



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 267 856**

51 Int. Cl.:

**C12P 1/00** (2006.01)

**C12N 9/00** (2006.01)

**C12P 19/04** (2006.01)

**C12P 19/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01993696 .2**

86 Fecha de presentación : **07.11.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1332221**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **06.08.2003**

54 Título: **Catálisis enzimática en presencia de líquidos iónicos.**

30 Prioridad: **08.11.2000 EP 00124195**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.03.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2007**

73 Titular/es: **Solvent Innovation GmbH**  
**Nattermannallee 1**  
**50829 Köln, DE**

72 Inventor/es: **Kragl, Udo;**  
**Kaftzik, Nicole;**  
**Schöfer, Sonja y**  
**Wasserscheid, Peter**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 267 856 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

Catálisis enzimática en presencia de líquidos iónicos.

5 El invento se refiere a unas composiciones que comprenden una enzima así como líquidos iónicos, así como a un procedimiento para la realización de reacciones catalizadas por enzimas en presencia de líquidos iónicos.

10 Las enzimas han ocupado como biocatalizadores, entretanto, un puesto fijo para reacciones a las escalas de laboratorio e industrial. No obstante, a pesar de todos los éxitos en el caso de reacciones enzimáticas siguen apareciendo todavía problemas, tales como por ejemplo

- bajas productividades a causa de unas solubilidades demasiado pequeñas de los productos de partida;
- bajos rendimientos en el caso de reacciones en equilibrio;
- 15 - insuficiente selectividad en el caso de reacciones regio- o estereo-selectivas;
- inhibición de los productos;
- 20 - aparición de reacciones secundarias (reacciones paralelas y secuenciales).

Se conocen ciertos enfoques para resolver estos problemas mediante adición de disolventes orgánicos (G. Carrea, S. Riva, *Angew. Chem.* 2000, 112, 2312; J. M. S. Cabral, M. R. Aires-Barros, H. Pinheiro, D. M. F. Prazeres, J. *Biotechnol.* 1997, 59, 133; M. N. Gupta, *Eur. J. Biochem.* 1992, 203, 25), mediante adición de sales (A. M. Blinkorsky, Y. L. Khmelnitzky, J. S. Dordick, *J. Am. Chem. Soc.* -1999, 116, 2697) o mediante realización de la reacción en micro-emulsiones (B. Orlich, R. Schomäcker 1999, 65, 357-362). Con frecuencia, sin embargo, las mejoras conseguidas de esta manera no son significativas y no justifican el gasto adicional, o la actividad enzimática disminuye grandemente en estas condiciones (G. Carrea, S. Riva, *Angew. Chem.* 2000, 112, 2312).

30 Los líquidos iónicos son sales que funden a bajas temperaturas (<100°C), que constituyen una nueva clase de disolventes con carácter iónico, no molecular. Aún cuando ya desde 1914 se conocen unos primeros representantes, tan sólo en los últimos 15 años se están investigando intensamente líquidos iónicos como disolventes para reacciones químicas. Los líquidos iónicos no poseen ninguna presión de vapor medible. Esto, desde el punto de vista de técnica de procedimientos, es una gran ventaja, puesto que de esta manera es posible la separación por destilación de una mezcla de reacción como un método efectivo para la separación de productos. No aparecen los conocidos problemas por causa de la formación de azeótropos entre disolventes y productos. Los líquidos iónicos son estables térmicamente a unas temperaturas hasta por encima de 200°C. Mediante elección apropiada de un catión y de un anión es posible un ajuste escalonado de la polaridad, y por consiguiente una adaptación de las propiedades de solubilidad. La amplitud de banda se extiende en tal caso desde líquidos iónicos miscibles con agua, pasando por los que no son miscibles con agua, hasta llegar a los que forman dos fases incluso con disolventes orgánicos. El aprovechamiento conveniente de las extraordinarias propiedades de solubilidad es la clave para el empleo con éxito de los líquidos iónicos como una nueva clase de disolventes.

45 Se pudieron emplear ya con éxito líquidos iónicos como nuevos medios en la catálisis en dos fases o como un medio para la extracción de líquido - líquido (P. Wasserscheid, W. Keim, *Angew. Chem.* 2000, 12, 3926).

50 Sorprendentemente, se comprobó conforme al invento, en el caso de la reacción de los más diferentes productos de partida con diversas enzimas, en presencia de líquidos iónicos, una fuerte elevación del rendimiento y de la selectividad, que constituye una manifiesta mejoría en comparación con el estado conocido de la técnica. No se comprobaron repercusiones desventajosas del líquido iónico sobre la estabilidad de las enzimas, e incluso en algún caso individual se encontró un efecto estabilizador.

55 Esto es inesperado y sorprendente, si se considera la naturaleza iónica de los líquidos iónicos y las fuertes interacciones, que son posibles de esta manera, entre el líquido iónico y la enzima con sus grupos asimismo cargados.

Asimismo, se encontró que se pueden emplear líquidos iónicos como disolventes concomitantes (co-disolventes) para el mejoramiento de la solubilidad de los productos de partida (eductos) y de los productos.

60 Alston y colaboradores divulgan en *Book of Abstracts*, 217<sup>th</sup> ACS National Meeting, Anaheim, Calif., 21-25 de Marzo (1999) BIOT-131, publicador: American Chemical Society, Washington D. C., la reacción de subtilisina y quimiotripsina (en cada caso enzimas de la clase EC 3.4) en el seno de tetrafluoroborato de 1-butil-3-metil-imidazolio.

65 Cull y colaboradores describen en *Biotechnol. Bioeng.* (2000), 69(2), 227-233, la biotransformación, catalizada mediante *Rhodococcus* R312 (EC. 3.3.2.8), de 1,3-diciano-benceno en el seno de hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil-imidazolio.

## ES 2 267 856 T3

Erbeldinger y colaboradores divulgan en *Biotechnol. Prog.* (2000), 16(6), 1131-1133 la síntesis de Z-aspartamo en una reacción, catalizada mediante termolisina (EC. 3.4), de carbobenzoil-L-aspartato y del hidrocloreto del éster metílico de L-fenil-alanina en el seno de hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil-imidazolio.

5 Lau y colaboradores divulgan en *ORG. LETT.* (2000), 2(26), 4189-4191 reacciones catalizadas por la lipasa de *Candida antarctica* (EC. 3.1.1) en el seno de tetrafluoroborato de 1-butil-3-metil-imidazolio.

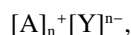
El invento se refiere a un procedimiento para la reacción de sustancias (productos de partida o eductos) en presencia de enzimas como catalizadores, en un medio de reacción que comprende líquidos iónicos.

10

El líquido iónico puede ser en este caso miscible con agua o no miscible con agua. Asimismo es posible una realización de la reacción en una, dos o más fases.

En el caso de los líquidos iónicos se trata de compuestos de la fórmula general

15



realizándose que

20

n es = 1 ó 2 y

el anión  $[Y]^{n-}$  se selecciona entre el conjunto que consiste en tetrafluoroborato ( $[BF_4]^-$ ), tetracloroborato ( $[BCl_4]^-$ ), hexafluorofosfato ( $[PF_6]^-$ ), hexafluoroantimoniato ( $[SbF_6]^-$ ), hexafluoroarseniato ( $[AsF_6]^-$ ), tetracloroaluminato ( $[AlCl_4]^-$ ), triclorozincato ( $[ZnCl_3]^-$ ), diclorocuprato, sulfato ( $[SO_4]^{2-}$ ), carbonato ( $[CO_3]^{2-}$ ), fluorosulfonato, ( $[R'-COO]^-$ ),  $[R'-SO_3]^-$  o  $[(R'-SO_2)_2N]^-$ , y

25

$R'$  es un radical alquilo alifático o alicíclico lineal o ramificado, que contiene de 1 a 12 átomos de carbono, o un radical arilo  $C_5-C_{18}$ , (aril- $C_5-C_{18}$ )-alquilo  $C_1-C_6$  o (alquil  $C_1-C_6$ )-arilo  $C_5-C_{18}$ , que puede estar sustituido con átomos de halógeno,

30

el catión  $[A]^+$  se selecciona entre

- cationes de amonio cuaternarios de la fórmula general

35



- cationes de fosfonio de la fórmula general

40



- cationes de imidazolio de la fórmula general

45



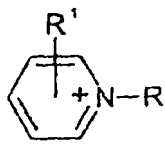
50

pudiendo el núcleo de imidazol estar sustituido con por lo menos un grupo, que está seleccionado entre grupos alquilo  $C_1-C_6$ , alcoxi  $C_1-C_6$ , amino-alquilo  $C_1-C_6$ , arilo  $C_5-C_{12}$  o (aril  $C_5-C_{12}$ )-alquilo  $C_1-C_6$ .

55

- cationes de piridinio de la fórmula general

60

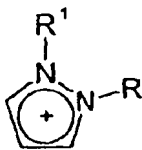


65

pudiendo el núcleo de piridina estar sustituido con por lo menos un grupo, que está seleccionado entre grupos alquilo  $C_1-C_6$ , alcoxi  $C_1-C_6$ , amino-alquilo  $C_1-C_6$ , arilo  $C_5-C_{12}$  o (aril  $C_5-C_{12}$ )-alquilo  $C_1-C_6$ ,

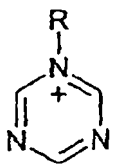
## ES 2 267 856 T3

- cationes de pirazolio de la fórmula general



10 pudiendo el núcleo de pirazol estar sustituido con por lo menos un grupo, que está seleccionado entre grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, amino-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub> o (aril C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub>)-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>,

- y cationes de triazolio de la fórmula general



20 pudiendo el núcleo de triazol estar sustituido con por lo menos un grupo, que está seleccionado entre grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, amino-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub> o (aril C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub>)-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>,

25 y los radicales R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan, independientemente unos de otros, entre el conjunto que consiste en

- hidrógeno,
- grupos alquilo alifáticos o alicíclicos, saturados o insaturados, lineales o ramificados, con 1 a 20 átomos de carbono;
- grupos heteroarilo o heteroaril-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> con 3 a 8 átomos de carbono en el radical heteroarilo y con por lo menos un heteroátomo seleccionado entre N, O y S, que pueden estar sustituidos con por lo menos un grupo seleccionado entre grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> y/o átomos de halógeno;
- grupos arilo o aril-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> con 5 a 12 átomos de carbono en el radical arilo, que pueden estar sustituidos con por lo menos un grupo alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> y/o un átomo de halógeno.

30

35 En un aspecto adicional, el invento se refiere a una composición que comprende una enzima así como por lo menos uno de los líquidos iónicos arriba definidos. Estas composiciones pueden servir como punto de partida para la realización de las reacciones catalizadas enzimáticamente, que antes se han mencionado. Correspondientemente, las composiciones conformes al invento pueden contener, junto a la enzima (biocatalizador), también los productos de partida (substratos) que se han de hacer reaccionar y, en el caso de llevarse a cabo precedentemente la reacción, evidentemente también los productos de reacción que se han formado por medio de la reacción enzimática.

40

45 Un aspecto todavía adicional es por consiguiente el uso de líquidos iónicos, en particular de los líquidos iónicos arriba definidos, como medio de reacción o como parte componente del medio de reacción en la biocatálisis, es decir la realización de reacciones catalizadas enzimáticamente en presencia de substratos.

50

55 En una forma de realización especial del invento, los grupos alquil-, aril-, arilalquil- y alquilaril-sulfonatos (anión [Y]) pueden estar sustituidos con átomos de halógeno, en particular de flúor, cloro o bromo. Son especialmente preferidos los alquil- y los antes mencionados aril-sulfonatos, fluorados, en particular los perfluorados, tales como el trifluorometano-sulfonato (triflato). Como representantes no halogenados han de mencionarse los grupos metano-sulfonato, benceno-sulfonato y tolueno-sulfonato, así como todos los otros grupos lábiles de sulfonatos, que se conocen en el estado de la técnica.

60

65 En otra forma adicional de realización del invento, los grupos alquil-, aril-, arilalquil- y alquilaril-carboxilatos pueden estar sustituidos con átomos de halógeno, en particular de flúor, cloro o bromo. Son especialmente preferidos los alquil- y los antes mencionados aril-carboxilatos fluorados, en particular los perfluorados, tales como el trifluorometano-carboxilato (trifluoroacetato; CF<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>). Como representantes no halogenados, han de mencionarse los grupos de acetato y benzoato así como todos los otros grupos lábiles de carboxilatos que se conocen en el estado de la técnica.

En formas preferidas de realización del invento, los grupos alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, mencionados en conexión con los sustituyentes, pueden ser reemplazados, en cada caso independientemente unos de otros, por grupos alquilo C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>. Asimismo los grupos alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, mencionados en conexión con los sustituyentes, pueden ser reemplazados, en cada caso inde-

pendientemente unos de otros, por grupos alcoxi C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>. En una alternativa adicional del invento, los grupos arilo C<sub>5</sub>-C<sub>12</sub>, mencionados en conexión con los sustituyentes, pueden ser reemplazados, en cada caso independientemente unos de otros, por grupos arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, y los grupos heteroarilo C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> pueden ser reemplazados, en cada caso independientemente unos de otros, por grupos heteroarilo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Los átomos de halógeno, con los que pueden estar sustituidos los grupos alquilo, alcoxi y arilo, están seleccionados entre los de flúor, cloro, bromo y yodo, de manera preferida los de flúor, cloro y bromo.

En una forma preferida de realización, el radical R' es un radical alquilo alifático o alicíclico, lineal o ramificado, que contiene de 1 a 8 átomos de carbono, o un radical arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, (aril C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> o (alquil C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>, que puede estar sustituido con átomos de halógeno.

Los cationes [A] están seleccionados, por ejemplo, entre trimetil-fenil-amonio, metil-trioctil-amonio, tetrabutil-fosfonio, 3-butil-1-metil-imidazolío, 3-etil-1-metil-imidazolío, N-butil-piridinio, N-etil-piridinio, dietil-pirazolío, 1-etil-3-metil-imidazolío, 1-butil-3-metil-imidazolío, 1-hexil-3-metil-imidazolío, 1-octil-3-metil-imidazolío, 1-decil-3-metil-imidazolío, 1-butil-4-metil-piridinio, 1-butil-3-metil-piridinio, 1-butil-2-metil-piridinio, 1-butil-piridinio, butil-metil-imidazolío, nonil-metil-imidazolío, butil-metil-imidazolío, hexil-metil-imidazolío, octil-metil-imidazolío, 4-metil-butil-piridinio, trietil-amonio, trietil-metil-amonio, butil-metil-piridinio, propil-amonio, metil-metil-imidazolío, etil-metil-imidazolío, butil-metil-imidazolío y butil-metil-imidazolío.

Los líquidos iónicos, así como su preparación, se conocen en el estado de la técnica. Para la síntesis de líquidos iónicos con iones de hexafluorofosfato, tetrafluoroborato, bis(trifluorometilsulfonil)amiduro, perfluoroalquilsulfonato y perfluoroalquilcarboxilato, en primer lugar, por reacción de una amina NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>R<sub>3</sub>, de un fosfano PR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>R<sup>3</sup>, de un derivado de imidazol de la fórmula general R<sup>1</sup>R<sup>2</sup>N=CR<sup>3</sup>-R<sup>5</sup>-R<sup>3</sup>C=N<sup>+</sup>R<sup>1</sup>R<sup>2</sup> o de un derivado de piridinio de la fórmula general R<sup>1</sup>R<sup>2</sup>N=CR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, con un cloruro de alquilo, bromuro de alquilo o yoduro de alquilo, se forma y aísla la correspondiente sal halogenuro [Cación]<sup>+</sup>X<sup>-</sup> (F.H. Hurley, T.P. Wier, Jr., J. Electrochem. Soc. 1951, 98, 207-212; J.S. Wilkes, J.A. Levisky, R.A. Wilson, C.L. Hussey, Inorg. Chem. 1982, 21, 1263-1264; A.A.K. Abdul-Sada, P.W. Amblar, P.K.G. Hodgson, K.R. Seddon, N.J. Stewart, documento de solicitud de patente internacional WO-A-95/21871), R.H. Dubois, M.J. Zaworotko, P.S. White, Inorg. Chem. 1989, 28, 2019-2020; J.F. Knifton, J. Mol. Catal. 1987, 43, 65-78; C.P.M. Lacroix, F.H.M. Dekker, A.G. Talma, J.W.F. Settz, documento de solicitud de patente europea EP-A-0989134). Partiendo de la sal halogenuro [A]<sup>+</sup>X<sup>-</sup> formada y aislada, se conocen dos diferentes vías para la síntesis de líquidos iónicos con iones de hexafluorofosfato, tetrafluoroborato, bis(trifluorometilsulfonil)amiduro, perfluoroalquil-sulfonato y perfluoroalquilcarboxilato. Por una parte, la sal halogenuro se hace reaccionar por adición de una sal metálica MY (mediando precipitación o separación de la sal MX o del producto [A]<sup>+</sup>[Y]<sup>-</sup> a partir del disolvente que en cada caso se utiliza) - representando [Y]<sup>-</sup> un ion de hexafluorofosfato, tetrafluoroborato, bis(trifluorometilsulfonil)amiduro, perfluoroalquilsulfonato y perfluoroalquilcarboxilato, y representando M<sup>+</sup> un catión de un metal alcalino (J.S. Wilkes, M.J. Zaworotko, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1992, 965-967; Y. Chauvin, L. Mussmann, H. Olivier, Angew. Chem. 1995, 107, 2941-2949; P.A.Z. Suarez, J.E.L. Dullius, S. Einloft, R.F. de Souza, J. Dupont, Polyhedron, 1996, 15, 1217-1219; P. Bonhöte, A.-P. Dias, N. Papageorgiu, K. Kalyanasundaram, M. Grätzel, Inorg. Chem. 1996, 35, 1168-1178; C.M. Gordon, J.D. Holbrey, A.R. Kennedy, K.R. Seddon, J. Mater. Chem. 1998, 8, 2627-2638; P.A.Z. Suarez, S. Einloft, J.E.L. Dullius, R.F. de Souza, J. Dupont, J. Chim. Phys. 1998, 95, 1626-1639; A.J. Carmichael, C. Hardacre, J.D. Holbrey, M. Nieuwenhuizen, K.R. Seddon, Anal. Chem. 1999, 71, 4572-4574; J.D. Holbrey, K.R. Seddon, J. Chem. Soc. Dalton Trans. 1999, 2133-2140). Por otra parte, mediante adición de un ácido fuerte H<sup>+</sup> [Y]<sup>-</sup> el ion de halogenuro es desalojado mediando liberación de H<sup>+</sup> X<sup>-</sup> e intercambiado por [Y]<sup>-</sup> - representando [Y]<sup>-</sup> aquí un ion de hexafluorofosfato, tetrafluoroborato, bis(trifluorometilsulfonil)amiduro, perfluoroalquil-sulfonato y perfluoroalquilcarboxilato (J. Fuller, R.T. Carlin, H.C. de Long, D. Haworth, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1994, 299-300). Sin embargo, de manera especialmente ventajosa, se pueden preparar líquidos iónicos exentos de halogenuros de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento EP-A-1182196.

En una forma de realización del procedimiento conforme al invento, el líquido iónico se emplea como único medio de reacción, es decir libre de otros disolventes. La proporción del líquido iónico en el medio de reacción puede estar sin embargo situada también entre 0,1 a 99,9 por ciento en volumen, de manera preferida entre 5 y 75 por ciento en volumen, de manera todavía más preferida entre 15 ó 50 y 75 por ciento en volumen, referida a la cantidad total del medio de reacción.

El medio de reacción puede contener, adicionalmente al líquido iónico, todavía otro disolvente más. Éste se puede seleccionar entre el conjunto que consiste en agua, soluciones tamponadoras (pH de 2 a 10, de manera preferida de 5 a 8) y disolventes orgánicos. Los disolventes orgánicos, que se pueden emplear, son miscibles con agua o no miscibles con agua. A modo de ejemplo se han de mencionar como disolventes orgánicos metil-terc.-butil-éter, tolueno, hexano, heptano, terc.-butanol, glicoles y poli(alquiliglicoles). Por lo demás, entran en cuestión sin embargo fundamentalmente todos los disolventes habituales, que son conocidos a partir del sector de la catálisis con enzimas.

Como enzimas entran en cuestión fundamentalmente todas las enzimas de las clases EC de 1 a 6. Se recomienda la clasificación de enzimas del "Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology" (IUBMB). La enzima o bien se presenta disuelta homogéneamente, pero se puede emplear asimismo como una suspensión o como un material inmovilizado sobre un soporte inerte.

Conforme al invento, se encontró que la presencia de líquidos iónicos en el medio de reacción en el caso de reacciones catalizadas enzimáticamente, conduce a una mejoría de la solubilidad de los sustratos (biocompatibilidad), a una mejoría de la actividad de las enzimas, a una mejoría de la selectividad, a una disminución de la inhibición de los productos, a la represión de reacciones secundarias (reacciones paralelas y secuenciales) y/o a una elevación de la estabilidad de las enzimas. Los Ejemplos demuestran que se pueden emplear enzimas de diferentes clases, ofreciendo el empleo de líquidos iónicos unas ventajas significativas, tales como por ejemplo una elevación de la actividad en el caso de la formiato-deshidrogenasa, una manifiesta elevación del rendimiento en el caso de reacciones con la galactosidasa, una elevación de la enantioselectividad en el caso de las lipasas y una mejoría de la solubilidad de los productos de partida en el caso de productos de partida hidrófobos.

Conforme al invento, la enzima se puede emplear, en común con la cantidad total del líquido iónico o con una parte de la misma, múltiples veces o en reactores que funcionan de un modo continuo.

Las enzimas pueden estar seleccionadas entre la clase de las oxidoreductasas para la oxidación y la reducción regio- y estereo-selectivas, entre la clase de las glicosidasas para la síntesis de oligosacáridos, entre la clase de las lipasas para la obtención de productos ópticamente activos (entre otros, alcoholes, aminas, ácidos carboxílicos) entre la clase de las liasas para la síntesis e hidrolasas.

El procedimiento conforme al invento se puede llevar a cabo a unas temperaturas de -10°C a 130°C, de manera preferida en un intervalo de temperaturas de 10°C a 80°C, de manera especialmente preferida en un intervalo de temperaturas de 20°C a 40°C.

El procedimiento se puede llevar a cabo en una manera monofásica o en un sistema de reacción multifásico.

A continuación, se deben explicar a modo de ejemplo algunos efectos, que se pueden conseguir mediante la utilización de líquidos iónicos como medio de reacción o como parte componente de medios de reacción para reacciones enzimáticas. Así, para la reducción enzimática de cetonas se pueden emplear, entre otras, alcohol-deshidrogenasas procedentes de diferentes fuentes. La solubilidad de cetonas hidrófobas se puede mejorar mediante adición de disolventes orgánicos; esto, sin embargo, conduce por regla general a una disminución de la actividad de las enzimas y de la estabilidad (W. Hummel, Biochem. Eng. Biotechnol. 1997, 58, 145; A. Liese, T. Zelinski, M.-R. Kula, H. Kierkele, M. Karutz, U. Kragl, C. Wandrey, J. Mol. Cat. B 1998, 4, 91). De una manera análoga, se le pueden añadir al medio de reacción líquidos iónicos miscibles con agua, con el fin de aumentar la solubilidad de los productos de partida. Para la formiato-deshidrogenasa, que se emplea para la regeneración de co-factores, se observa, en el mismo intervalo de concentraciones del líquido iónico, una elevación de la velocidad de reacción en comparación con la de un sistema puramente acuoso (compárese el Ejemplo 1). No se observó ninguna desactivación de la enzima ni siquiera en el caso de un prolongado período de tiempo de acción del líquido iónico. Por consiguiente, los líquidos iónicos ofrecen una valiosa posibilidad de elevar la productividad de reacciones enzimáticas mediante un aumento de la concentración de los productos de partida. Esto es especialmente interesante para productos de partida desde mal hasta muy mal solubles, tales como cetonas aromáticas o esteroides.

Desde hace aproximadamente 20 años se usan glicosidasas no solamente para el desdoblamiento de enlaces entre sacáridos, sino también para la síntesis de di- y oligo-sacáridos. A pesar de muchos experimentos, mediante una activación por regla general cara de los productos de partida, o un empleo de disolventes miscibles con agua (que conduce a una estabilidad disminuida de la enzima), se han conseguido incluso en los trabajos más recientes unos rendimientos hasta de como máximo 31% (J.H. Yoon, J.S. Rhee, Carbohydr. Res. 2000, 327, 377; M.J. Hernalz, D.H.G. Crout, J. Mol. Cat. B 2000, 10, 403). En el caso de estas reacciones, el problema principal es la hidrólisis secundaria, que se inicia inmediatamente, del producto, la cual es catalizada por la misma enzima. Sorprendentemente, esta hidrólisis secundaria es reprimida casi totalmente en presencia de líquidos iónicos con una actividad por lo demás igual de la enzima. Para el ejemplo de la síntesis, catalizada por la  $\beta$ -galactosidasa, de N-acetil-lactosamina, que es un importante eslabón componente para oligosacáridos farmacológicamente relevantes, se pudo mostrar que la presencia de líquidos iónicos aumenta el rendimiento, en el caso de utilizarse lactosa como donante barato, hasta más de un 55%!. Sin la adición de líquidos iónicos se alcanza como máximo un 30%; no obstante, la concentración del producto disminuye rápidamente mediante la hidrólisis secundaria a valores <10%. Puesto que en presencia de líquidos iónicos no se produce la hidrólisis secundaria del producto, se establece una realización simplificada de la reacción, puesto que no es necesario vigilar la reacción e interrumpirla al alcanzarse un máximo del rendimiento del producto. La galactosidasa es muy estable en presencia de líquidos iónicos, y se puede emplear repetidamente después de una separación mediante ultrafiltración, sin que se modifiquen el rendimiento que se puede conseguir ni la velocidad de formación de productos.

Ofrecen ventajas los líquidos iónicos también en el caso de la hidrólisis inversa para la síntesis de di- y oligo-sacáridos. En este caso, por regla general, se utilizan altas concentraciones de los productos de partida junto con aditivos - la mayor parte de las veces disolventes orgánicos - para disminuir la actividad del agua. Los líquidos iónicos ofrecen aquí en particular la ventaja de la muy buena capacidad de disolución para hidratos de carbono. En el caso de la síntesis enzimática de lactosa, en comparación con la bibliografía, se pudo aumentar el rendimiento en un factor de 2 así como se pudo disminuir el tiempo de reacción en el factor de 5 (K. Ajisaka, H. Fujimoto, H. Nishida, Carbohydr. Res. 180, 35-42 (1988)).

## ES 2 267 856 T3

El empleo de lipasas en presencia de disolventes orgánicos en una realización mono- o bi-fásica de la reacción constituye un estado de la técnica (G. Carrea, S. Riva, *Angew. Chem.* 2000, 112, 2312, U.T. Bornscheuer, R.J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis - Regio- and stereoselective biotransformations* [Hidrolasas en síntesis orgánicas - biotransformaciones regio- y estereo-selectivas], Wiley-VCH, Weinheim, 1999; A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, *Industrial Biotransformations* Wiley-VCH, Weinheim, 2000; M. C. Parker, S. A. Brown, L. Robertson, N. J. Turner, *Chem. Commun.* 1998, 2247). No obstante, hasta ahora la enzima se separaba de un modo convencional por filtración, y la solución de reacción se separaba convencionalmente por destilación, y el disolvente se devolvía. El empleo de líquidos iónicos permite la separación directa por destilación de los reaccionantes a partir de la mezcla de reacción, incluso en presencia de la enzima, por lo que se establece un modo de procedimiento simplificado. Este modo de procedimiento, cuando los reaccionantes poseen una correspondiente volatilidad, no está limitado a lipasas. En el caso de la investigación de diferentes lipasas para el desdoblamiento de racematos en presencia de líquidos iónicos, se comprobó, de un modo sorprendente en múltiples casos, que la velocidad de reacción y la enantioselectividad en parte se mejoran manifiestamente, en algún caso individual en un factor de 5. Como comparación, sirve la reacción en el seno de terc.-butil-metil-éter, que también se emplea en procesos industriales como disolvente para reacciones catalizadas por lipasas.

Los resultados muestran que los líquidos iónicos ofrecen ventajas como medio de reacción para reacciones enzimáticas en comparación con las condiciones, que se han consagrado como estado de la técnica, y se pueden usar como disolventes biocompatibles con el fin de influir deliberadamente sobre las reacciones.

El invento es descrito con mayor detalle mediante los siguientes Ejemplos, pero sin quedarse limitado a éstos.

### Ejemplos

Para la descripción de componentes utilizados en los Ejemplos, se utilizaron las siguientes abreviaturas:

terc.-Butil-metil-éter	tBME	MTBE
Butil-metil-imidazolio PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>	BMIm <sup>+</sup>	PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>
Nonil-metil-imidazolio PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>	NMIm <sup>+</sup>	PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>
Butil-metil-imidazolio BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	BMIm <sup>+</sup>	BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>
Hexil-metil-imidazolio BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	HMIm <sup>+</sup>	BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>
Octil-metil-imidazolio BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	OMIm <sup>+</sup>	BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>
4-Metil-butil-piridinio BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	4-MBPY <sup>+</sup>	BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>
Trietil-amonio - metilsulfato	Et <sub>3</sub> NH <sup>+</sup>	MeSO <sub>4</sub> <sup>-</sup>
Trietil-metil-amonio - metilsulfato	Et <sub>3</sub> NMe <sup>+</sup>	MeSO <sub>4</sub> <sup>-</sup>
Butil-metil-piridinio BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	BMPY <sup>+</sup>	BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>
Propil-amonio - nitrato	PrNH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Metil-metil-imidazolio - metilsulfato	MMIm <sup>+</sup>	MeSO <sub>4</sub> <sup>-</sup>
Etil-metil-imidazolio - benzoato	EMIm <sup>+</sup>	PhCO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Butil-metil-imidazolio - trifluorometanosulfonato	BMIm <sup>+</sup>	CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (= triflato)
Bis-(trifluorometilsulfonil)-imidato de butil-metil-imidazolio	BMIm <sup>+</sup>	(CF <sub>3</sub> SO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N-

#### 1. *Formiato deshidrogenasa procedente de Candida boldinii (FDH)*

Como reacción de ensayo para la determinación de la actividad de la enzima sirve la oxidación catalizada por FDH de ácido fórmico para dar dióxido de carbono, mediando reducción del dinucleótido de nicotinamido adenina (NAD<sup>+</sup> para dar NADH + H<sup>+</sup>). En el ensayo enzimático se detecta el aumento de NADH en el curso del tiempo a 25°C por vía fotométrica a una longitud de onda de 340 nm.

Composición del sistema de ensayo de la enzima: 1 ml de una solución tamponadora (50 mM de hidrocloreto de trietanol-amina, 1 mM de ditioneitol, ácido clorhídrico) de pH 7 se mezcla con 1 ml de una solución acuosa de formiato de sodio (2,4 M) y 0,1 ml de una solución de la enzima (0,7 mg/ml, 8,4 U). La solución de la enzima contiene ya el cofactor NAD (6 mM).

Con el fin de ensayar la influencia de líquidos iónicos solubles en agua sobre la actividad de la enzima, el volumen de la solución tamponadora en el sistema de ensayo se reduce en escalones de 25% en volumen y se reemplaza por el líquido iónico.

## ES 2 267 856 T3

TABLA 1

*Reducción de NAD mediante la formiato-deshidrogenasa procedente de Candida boldinii; actividad de la enzima en comparación con la reacción patrón en una solución tamponadora (+) desde buena hasta mejor, (±) igual.*

Líquido iónico	25% en vol	50% en vol	75% en vol
MMIm <sup>+</sup> MeSO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	±	+	+

### 2. *β*-Galactosidasa procedente de Bacillus circulans para la síntesis de N-acetil-lactosamina

Se investiga la influencia de líquidos iónicos sobre la evolución de la transgalactosilación catalizada por *β*-Gal, partiendo de lactosa y de *N*-acetil-glucosamina. Para esto se registran y comparan las evoluciones de las concentraciones en función del tiempo de esta síntesis, en presencia y en ausencia de líquidos iónicos.

Por cada serie de ensayos se formulan paralelamente 10 reacciones en tubitos de ensayo para GC con una capacidad de 1 ml. En el intervalo de 10 minutos, las reacciones se detienen por ebullición durante 10 minutos a 100°C, la solución de reacción se filtra (con el filtro de jeringa Minisart RC 4 de Sartorius) y se determina por cromatografía la concentración de los componentes de reacción en este momento (columna intercambiadora de cationes Aminex HPX-87H de la entidad BioRad con una correspondiente columna preliminar, 0,006 M de ácido sulfúrico como eluyente con un caudal de 0,8 ml/min y con una temperatura de la columna de 65°C. La detección se efectúa mediante luz UV a 208 nm y mediante el índice de refracción).

Composición de la mezcla de reacción: 0,05 ml de una solución tamponadora (65 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 195 mM de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) de pH 7,3, se mezclan con 0,5 ml de una solución de *N*-acetil-glucosamina (GlcNAc 600 mM o bien 1,2 M en una solución tamponadora), 0,25 ml de una solución de lactosa (250 mM en una solución tamponadora) y 0,2 ml de una solución de enzima (10 mg/ml en una solución tamponadora).

Por intercambio de una solución tamponadora por un líquido iónico en las soluciones de sustratos, se aumenta escalonadamente la proporción del líquido iónico en el medio de reacción. De esta manera se establecen las siguientes soluciones de sustratos:

- a) 0,50 ml de una solución de *N*-acetil-glucosamina (600 mM en una solución 1:4 de MMIm<sup>+</sup> MeSO<sub>4</sub><sup>-</sup> : tampón)
- b) 0,50 ml de una solución de *N*-acetil-glucosamina (600 mM en una solución 1:4 de MMIm<sup>+</sup> MeSO<sub>4</sub><sup>-</sup> : tampón)
- 0,25 ml de una solución de lactosa (250 mM en una solución 1:4 de MMIm<sup>+</sup> MeSO<sub>4</sub><sup>-</sup> : tampón)
- c) 0,50 ml de una solución de *N*-acetil-glucosamina (1,2 M en una solución 1:2 de MMIm<sup>+</sup> MeSO<sub>4</sub><sup>-</sup> : tampón)
- 0,25 ml de una solución de lactosa (250 mM en una solución 1:2 de MMIm<sup>+</sup> MeSO<sub>4</sub><sup>-</sup> : tampón)
- d) 0,50 ml de una solución de *N*-acetilglucosamina (600 mM en una solución 1:4 de BMIm<sup>+</sup> H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup> : tampón)

TABLA 2

*Síntesis de N-acetil-lactosamina mediante una *β*-galactosidasa procedente de Bacillus circulans con y sin un líquido iónico*

Medio de reacción	Proporción [% en vol]	Relación de lactosa/GlcNAc	Rendimiento [%] después de 60 min	Rendimiento [%] después de 100 min
Tampón de fosfato		1 : 2,4	5	3
MMIm <sup>+</sup> MeSO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	a) 12,5 b) 18,75 c) 25	1 : 2,4 1 : 2,4 1 : 4,8	40 44 49	40 43 55 (90 min)
BMIm <sup>+</sup> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> /Cl <sup>-</sup>	d) 12,5	1:2,4	39	30

## ES 2 267 856 T3

### 3. Acilación enantioselectiva de *R,S*-1-fenil-etanol mediante catálisis con una lipasa procedente de *Candida antarctica* (tipo B) en líquidos iónicos

4,4 ml de un líquido iónico correspondiente a la Tabla 3 o de *terc.*-butil-metil-éter se mezclan con 122  $\mu$ l de acetato de vinilo y 54  $\mu$ l de 1-fenil-etanol, de manera tal que se obtiene una solución de sustrato con aproximadamente 0,1 mol/l de 1-fenil-etanol y 0,3 mol/l de acetato de vinilo. En cada caso 1 mg de una lipasa liofilizada (>120 U/mg) se reúne con 0,4 ml de una solución de sustrato, se mezcla a fondo y se incuba en un sacudidor térmico a 24°C mediando ligero sacudimiento durante 3-4 d (días).

Para el tratamiento, 100  $\mu$ l de la tanda de reacción se reúnen con 1 ml de una mezcla de n-hexano e isopropanol (97,5/2,5 v/v) y se mezclan a fondo. Este extracto en hexano/isopropanol se emplea para la determinación de las concentraciones y de las relaciones de enantiómeros de 1-fenil-etanol y acetato de 1-fenil-etilo mediante una HPLC (cromatografía en fase líquida de alto rendimiento). A partir de estas concentraciones se calcularon el grado de conversión y el exceso enantiomérico (véase la Tabla 3).

#### Condiciones de HPLC

Columna: Columna de protección Nucleosil C-18 5  $\mu$ m; 10 ml, 4,6 mm ID (diámetro interno); columna precursora de Chiracel OJ; 250 mm, 4,6 mm ID; columna de separación Chiracel OJ; 250 mm, 4,6 mm ID

Eluyente: isocrático;  
96,5% (v/v) de n-hexano  
3,0% (v/v) de isopropanol  
0,5% (v/v) de etanol

Caudal: 1 ml/min

Temperatura: 38°C

Detección: Detector de UV (205 nm).

TABLA 3

Acilación enantioselectiva de 1-fenil-etanol, catalizada por una lipasa procedente de *Candida antarctica* (del tipo B): Grado de conversión y exceso enantiomérico en líquidos iónicos, en comparación con la reacción patrón en *terc.*-butil-metil-éter; (+) desde buena hasta mejor, (✓) igual, (-) desde mala hasta ninguna

Líquido iónico/disolvente	Grado de conversión	Exceso enantiomérico
NMI <sup>+</sup> PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>	±	+
BMI <sup>+</sup> BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	+	+
HMI <sup>+</sup> BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	±	+
OMI <sup>+</sup> BF <sub>4</sub>	+	+
4-MBP <sup>+</sup> BF <sub>4</sub>	+	+
BMI <sup>+</sup> CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	+	+
BMI <sup>+</sup> (CF <sub>3</sub> SO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N <sup>-</sup>	+	+

### 4. Acilación enantioselectiva de *R,S*-1-fenil-etanol mediante catálisis con una lipasa procedente de *Candida antarctica* (del tipo A) en líquidos iónicos

En cada caso 5 mg de una lipasa liofilizada (>30 U/mg) se mezclan con 0,4 ml de una solución de sustrato, igual a como en el Ejemplo 3. El modo de trabajo ulterior corresponde al descrito en el Ejemplo 3.

## ES 2 267 856 T3

TABLA 4

Acilación enantioselectiva de 1-fenil-etanol, catalizada por una lipasa procedente de *Candida antarctica* (del tipo A): Grado de conversión y exceso enantiomérico en líquidos iónicos en comparación con la reacción patrón en *terc.-butil-metil-éter*; (+) desde buena hasta mejor, (±) igual, (-) desde mala hasta ninguna

Líquido iónico/disolvente	Grado de conversión	Exceso enantiomérico
BMIm <sup>+</sup> PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>	+	+
NMIm <sup>+</sup> PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>	+	+
BMIm <sup>+</sup> BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	±	+
HMIm <sup>+</sup> BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	+	+
OMIm <sup>+</sup> BF <sub>4</sub>	+	±
BMIm <sup>+</sup> CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	+	+

5. Acilación enantioselectiva de *R,S*-1-fenil-etanol mediante catálisis con una lipasa procedente de *Pseudomonas* sp. en líquidos iónicos

En cada caso 3 mg de una lipasa liofilizada (400 U/mg) se mezclan con 0,4 ml de una solución de sustrato como en el Ejemplo 3. El modo de trabajo ulterior corresponde al que se describe en el Ejemplo 3.

TABLA 5

Acilación enantioselectiva de 1-fenil-etanol, catalizada por una lipasa procedente de *Pseudomonas* sp.: Grado de conversión y exceso enantiomérico en líquidos iónicos en comparación con la reacción patrón en *terc.-butil-metil-éter*; (+) desde buena hasta mejor, (±) igual, (-) desde mala hasta ninguna

Líquido iónico/disolvente	Grado de conversión	Exceso enantiomérico
MIm <sup>+</sup> PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>	±	+
4-MBP <sup>+</sup> BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	±	+
BMIm <sup>+</sup> CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	+	+
BMIm <sup>+</sup> (CF <sub>3</sub> SO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> N <sup>-</sup>	+	+

6. Acilación enantioselectiva de *R,S*-1-fenil-etanol mediante catálisis con una lipasa procedente de *Alcaligenes* sp. en líquidos iónicos

En cada caso 5 mg de una lipasa liofilizada (>20 U/mg) se mezclan con 0,4 ml de una solución de sustrato como en el Ejemplo 3. El modo de trabajo ulterior corresponde al descrito en el Ejemplo 3.

TABLA 6

Acilación enantioselectiva de 1-fenil-etanol, catalizada por una lipasa procedente de *Alcaligenes* sp.: Grado de conversión y exceso enantiomérico en líquidos iónicos en comparación con la reacción patrón en *terc.-butil-metil-éter*; (+) desde buena hasta mejor, (±) igual, (-) desde mala hasta ninguna

Líquido iónico/disolvente	Grado de conversión	Exceso enantiomérico
BMIm <sup>+</sup> PF <sub>6</sub> <sup>-</sup>	±	+
BMIm <sup>+</sup> BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	±	+
HMIm <sup>+</sup> BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	±	+

## ES 2 267 856 T3

TABLA 6 (continuación)

	Líquido iónico/disolvente	Grado de conversión	Exceso enantiomérico
5	OMIm <sup>+</sup> BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	±	+
	4-MBP <sup>+</sup> BF <sub>4</sub> <sup>-</sup>	±	+
10	BMIm <sup>+</sup> CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	±	+

### 7. Reciclamiento de la lipasa procedente de *Candida antarctica* (del tipo B) en un líquido iónico mediante destilación

15 600 mg de una lipasa liofilizada (aproximadamente 10 U/mg) se reúnen y mezclan a fondo con 4 ml de un líquido iónico (BMIm<sup>+</sup> (CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N<sup>-</sup>), 1,2 ml de acetato de vinilo y 0,7 ml de 1-fenil-etanol. La mezcla de reacción se incuba durante 40 min a 40°C.

20 A continuación, los productos de partida no convertidos, así como el producto de reacción 1-fenil-acetato, se separan por destilación (85°C, 0,06 mbar).

La mezcla de la enzima y del líquido iónico se enfría, se reúne de nuevo con 1,2 ml de acetato de vinilo y 0,7 ml de 1-fenil-etanol y de nuevo se incuba durante 40 min a 40°C.

25 Esta secuencia de reacciones de incubación y separación por destilación se puede repetir múltiples veces, sin que disminuya la actividad de la lipasa.

### 8. Síntesis de lactosa mediante hidrólisis inversa con una $\beta$ -galactosidasa procedente de *Bacillus circulans*

30 100 mmol/l de glucosa, 20 mmol/l de galactosa y 2 mg/ml de galactosidasa se incuban a 35°C durante 24 h en una mezcla de agua y MMIm MeSO<sub>4</sub>. La reacción se detiene por ebullición durante 10 minutos a 100°C, la solución de reacción se filtra (con un filtro de jeringa Minisart RC 4 de Sartorius) y la concentración de los componentes de reacción en este momento se determina por cromatografía (columna intercambiadora de cationes Aminex HPX-87H de la entidad BioRad con una correspondiente columna preliminar, 0,006 M de ácido sulfúrico como eluyente, con un caudal de 0,8 ml/min y con una temperatura de la columna de 65°C. La detección se efectúa mediante luz UV a 208 nm y mediante el índice de refracción). La proporción del líquido iónico es elevada desde 0 a 100 por ciento en volumen. Mediante vestigios de agua en el líquido iónico y en los productos de partida se establece un contenido de agua de 0,6% en el caso de 100% de líquido iónico. Después de 24 horas, el grado de conversión ya no aumenta adicionalmente. Dependiendo de la proporción de líquido iónico se obtienen los siguientes rendimientos de lactosa:

	Proporción de líquido iónico en %	Rendimiento [%]
	0	0
45	10	0
	20	0
50	30	4
	40	12
	50	15
55	60	15
	70	15
60	80	16
	90	16
65	100	17

# ES 2 267 856 T3

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para la reacción de sustancias en presencia de enzimas como catalizadores, en un medio de reacción que comprende por lo menos un líquido iónico, estando seleccionadas las enzimas entre el conjunto de las oxidorreductasas, lipasas, galactosidasas, glicosidasas, liasas, y enzimas de la clase EC 6.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque la proporción del líquido iónico en el medio de reacción es de 0,1 a 99,9 por ciento en volumen.
- 10 3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el medio de reacción, adicionalmente al líquido iónico, contiene todavía otro disolvente adicional.
4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque el otro disolvente es agua o un disolvente orgánico.
- 15 5. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque la reacción se lleva a cabo a unas temperaturas de -10°C a 130°C.
- 20 6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque la reacción se lleva a cabo en una manera monofásica o en un sistema de reacción multifásico.
7. Composición que comprende una enzima, seleccionada entre el conjunto formado por las oxidorreductasas, lipasas, galactosidasas, glicosidasas, liasas, y enzimas de la clase EC 6, y por lo menos un líquido iónico.
- 25 8. Composición de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizada** porque el líquido iónico está definido como en la reivindicación 2.
9. Composición de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, **caracterizada** porque adicionalmente contiene un substrato.
- 30 10. Composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, **caracterizada** porque contiene el líquido iónico como medio de reacción o como parte componente del medio de reacción.
- 35 11. Uso de líquidos iónicos como medio de reacción o como parte componente del medio de reacción para las reacciones catalizadas enzimáticamente, estando seleccionadas las enzimas entre el conjunto formado por las oxidorreductasas, lipasas, galactosidasas, glicosidasas, liasas, y enzimas de la clase EC 6.
- 40 12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11 como medio de reacción o como parte componente del medio de reacción en el caso de la hidrólisis inversa para la síntesis de di- u oligo-sacáridos.

45

50

55

60

65