de energía en comparación con las reacciones químicas existentes. Además de eso, una lipasa como catalizador es un producto natural y, por ello, seguro y estable. Además, una lipasa puede producir de forma eficaz los compuestos pretendidos a través de su especificidad de sustrato y especificidad de sitio. Sin embargo, incluso si se usa polvo de lipasa tal cual en la esterificación, la actividad no se expresa totalmente. Además, es difícil dispersar uniformemente un lipasa, que es básicamente un producto soluble en agua, dentro de materiales oleosos crudos, y recuperar la misma también es difícil. Por lo tanto, en los métodos convencionales, es común inmovilizar una lipasa a algunos vehículos, tales como una resina de intercambio aniónico (Literatura de Patente 1), resina de adsorción con fenol (Literatura Patente 2), un vehículo hidrofóbico (Literatura Patente 3), resina de intercambio catiónico (Literatura Patente 4) y resina de quelatos (Literatura Patente 5) y usarlos en las reacciones tales como esterificación y trans-esterificación.

Como se menciona más arriba, se ha inmovilizado de forma convencional una lipasa y se ha usado en la esterificación. Sin embargo, la lipasa inmovilizada pierde una actividad de lipasa original a través de la inmovilización. Además, cuando se usó un vehículo poroso, los materiales y productos en crudo se han quedado atrapados en los poros más pequeños y, como resultado, disminuyó el ritmo de intercambio de ésteres. Además, en la trans-esterificación donde se usa la lipasa convencional inmovilizada, el agua que mantiene el vehículo se introduce en el sistema de reacción, y por ello, ha sido difícil evitar las reacciones secundarias tales como producción de diglicérido y monoglicérido en la trans-esterificación de aceites grasos.

En vista de las situaciones arriba mencionadas, se han desarrollado varias tecnologías donde se usa polvo de lipasa. Por ejemplo, se propone un método de trans-esterificación donde en presencia o ausencia de disolvente(s) orgánico(s) inactivo(s), el polvo de lipasa se dispersa dentro de material(es) en crudo que contienen éster en la trans-esterificación de forma que el 90% o más de las partículas del polvo de lipasa disperso puede mantener un tamaño de partícula de 1 a 100 μm en la reacción (Literatura Patente 6). También se propone que se use polvo de enzima, que se obtiene secando solución/soluciones de enzimas que contiene(n) fosfolípido y vitaminas solubles en lípidos (Literatura Patente 7).

Sin embargo, se ha deseado un polvo de lipasa donde la actividad y la estabilidad de la lipasas están además mejoradas.

[Literatura Patente 1] Publicación de Patente Japonesa No. Sho 60-98984

[Literatura Patente 2] Publicación de Patente Japonesa No. Sho 61-202688

[Literatura Patente 3] Publicación de Patente Japonesa No. Hei 2-138986

[Literatura Patente 4] Publicación de Patente Japonesa No. Hei 3-61485

[Literatura Patente 5] Publicación de Patente Japonesa No. Hei 1-2627956

[Literatura Patente 6] Patente Japonesa No. 2668187

[Literatura Patente 7] Publicación de Patente Japonesa No. 2000-106873.

Descripción de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un polvo de lipasa donde la actividad y estabilidad de la lipasa están mejoradas.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un polvo de lipasa donde está mejorada la selectividad 1, 3 de la lipasa.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar composiciones de lipasa donde el polvo de lipasa está sumergido o impregnado en aceite graso.

Todavía otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para producir el polvo de lipasa.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método de trans-esterificación de aceite graso, que comprende usar el polvo de lipasa.

Los objetos de más arriba y otros objetos serán evidentes a partir de las siguientes descripciones.

La actividad y estabilidad de la lipasa están extremadamente mejoradas granulando la lipasa con un contenido sólido de leche animal para obtener el polvo de la misma. Además, en caso donde la lipasa es una lipasa 1,3-específica, la selectividad 1, 3 está extremadamente mejorada. La presente invención ha sido completada en base a estos descubrimientos.

A saber, la presente invención proporciona un polvo de lipasa que es un producto granulado que contiene una lipasa y un contenido sólido (material sólido) de leche animal.

La presente invención también proporciona una composición de lipasa donde el polvo de lipasa está sumergido o impregnado en aceite graso.

La presente invención además proporciona un método para producir un polvo de lipasa que comprende añadir leche animal o crema derivada de leche animal a una solución acuosa que contiene una lipasa, y deshidratar por aspersión, deshidratar por congelación o precipitar con disolvente la mezcla de la misma.

La presente invención además proporciona una lipasa para trans-esterificación o esterificación que contiene el polvo de lipasa.

La presente invención además proporciona un método de trans-esterificación de aceite graso, que comprende usar la lipasa para la trans-esterificación.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

La lipasa usada en la presente invención incluye una lipoproteín lipasa, una monoacilglicerol lipasa, una diacilglicerol lipasa, una triacilglicerol lipasa, una galactolipasa, una fosfolipasa y similares. En éstas, la triacilglicerol lipasa es preferida.

Los microorganismos que producen estas lipasas incluyen, sin limitarse a bacterias, levaduras, bacterias filamentosas, actinomices y similares, *Psudomonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Arthrobacter* sp., *Staphylococcus* sp., *Torulopsis* sp., *Escherichia* sp., *Micotorula* sp., *Propionibacterum* sp., *Chromobacterum* sp., *Xanthomonas* sp., *Lactobacillus* sp., *Clostridium* sp., *Candida* sp., *Geotrichum* sp., *Sacchromycopsis* sp., *Nocardia* sp., *Fuzarium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus* sp., *Phycomycese* sp., *Puccinia* sp., *Bacillus* sp., *Streptmycese* sp., *Thermomyces* sp. Y similares.

En la presente invención, en esa, se prefiere una lipasa 1, 3-específica; en particular, una lipasa 1, 3-específica derivada de *Rhizomucor sp.* y *Alcaligenes sp.* es más preferida; y una lipasa 1, 3-específica derivada de *Rhizomucor miehei* que pertenece a *Rhizomucor sp*., y *Alcaligenes sp.* es además preferida. Hasta este momento, *Rhizomucor miehei* a veces suele pertenecer a *Mucor sp.*

En la presente invención, una lipasa 1, 3-específica derivada *Rhizopus sp.* y *Thermomyces sp.* es preferida; en particular la lipasa 1, 3-específica derivada de *Rhizopus orizae* y *Thermomyces lanugenousus* es más preferida.

La leche animal usada en la presente invención incluye leche de vaca, leche de cabra y similares. En estas, la leche de vaca es preferida, en particular, el contenido sólido de leche animal es preferiblemente un contenido de leche de vaca o crema derivada de leche de vaca.

Aunque la relación de la lipasa en la leche animal puede estar en varias proporciones, el contenido sólido de leche animal es preferiblemente 0,1 a 20 veces, más preferiblemente 1 a 20 veces la masa de la lipasa.

El polvo de lipasa según la presente invención debe comprender una lipasa y un contenido sólido de leche animal. El polvo de lipasa puede comprender, además de estos componentes, un componente de cultivo de lipasa.

Es preferible que el polvo de lipasa según la presente invención tenga un contenido en agua de 10% en peso o menos, en particular, de 6,5 a 8,5% en peso.

Aunque el tamaño de partícula del polvo de lipasa según la presente invención puede ser opcional, es preferible que el 90% en peso o más del polvo de lipasa tenga el tamaño de partícula de 1 a 100 μm. En esta conexión, es preferible que un tamaño de partícula medio de la misma sea 20 a 80 μm, más preferiblemente 20 a 50 μm. Además, el polvo de lipasa es preferiblemente esférico.

El tamaño de partícula del polvo de lipasa se puede determinar, por ejemplo, por un Analizador de Distribución del Tamaño de Partícula (LA-500) de HORIBA, Ltd.

El polvo de lipasa según la presente invención se puede obtener por, por ejemplo, adición de leche animal o crema derivada de leche animal a una solución acuosa que contiene una lipasa, y deshidratar por aspersión, deshidratar por congelación o precipitar con disolvente la mezcla de la misma.

Ejemplos de disolventes usados en la precipitación con disolvente (precipitación con disolvente) incluyen etanol, acetona, metanol, alcohol isopropílico y hexano, y una mezcla de los mismos. Entre estos, se prefiere el etanol y la acetona ya que estos disolventes además pueden mejorar la actividad del polvo de lipasa. El secado tras la precipitación con disolvente se puede llevar a cabo por, por ejemplo, secado bajo presión reducida.

Aquí, ejemplos de la solución acuosa que contiene una lipasa incluyen una solución de cultivo de lipasa de la cual se ha separado un cuerpo celular, una solución de cultivo purificada de la misma; una solución en la que el polvo de lipasa obtenido de estas soluciones de cultivo es disuelto y dispersado de nuevo; una solución en la que el polvo de lipasa disponible comercialmente es disuelto y dispersado de nuevo; y una lipasa líquida disponible comercialmente. Con el fin de potenciar la actividad de la lipasa, es más preferible que los componentes de bajo peso molecular tales como sales, sean separados de la solución. Con el fin de potenciar la propiedad del polvo, es más preferible que los componentes de bajo peso molecular tales como azúcar, sean separados de la solución.

Una solución de cultivo de lipasa incluye, por ejemplo, soluciones acuosas que contienen harina de semilla de soja, peptona, licor macerado de maíz, K_2HPO_4, $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4/7H_2O$ y similares. Las concentraciones de los mismos son como siguen: La harina de semilla de soja es 0,1 a 20% en peso y preferiblemente 1,0 a 10% en peso; la peptona es 0,1 a 30% en peso y preferiblemente 0,5 a 10% en peso; el licor macerado de maíz es 0,1 a 30% en peso y preferiblemente 0,5 a 10% en peso; K_2HPO_4 es 0,01 a 20% en peso y preferiblemente 0,1 a 5% en peso; $(NH_4)_2SO_4$ es 0,01 a 20% en peso y preferiblemente 0,05 a 5% en peso; y $MgSO_4/7H_2O$ es 0,01 a 20% en peso y preferiblemente 0,05 a 5% en peso. Las condiciones de cultivo de los mismos deben ser controladas como sigue: la temperatura de cultivo es 10 a 40ºC y preferiblemente 20 a 35ºC; la cantidad de flujo de aire es 0,1 a 2,0 VVM y preferiblemente 0,1 a 1,5 VVM; la velocidad de rotación de la agitación es 100 a 800 rpm y preferiblemente 200 a 400 rpm; el pH es 3,0 a 10,0 y preferiblemente 4,0 a 9,5.

La separación de un cuerpo celular preferiblemente se lleva a cabo por centrifugación, procedimiento de filtrado por membrana y similares. La separación de los componentes de bajo peso molecular tales como sales y azúcar se puede tratar con membranas de ultra centrifugación. De forma específica, tras el tratamiento con membranas de ultra centrifugación, la solución acuosa que contiene una lipasa se concentra hasta convertirse en ½ del volumen de la misma; y luego, se añade a la misma la misma cantidad de un tampón fosfato que la solución concentrada. Repitiendo estos procedimientos de una vez a 5 veces, se puede obtener una solución acuosa que contiene una lipasa, de la que se han separado los componentes de bajo peso molecular.

La centrifugación preferiblemente está controlada de 200 a 20.000 x g. La presión aplicada al filtro de membrana preferiblemente está controlada por membranas de microfiltración, la presión de filtro y similares para que sean no más de 3,0 kg/m^2. En caso de enzimas en el cuerpo celular, es preferible que la rotura celular se lleve a cabo por el homogenizador, el mezclador Waring, la rotura ultrasónica, la prensa Francesa, el molino de bola y similares; luego, los restos celulares se separan por centrifugación, el procedimiento de filtrado por membrana y similares. La velocidad de rotación del mezclador para agitar es 500 a 30.000 rpm y preferiblemente 1.000 a 15.000 rpm. La velocidad de rotación del mezclador Waring es 500 a 10.000 rpm y preferiblemente 1.000 a 5.000 rpm. El tiempo de agitación es 0,5 a 10 minutos y preferiblemente 1 a 15 minutos. Es preferible que la rotura ultrasónica se lleve a cabo bajo la condición de 1 a 50 KHz y más preferiblemente 10 a 20 KHz. Es preferible que el molino de bola tenga sedimentos de vidrio que tienen el diámetro de 0,1 a 0,5 mm.

En la presente invención, es preferible que la solución acuosa que contiene una lipasa sea la que contiene 5 a 30% en peso de lipasa como contenido sólido.

El contenido sólido de la leche animal añadida o la crema derivada de leche animal es preferiblemente 0,1 a 20 veces, más preferiblemente 0,3 a 10 veces, lo más preferiblemente 0,3 a 5 veces la masa del contenido sólido de la solución acuosa que contiene una lipasa.

Aquí, las concentraciones del contenido sólido en la solución acuosa que contiene una lipasa y el contenido sólido de la leche animal o la crema derivada de leche animal se puede determinar como Brix.% usando, por ejemplo, el analizador de contenido en azúcar (Refractómetro) (CIS Corporation, Ltd.: BRX-242).

Es preferible que el pH de la solución acuosa que contiene una lipasa se ajuste al intervalo de 6 a 7,5 tras añadir leche animal o crema derivada de leche animal. En particular, el pH preferiblemente está ajustado a 7,0 o menos, más

preferiblemente el intervalo de 6,5 a 7,0. Aunque es preferible que el ajuste de pH se lleve a cabo inmediatamente antes de la etapa de secado tal como deshidratación por aspersión, el ajuste de pH se puede llevar a cabo en cualquier etapa previa. Es posible que el pH de la solución acuosa que contiene una lipasa se ajuste preliminarmente de manera que el pH inmediatamente antes de la etapa de secado está en el intervalo mencionado más arriba. Aunque es posible que se usen varios compuestos químicos alcalinos y ácidos en la etapa de ajuste del pH, es preferible usar un hidróxido de metal alcalino tal como hidróxido sódico.

En algunos estadios antes del proceso de secado, se puede concentrar la solución acuosa que contiene una lipasa. Los métodos de concentración no están particularmente limitados e incluyen evaporador, evaporador por vacío, la concentración por ultrafiltración, la concentración por microfiltración, precipitación por sales con sales inorgánicas, métodos de precipitación con disolventes, métodos de absorción con celulosa de intercambio iónico y similares, y métodos de absorción de agua con geles que absorben agua. Entre estos, la concentración por ultrafiltración y el evaporador son los preferidos. El módulo para la concentración por ultrafiltración es preferiblemente una membrana plana o una membrana de fibra hueca que tiene un peso molecular fraccionado de 3.000 a 100.000 y más preferiblemente 6.000 a 50.000. Los materiales de la membrana son preferiblemente poliacrilonitrilo, polisulfónico y similares.

Es preferible que la deshidratación por aspersión se lleve a cabo por deshidratadores por aspersión tales como flujo de boquilla a contracorriente, flujo de disco a contracorriente, flujo de boquilla simultáneo y flujo de disco simultáneo, y el flujo de disco simultáneo es más preferible. La deshidratación por aspersión preferiblemente se controla como sigue: la velocidad de rotación del atomizador es 4.000 a 20.000 rpm; y la calefacción es 100 a 200ºC para la temperatura de entrada y 40 a 100ºC para la temperatura de salida.

La deshidratación por congelación también es preferible, por ejemplo, es preferible que la deshidratación por congelación se lleve a cabo por una deshidratación por congelación del tipo escalonada en bandejas con una máquina de deshidratación por congelación para cantidades pequeñas, que son del tamaño usadas en el laboratorio. Además, el polvo de lipasa se puede preparar secando bajo presión reducida.

El polvo de lipasa así preparado se puede usar tal cual. Sin embargo, es preferible, desde el punto del vista del manejo, que se use como una composición de lipasa donde el polvo de lipasa esté sumergido o impregnado en aceite graso. Aquí, la masa del aceite graso en la composición de lipasa es preferiblemente 0,1 a 20 veces y más preferiblemente 1 a 20 veces la masa del polvo de lipasa.

La composición de lipasa se puede obtener fácilmente añadiendo aceite graso al polvo de lipasa producido por deshidratación por aspersión y similares; y luego, agitando uniformemente la mezcla con un agitador de un motor tres-uno, o similar. También se puede obtener fácilmente añadiendo previamente el aceite graso a una región de recuperación del polvo de un deshidratador por aspersión; agitando uniformemente la mezcla tras la recuperación; y luego, separando el aceite graso en exceso por filtración.

Los ácidos grasos para sumergir o infiltrar el polvo de lipasa no están particularmente limitados. Éstos incluyen aceites vegetales tales como aceite de canela, aceite de soja, aceite de girasol de alto contenido oleico, aceite de oliva, aceite de alazor, aceite de maíz, aceite de palma y aceite de semilla de sésamo; triacilgliceroles tales como trioleína (trioleato de glicerol), tricaprilina (trioctanoato de glicerol), triacetina (triacetato de glicerol) y tributirina (tributirato de glicerol); y la mezcla de uno o más de los mismos tal como éster graso y éster de esterol.

En el caso de que la lipasa es una lipasa 1, 3-específica, en particular, una lipasa derivada de *Rhizomucor sp.* y *Alcaligenes sp.*, la selectividad 1, 3 de dicha lipasa está extremadamente mejorada según la presente invención. Por ello, dicho polvo de lipasa se puede usar de forma adecuada como una lipasa para trans-esterificación y para esterificación. La trans-esterificación del aceite graso y similar, trans-esterificación del ácido graso y el éster de ácido graso, trans-esterificación de alcoholisis y ácido lisis, o esterificación de glicerina y ácido graso se pueden llevar a cabo de forma eficaz por el método normal usando el polvo de lipasa.

La presente invención proporciona un polvo de lipasa que tiene actividad y estabilidad mejoradas. En el caso en el que la lipasa es lipasa 1, 3-específica, la selectividad 1, 3 de una lipasa 1, 3-específica está extremadamente mejorada, y el resto de ácido graso que está localizado en la segunda posición del triglicérido como material en crudo puede ser mantenido en la fabricación de la trans-esterificación en un porcentaje extremadamente alto.

Los Ejemplos siguientes además ilustrarán la presente invención en detalle.

Ejemplo 1

Se separaron los componentes de bajo peso molecular usando el módulo UF (ASAHI KASEI CHEMICALS CORPORATION: SIP-0013) a partir de una lipasa líquida (Nombre de Marca: Palatasa 2000L) de Novozymes Japan Ltd, en la que la lipasa derivada de *Rhizomucor miehei* se disolvió y dispersó en una solución acuosa para obtener una solución acuosa 1 que contiene una lipasa (la concentración del contenido sólido: 20,1% en peso). Específicamente, la lipasa líquida (Palatasa 2000L) se trató con módulos de ultrafiltración bajo enfriamiento con hielo y se concentró hasta ½ del volumen de la misma. Luego, se añadió a la misma, la misma cantidad de un tampón fosfato 0,001M (pH 7) que

la solución concentrada. Para la misma solución obtenida, los mismos procedimientos de ultrafiltración y la adición de un tampón fosfato se llevaron a cabo dos veces y luego, se llevó a cabo ultrafiltración adicional para obtener una solución concentrada de lipasa como la solución acuosa 1 que contiene una lipasa.

A 20 ml de la solución acuosa 1 que contiene lipasa, se añadieron 20 ml de leche de vaca (disponible en Koiwai Dairy Products Co. Ltd., "Koiwai Gyu-nyu Oishisa Shitate", la concentración del contenido sólido: 12,9% en peso). El pH de la solución así obtenida se ajustó con una solución acuosa de hidróxido sódico para alcanzar el pH 6,8 a 6,9.

La relación de volumen de la solución concentrada de lipasa (= la solución acuosa 1 que contiene una lipasa) con respecto a la leche de vaca es 1:1. El contenido sólido de la leche de vaca es 0,64 veces la masa del contenido sólido de la solución acuosa 1 que contiene una lipasa.

Luego, la solución se pulverizó usando un deshidratador por aspersión (SD-1000: TOKIO RIKAKIKI Co., Ltd.) bajo las condiciones de temperatura de entrada: 130ºC, el contenido de aire para secar: 0,7 a 1,1 m^3/min, y presión de pulverización: 11 a 12 kpa para obtener polvo de lipasa. La forma del polvo de lipasa así obtenido era esférica, 90% en peso o más del polvo de lipasa tiene un tamaño de partícula de 1 a 100 μm y el tamaño medio de partícula del mismo era 7,6 μm. El tamaño de partícula se determinó por Analizador de Distribución del Tamaño de Partícula (LA-500) de HORIBA, Ltd.

La concentración del contenido sólido de la solución acuosa que contiene una lipasa y la concentración del contenido sólido de la leche de vaca se determinaron por el siguiente método.

Las concentraciones se determinaron como Brix.% usando el analizador de contenido en azúcar (Refractómetro) (CIS Corporation.: BRX-242).

Ejemplo 2

A la solución concentrada de lipasa obtenida en el Ejemplo 1, se añadió la misma cantidad de agua que de la solución concentrada para obtener la solución acuosa 2 que contiene una lipasa (la relación de volumen de la solución concentrada de lipasa con respecto al agua fue 1:1). Para obtener el polvo de lipasa, se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 excepto que se usó la solución acuosa 2 que contiene una lipasa en lugar se la solución acuosa 1 que contiene una lipasa. La relación de volumen de la solución concentrada de lipasa:agua:leche fue 0,5:0,5:1. El contenido sólido de la leche de vaca fue 1,05 veces la masa del contenido sólido de la solución acuosa (UF) que contiene una lipasa.

Ejemplo 3

A la solución concentrada de lipasa obtenida en el Ejemplo 1, se añadió la misma cantidad de tampón fosfato 0,01 M (pH 7) que de la solución concentrada, para obtener la solución acuosa 3 que contiene una lipasa (la relación de volumen de la solución concentrada de lipasa con respecto al tampón fue 1:1). Para obtener el polvo de lipasa, se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 excepto que se usó la solución acuosa 3 que contiene una lipasa en lugar de la solución acuosa 1 que contiene una lipasa. La relación de volumen de la solución concentrada de lipasa:tampón fosfato:leche de vaca fue 0,5:0,5:1. El contenido sólido de la leche de vaca fue 1,03 veces la masa del contenido sólido de la solución acuosa que contiene una lipasa.

Ejemplo 4

A la solución concentrada de lipasa obtenida en el Ejemplo 1, se añadió la misma cantidad de tampón fosfato 0,01 M (pH 8) que de la solución concentrada, para obtener la solución acuosa 4 que contiene una lipasa (la relación de volumen de la solución concentrada de lipasa con respecto al tampón fue 1:1). A 20 ml de la solución acuosa 4 que contiene una lipasa, se añadieron 10 ml de leche de vaca (disponible en Koiwai Dairy Products Co., Ltd., "Koiwai Gyu-nyu Oisisa Shitate": la concentración del contenido sólido es 12,9% en peso). El pH de la solución así obtenida se ajustó con una solución acuosa de hidróxido sódico para alcanzar el pH 6,8 a 6,9. La relación de volumen de la solución concentrada de lipasa:tampón fosfato:leche de vaca fue 0,5:0,5:0,5. El contenido sólido de la leche de vaca fue 0,52 veces la masa del contenido sólido de la solución acuosa que contiene una lipasa.

A partir de entonces, se obtuvo un polvo de lipasa como el Ejemplo 1.

Ejemplo 5

A la solución concentrada de lipasa obtenida en el Ejemplo 1, se añadió la misma cantidad de tampón fosfato 0,01 M (pH 8) que de la solución concentrada, para obtener la solución acuosa 5 que contiene una lipasa (la relación de volumen de la solución concentrada de lipasa con respecto al tampón fue 1:1). A 20 ml de la solución acuosa 5 que

contiene una lipasa, se añadieron 2 ml de crema fresca (Nombre de Marca: Hokkaido Junsei Cream 35; disponible en Takanashi Milk Co., Ltd.,: la concentración del contenido sólido es 42% en peso). El pH de la solución así obtenida se ajustó con una solución acuosa de hidróxido sódico para alcanzar el pH 6,8 a 6,9.

La relación de volumen de la solución concentrada de lipasa:tampón fosfato:crema fresca fue 0,5:0,5:0,5. El contenido sólido de la leche de vaca fue 0,34 veces la masa del contenido sólido de la solución acuosa que contiene una lipasa.

A partir de entonces, se obtuvo un polvo de lipasa como el Ejemplo 1.

Ejemplo 6

A la solución concentrada de lipasa obtenida en el Ejemplo 1, se añadió la misma cantidad de tampón fosfato 0,01 M (pH 8) que de la solución concentrada, para obtener la solución acuosa 6 que contiene una lipasa (la relación de volumen de la solución concentrada de lipasa con respecto al tampón fue 1:1). A 20 ml de la solución acuosa 6 que contiene una lipasa, se añadieron 20 ml de leche de vaca Jersey (Leche Aso Shokoku Jersey 4,5; disponible en Aso Agriculture Corporative Association; la concentración del contenido sólido es 13,2% en peso). El pH de la solución así obtenida se ajustó con una solución acuosa de hidróxido sódico para alcanzar el pH 6,8 a 6,9.

La relación de volumen de la solución concentrada de lipasa:tampón fosfato:leche de vaca fue 0,5:0,5:0,5. El contenido sólido de la leche de vaca fue 1,06 veces la masa del contenido sólido de la solución acuosa que contiene una lipasa. A partir de entonces, se obtuvo un polvo de lipasa como el Ejemplo 1.

Ejemplo 7

Se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 excepto que la deshidratación por aspersión se llevó a cabo como medio de pulverización en lugar de deshidratación por aspersión para obtener polvo de lipasa. La deshidratación por aspersión se llevó a cabo como sigue. Una solución acuosa que contiene una lipasa cuyo pH se ajustó a 6,8 a 6,9 se vertió dentro de un matraz de recuperación y se congeló por hielo seco de metanol. Luego, el material congelado se deshidrató por aspersión usando un deshidratador por aspersión (FDU-830) de TOKIO RIKAKIKAI CO, LTD a 0,15 Torr durante 1 a 2 días. Tras secarlo, el resultado fue ligeramente prensado en un mortero para obtener polvo de lipasa.

Ejemplo comparativo 1

Para obtener un polvo de lipasa, se llevó a cabo el mismo procedimiento que el Ejemplo 3 excepto que no se añadió la leche de vaca. La relación de volumen de la solución concentrada de lipasa con respecto al tampón fue 1:1.

La actividad del polvo de lipasa así obtenido se determinó por el siguiente método. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Actividad lipasa

Al aceite obtenido mezclando trioleína con tricaprilina en la proporción 1:1 (p), se añadió un polvo de lipasa y luego, la reacción de los mismos se llevó a cabo a 60ºC. Se tomaron 10 μl de muestra con intervalo de tiempo, y se diluyeron con 1,5 ml de hexano y luego, se obtuvo como muestra para análisis en cromatografía de gases una solución a partir de la cual se filtró el polvo de lipasa. La muestra se analizó por cromatografía de gases (columna: DB - 1ht) para obtener la relación de reacción de la misma basada en las siguientes fórmulas. Las condiciones del análisis de cromatografía de gases fueron las siguientes: Temperatura de columna: empezando en 150ºC, aumento de temperatura 150ºC/min., final 370ºC; otras condiciones fueron las mismas que las de la siguiente determinación de selectividad 1, 3.

$$\text{Ritmo de reacción (\%)} = \{\text{área C24} + \text{área C34)}\} \times 100$$

Donde "C24" denota tricaprilina, "C34" denota tricaprilna en la que se ha sustituido un ácido graso por C18, y "área" es dimensiones de área de la misma.

La constante de ritmo de reacción K se determinó a partir de ritmos de reacción de cada muestra en cada tiempo usando el software de análisis (orijin ver. 6.1). La actividad lipasa se expresó como un valor relativo cuando el valor de K del Ejemplo Comparativo 1 era 100.

TABLA 1

Condición (Relación de Volumen)	Actividad Relativa
Ejemplo Comparativo 1	
Solución concentrada de lipasa:tampón (7) = 1:1	100
Ejemplo 1	
Solución concentrada de lipasa:leche de vaca = 1:1	563
Ejemplo 2	
Solución concentrada de lipasa:Agua:Leche de vaca = 0,5:0,5:1	438
Ejemplo 3	
Solución concentrada de lipasa:tampón (7):Leche de vaca = 0,5:0,5:1	373
Ejemplo 4	
Solución concentrada de lipasa:tampón (8):Leche de vaca = 0,5:0,5:0,5	428
Ejemplo 5	
Solución concentrada de lipasatampón (8):Crema = 0,5:0,5:1	355
Ejemplo 6	
Solución concentrada de lipasa:tampón (8):Leche de vaca = 0,5:0,5:1	435
Ejemplo 7	
Solución concentrada de lipasa: Leche de vaca = 1:1 (liofilizada)	435

En la Tabla 1, "tampón (7)" denota tampón fosfato 0,01 M (pH 7) y "tampón (8)" denota tampón fosfato 0,01 M (pH 8). Excepto para el Ejemplo 7, se llevó a cabo la etapa de deshidratación por aspersión.

Está claro por los resultados mostrados en la Tabla 1 que la actividad lipasa está extremadamente mejorada según la presente invención.

La selectividad 1, 3 de cada Ejemplo 1, Ejemplo 7 y Ejemplo Comparativo 1 se determinó por el siguiente método.

Determinación de selectividad 1, 3

Se usaron como sustratos de reacción 1 mol de GLICERIL-1,3-PALMITATO-2-OLEATO (POP) y 3 moles de OCTANOICO ETILO (C8Et). Se añadió polvo de lipasa a los mismos en los cuales las actividades enzimáticas se volvieron 0,5 a 5% en peso de los sustratos. La reacción se llevó a cabo a 60ºC y se tomaron muestras de la misma con un lapso de tiempo y se diluyeron con hexano. El análisis GC se llevó a cabo en las muestras, y se obtuvieron los ritmos de reacción de la posición 1.3 (C16:0Et) y la segunda posición (C18:1Et) por las siguientes fórmulas.

$$C16:0Et(\%) = \{\text{área } C16:0Et/(\text{área } C16Et + C18:1Et + \text{área}C8Et)\} \times 100$$

$$C18:0Et(\%) = \{\text{área } C18:1Et/(\text{área } C16Et + C18:1Et + \text{área}C8Et)\} \times 100$$

La constante de ritmo de reacción se determinó a partir de los ritmos de reacción de cada muestra en cada tiempo usando el software de análisis (orijin ver. 6.1). En este tiempo, el valor del ritmo de la reacción final es cambiante. La reactividad de la posición 1.3 se calculó cuando la reactividad de la segunda posición se consideró como 1.

Condiciones GC

Columna	DB-1ht 5 m
Ritmo de inyección	1 μl
Gas portador	Helio
Temperatura en la cámara de vaporización	360ºC
Temperatura del detector	370ºC
Temperatura de la columna	Empezando en 50ºC, aumento de temperatura 5ºC/min, final 360ºC.

Los resultados se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

Condición (Relación de Volumen)	Selectividad 1,3
Ejemplo Comparativo 1	
Solución concentrada de lipasa:tampón (7) = 1:1	20,8
Ejemplo 1	
Solución concentrada de lipasa:Leche de vaca = 1:1	31,1
Ejemplo 7	
Solución concentrada de lipasa:Leche de vaca = 1:1 (liofilizada)	22,7

De los resultados mostrados en la Tabla 2, se encontró que la selectividad 1,3 de la lipasa 1, 3-específica está extremadamente mejorada según la presente invención.

La estabilidad de cada polvo de lipasa obtenido por el Ejemplo 1 y el Ejemplo Comparativo 1 se determinó por el siguiente método.

Método de ensayo de estabilidad

Se llevó a cabo la reacción usando 5 g de tricaprilina y 5 g de trioleína a 60ºC durante 24 a 72 horas. Se determinaron los niveles de disminución inicial de la actividad para cada conjunto y se calculo el periodo de semi-vida a partir del tiempo total de reacción y el nivel decreciente de actividad.

Como resultado, el periodo de semi-vida del polvo de lipasa obtenido por el Ejemplo 1 fue 913horas y el del Ejemplo Comparativo 1 fue 234 horas. Por lo tanto, la estabilidad del polvo de lipasa según la presente invención se mejoró dos veces o más.

Ejemplo 8

Se suspendió en agua un polvo de lipasa de Meito Sangyo Co., Ltd. (nombre de Marca: Lipasa QL, derivada de *Alcaligenes sp.*) para obtener una solución acuosa que contiene una lipasa (la concentración del contenido sólido: 2,0% en peso). A 20 ml de la solución acuosa que contiene una lipasa, se añadieron 2 ml de leche de vaca (disponible en Koiwai Dairy Products Co. Ltd., "Koiwai Gyu-nyu Oishisa Shitate", la concentración del contenido sólido es 12,92% en peso). La relación de volumen de la solución acuosa que contiene una lipasa con respecto a la leche de vaca era 10:1, y el contenido sólido del a leche de vaca era 0,65 veces la masa del contenido sólido de la solución acuosa que contiene una lipasa. El pH de la solución así obtenida se ajustó con una solución acuosa de hidróxido sódico para alcanzar el pH 6,8 a 6,9.

Esta solución se pulverizó usando un deshidratados por aspersión (SD-1000: TOKIO RIKAKIKAI Co., Ltd.) bajo las condiciones de temperatura de entrada: 130ºC, el contenido de aire para secar: 0,7 a 1,1 m^3/min, y presión de pulverización: 11 a 12 kpa para obtener un polvo de lipasa. La forma del polvo de lipasa así obtenido era esférica, 90% en peso o más del polvo de lipasa tiene un tamaño de partícula de 1 a 100 μm y el tamaño medio de partícula del mismo era 35 μm. El tamaño de partícula se determinó por un analizador de Distribución de Tamaño de Partícula (LA-500) de HORIBA, Ltd.

Ejemplo comparativo 2

Para obtener un polvo de lipasa, se llevó a cabo el mismo procedimiento de deshidratación por aspersión del Ejemplo 8 excepto que no se añadió leche de vaca.

La actividad lipasa de estos polvos de lipasa se determinó y expresó como un valor relativo cuando la actividad del polvo de lipasa del Ejemplo Comparativo 1 era 100. Los resultados, como un todo, se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3

Condición (Relación de Volumen)	Selectividad 1,3
Ejemplo Comparativo 2	
Solución acuosa que contiene una lipasa sola	17,3
Ejemplo 8	
Solución acuosa que contiene una lipasa:Leche de vaca = 10:1	31,1

De los resultados mostrados en la tabla 3, está claro que la actividad lipasa está mejorada aproximadamente dos veces según la presente invención.

Ejemplo 9

Se añadió cinco veces su cantidad de semilla de colza al polvo de lipasa obtenido en el Ejemplo 1, el polvo de lipasa se sumergió en el aceite de semilla de colza y se separó una cantidad excesiva de grasa por filtración para preparar una composición de lipasa que contiene un polvo de lipasa/aceite de semilla de colza en la proporción de 55/45% en peso.

Ejemplo comparativo 3

Se resuspendió en agua en una concentración de 5% en masa una lipasa como polvo (liofilizada) (Lipasa D "Amano") de Amaro Enzyme Co., Ltd., que deriva de *Rhizopus oryzae* y la suspensión se pulverizó usando un deshidratador por aspersión (SD-1000: TOKIO RIKAKIKAI Co., Ltd.) bajo las condiciones de temperatura de entrada: 130ºC, el contenido de aire para secar: 0,7 a 1,1 m^3/min, y presión de pulverización: 11 a 12 kpa para obtener un polvo de lipasa.

Ejemplo 10

La misma lipasa como polvo (liofilizada) (Lipasa D "Amano") usada en el Ejemplo Comparativo 3 se resuspendió en agua en una concentración de 5% en masa, y a 5 ml de la solución de lipasa se añadieron 10 ml de leche de vaca (disponible en Meiji Diaries Co., Ltd., "Meiji Oishii Gyu-nyu", la concentración del contenido sólido: 12,9% en masa). El resultado se pulverizó usando un deshidratador por aspersión (SD-1000: TOKIO RIKAKIKAI Co., Ltd.) bajo las condiciones de temperatura de entrada: 130ºC, el contenido de aire para secar: 0,7 a 1,1 m^3/min, y presión de pulverización: 11 a 12 kpa para obtener un polvo de lipasa.

Ejemplo 11

La misma lipasa como polvo (liofilizada) (Lipasa D "Amano") usada en el Ejemplo Comparativo 3 se resuspendió en agua en una concentración de 5% en masa. A 5 ml de la solución de lipasa se añadieron 10 ml de leche de vaca (disponible en Meiji Diaries Co., Ltd., "Meiji Oishii Gyu-nyu", la concentración del contenido sólido: 12,9% en masa). La solución de lipasa se añadió de una manera escalonada a 150 ml de etanol previamente enfriado a 0ºC o menos para

obtener el precipitado. El precipitado obtenido se recogió por una máquina de centrífuga (Beckman Co., Ltd.: GS-6KR) bajo la condición de 3000 rpm durante 10 minutos y luego, la etapa de secado se llevó a cabo bajo una presión reducida por una máquina de secado (disponible por TOKIO RIKAKIKAI Co., Ltd.: FDU-830) durante16 a 20 horas para obtener un polvo de lipasa.

La actividad lipasa de estos polvos de lipasa se determinó para expresar como un valor relativo cuando la actividad de polvo de lipasa del Ejemplo Comparativo 3 era 100. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4

	Actividad relativa
Ejemplo Comparativo 3 Lipasa D al 5% → deshidratada por aspersión	100
Ejemplo 10 Lipasa D al 5%:leche de vaca = 1:2 → deshidratada por aspersión	16360
Ejemplo 11 Lipasa D al 5%:leche de vaca = 1:2 → precipitación con etanol	8420

De los resultados mostrados en la Tabla 4, se encuentra que la actividad lipasa está extremadamente mejorada según la presente invención.

Ejemplo comparativo 4

Se resuspendió en agua en un 15% de concentración en masa una lipasa como polvo (Lipasa F-AP15) de Amano Enzyme Co., Ltd., que deriva de *Rhizopus oryzae* y la suspensión se pulverizó usando un deshidratador por aspersión (SD-1000: TOKIO RIKAKIKAI Co., Ltd.) bajo las condiciones de temperatura de entrada: 130ºC, el contenido de aire para secar: 0,7 a 1,1 m^3/min, y presión de pulverización: 11 a 12 kpa para obtener un polvo de lipasa.

Ejemplo 12

El mismo polvo de lipasa (Lipasa F-AP15) que se usó en el Ejemplo Comparativo 4 se resuspendió en agua en una concentración del 15% en peso, y a 10 ml de la solución de lipasa se añadieron 10 ml de leche de vaca (disponible en Meiji Dairies Co., Ltd., "Meiji Oishii Gyu-nyu", la concentración del contenido sólido: 12,9% en masa). Lo resultante se pulverizó usando un deshidratador por aspersión (SD-1000: TOKIO RIKAKIKAI Co., Ltd.) bajo las condiciones de temperatura de entrada: 130ºC, el contenido de aire para secar: 0,7 a 1,1 m^3/min, y presión de pulverización: 11 a 12 kpa para obtener un polvo de lipasa.

La actividad lipasa de estos polvos de lipasa se determinó para expresar como un valor relativo cuando la actividad de polvo de lipasa del Ejemplo Comparativo 3 era 100. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

TABLA 5

	Actividad relativa
Ejemplo Comparativo 4: Lipasa F-AP15 al 15% → deshidratada por aspersión	100
Ejemplo 12: Lipasa F-AP15 al 15%:Leche de vaca = 1:1 → deshidratada por aspersión	3700

De los resultados mostrados en la Tabla 5, se encuentra que la actividad lipasa está extremadamente mejorada según la presente invención.

Ejemplo comparativo 5

Una lipasa líquida (nombre de Marca: Lipozyme T1 100L) de Novozymes Japan Ltd., que deriva de *Thermomyces lanugenousus* se pulverizó usando un deshidratador por aspersión (SD-1000: TOKIO RIKAKIKAI Co., Ltd.) bajo las condiciones de temperatura de entrada: 130ºC, el contenido de aire para secar: 0,7 a 1,1 m^3/min, y presión de pulverización: 11 a 12 kpa para obtener un polvo de lipasa.

Ejemplo 13

A la misma lipasa líquida (nombre de Marca: Lipozyme T1 100L) que se usó en el Ejemplo Comparativo 5, se añadieron 5 ml de leche de vaca (disponible en Meiji Dairies Co., Ltd.,"Meiji Oishii Gyu-nyu", la concentración del contenido sólido: 12,9% en masa). La solución de lipasa se pulverizó usando un deshidratador por aspersión (SD-1000: TOKIO RIKAKIKAI Co., Ltd.) bajo las condiciones de temperatura de entrada: 130ºC, el contenido de aire para secar: 0,7 a 1,1 m^3/min, y presión de pulverización: 11 a 12 kpa para obtener un polvo de lipasa.

Ejemplo comparativo 6

10 ml de la misma lipasa líquida (nombre de Marca: Lipozyme T1 100L) que se usó en el Ejemplo Comparativo 5 se añadieron de manera escalonada a 60 ml de etanol previamente enfriado a 0ºC o menos para obtener el precipitado. El precipitado obtenido se recogió por una máquina de centrífuga (Beckman Co., Ltd.: GS-6KR) bajo la condición de 3000 rpm durante 10 minutos y luego, la etapa de secado se llevó a cabo bajo una presión reducida por una máquina de secado (disponible por TOKIO RIKAKIKAI Co., Ltd.: FDU-830) durante16 a 20 horas para obtener un polvo de lipasa.

Ejemplo 14

A 1 ml de la misma lipasa líquida (nombre de Marca: Lipozyme T1 100L) que se usó en el Ejemplo Comparativo 5 se añadieron 10 ml de leche de vaca (disponible en Meiji Dairies Co., Ltd., "Meiji Oishii Gyu-nyu", la concentración del contenido sólido: 12,9% en masa). La solución de lipasa se añadió de manera escalonada a 60 ml de etanol previamente enfriado a 0ºC o menos para obtener el precipitado. El precipitado obtenido se recogió por una máquina de centrífuga (Beckman Co., Ltd.: GS-6KR) bajo la condición de 3000 rpm durante 10 minutos y luego, la etapa de secado se llevó a cabo bajo una presión reducida por una máquina de secado (disponible por TOKIO RIKAKIKAI Co., Ltd.: FDU-830) durante16 a 20 horas para obtener un polvo de lipasa.

La actividad lipasa de estos polvos de lipasa se determinó para expresar como un valor relativo cuando la actividad de polvo de lipasa del Ejemplo Comparativo 3 era 100. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

TABLA 6

	Actividad relativa
Ejemplo Comparativo 5: T1 100L → deshidratada por aspersión	100
Ejemplo 13: T1 100L:Leche de vaca = 1:10 (ml) → deshidratada por aspersión	5200
Ejemplo Comparativo 6: T1 100L → precipitación por etanol	0
Ejemplo 14: T1 100L:Leche de vaca = 1:10 (ml) → precipitación por etanol	8580

De los resultados mostrados en la Tabla 6, se encuentra que la actividad lipasa está extremadamente mejorada según la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Un polvo de lipasa que es un producto granulado que contiene lipasa 1,3 específica derivada de *Rhizomucor sp.* o *Alcaligenes sp.* y un contenido sólido de leche animal, obtenido añadiendo leche animal o crema derivada de leche animal a una solución acuosa que contiene una lipasa 1,3-específica, ajustando el pH de la solución acuosa que contiene la lipasa 1,3-específica a un valor de 6 a 7,5 tras añadir la leche animal o la crema derivada de leche animal a esta, y deshidratando por aspersión la mezcla del mismo.

2. El polvo de lipasa según la reivindicación 1, donde la lipasa 1,3-específica es una lipasa 1,3-específica derivada de *Rhizomucor miehei.*

3. El polvo de lipasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde el contenido sólido de leche animal es un contenido sólido de leche de vaca o crema derivada de leche de vaca.

4. El polvo de lipasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que tiene un contenido en agua de 10% en peso o menos.

5. El polvo de lipasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el 90% en peso o más del polvo de lipasa tiene un tamaño de partícula de 1 a 100 μm.

6. Una composición de lipasa donde el polvo de lipasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 está sumergido o impregnado en aceite graso.

7. La composición de lipasa según la reivindicación 6, donde la masa del aceite graso en la composición de lipasa es 0,1 a 20 veces la masa del polvo de lipasa.

8. Un método para producir un polvo de lipasa que comprende añadir leche animal o crema derivada de leche animal a una solución acuosa que contiene una lipasa 1,3-específica derivada de *Rhizomucor sp.* o *Alcaligenes sp.*, ajustar el pH de la solución acuosa que contiene la lipasa 1,3-específica a un valor de 6 a 7,5 tras añadir la leche animal o crema derivada de leche animal a esta, y deshidratar por aspersión el mismo.

9. El método según la reivindicación 8, donde el contenido sólido de la leche animal o crema derivada de leche animal añadida es 0,1 a 20 veces la masa del contenido sólido de la solución acuosa que contiene una lipasa.

10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, donde la solución acuosa que contiene una lipasa es una solución de cultivo de lipasa, o una solución de cultivo purificada de la misma.

11. Una lipasa para la trans-esterificación o esterificación que contiene el polvo de lipasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

12. Un método de trans-esterificación de aceite graso, que comprende usar la lipasa para la trans-esterificación según la reivindicación 11.