



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 321 963**

51 Int. Cl.:
C12N 9/20 (2006.01)
C12P 7/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05780500 .4**
96 Fecha de presentación : **16.08.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1790718**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.05.2007**

54 Título: **Composición de lipasa en polvo y método para producir producto esterificado mediante uso de la misma.**

30 Prioridad: **24.08.2004 JP 2004-243895**
28.03.2005 JP 2005-91881

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

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.06.2009

72 Inventor/es: **Hirose, Tadashiro;**
Arai, Yuri y
Negishi, Satoshi

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.06.2009

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 321 963 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

Composición de lipasa en polvo y método para producir producto esterificado mediante uso de la misma.

Una composición en polvo de lipasa y un procedimiento para preparar un compuesto esterificado mediante el uso de la misma.

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a una composición de lipasa en polvo que se puede usar de manera adecuada en una esterificación de un compuesto(s) que tiene grupo hidroxilo alcohólico, tal como glicerina, con diversos ácidos grasos y similares, y a un procedimiento para preparar un compuesto esterificado, tal como triglicérido, mediante el uso de la misma.

Antecedentes de la invención

Las lipasas se usan en gran medida en reacciones tales como esterificación de diversos ácidos carboxílicos tales como ácidos grasos con alcoholes tales como monoalcohol y polialcohol, y transesterificación entre carboxilatos plurales. Entre éstos, cuando se usa la propia lipasa en polvo en la esterificación que implica deshidrogenación, su actividad no se expresa completamente. Además, es difícil dispersar de manera uniforme el polvo de lipasa en un sistema de reacción, y además recuperarlo. Por tanto, es común inmovilizar una lipasa a algunos soportes, tales como resina de intercambio iónico (Bibliografía de Patente 1), resina de adsorción de fenol (Bibliografía de Patente 2), un soporte hidrófobo (Bibliografía de Patente 3), resina de intercambio catiónico (Bibliografía de Patente 4) y resina de quelato (Bibliografía de Patente 5) y similares para usarla en reacciones tales como reacción de esterificación.

Como se ha mencionado anteriormente, se ha inmovilizado de manera convencional y usado una lipasa en la reacción de esterificación. Sin embargo la lipasa inmovilizada pierde actividad de lipasa original mediante la inmovilización. Además, cuando se usó un soporte poroso, las materias primas y productos han terminado adhiriéndose en poros finos y, como resultado, disminuye la relación de esterificación.

A la vista de las situaciones mencionadas anteriormente, se han desarrollado diversas tecnologías en las que se usa un polvo de lipasa. Por ejemplo, se propone un procedimiento de transesterificación en el que la presencia o ausencia de un disolvente o disolventes orgánico(s) inactivo(s), se dispersa un polvo de lipasa en materia(s) prima(s) que contienen éster en la transesterificación de tal manera que el 90% o más de las partículas del polvo de lipasa dispersado puede mantener un tamaño de partícula de 1 a 100 μm en la reacción (Bibliografía de Patente 6). También se propone que se use polvo de enzima, que se obtiene secando una solución(es) de enzima que contiene fosfolípido y vitaminas solubles en lípidos (Bibliografía de Patente 7).

[Bibliografía de Patente 1] Publicación de Patente Japonesa N° Sho. 60-98984

[Bibliografía de Patente 2] Publicación de Patente Japonesa N° Sho. 61-202688

[Bibliografía de Patente 3] Publicación de Patente Japonesa N° Hei. 2-138986

[Bibliografía de Patente 4] Publicación de Patente Japonesa N° Hei. 3-61485

[Bibliografía de Patente 5] Publicación de Patente Japonesa N° Hei. 1-262795

[Bibliografía de Patente 6] Publicación de Patente Japonesa N° 2668187

[Bibliografía de Patente 7] Publicación de Patente Japonesa N° 2000-106873

Descripción de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición de lipasa en polvo que permite llevar a cabo de manera eficaz una reacción de esterificación.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para preparar un compuesto esterificado usando la composición de lipasa mencionada anteriormente.

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

Mediante el uso de una combinación de dos lipasas en polvo particulares en lugar de una lipasa inmovilizada, se puede conseguir una relación extremadamente alta de esterificación, mediante la cual se pueden solucionar los problemas mencionados anteriormente. La presente invención se ha completado en la base de estos hallazgos.

A saber, la presente invención proporciona una composición de lipasa que comprende (a) una lipasa en polvo que es una lipasa derivada de *Rhizomucor* sp. o una lipasa en polvo derivada de *Penicillium* sp. y, (b) una lipasa en polvo selec-

cionada del grupo constituido por una lipasa en polvo que es una lipasa derivada de *Alcaligenes* sp., una lipasa en polvo que es una lipasa derivada de *Rhizopus* sp. y una lipasa en polvo que es una lipasa derivada de *Thermomyces* sp.

- 5 La presente invención proporciona un procedimiento para preparar un compuesto o compuestos esterificados que comprende esterificar un compuesto que tiene al menos un grupo hidroxilo alcohólico en la molécula, en la presencia de la composición de lipasa anteriormente mencionada, con un ácido o ácidos carboxílicos.

Breve descripción del dibujo

- 10 La Figura 1 muestra la producción de triglicéridos en la reacción de esterificación cuando la composición de lipasa comprende una combinación de dos lipasas (RM (1%) + QL (0,1%) así como G (0,7%) + QL (0,3%)).

Mejor modo de llevar a cabo la invención

- 15 Como lipasa derivada de *Rhizomucor* sp. que se usa como componente (a), se usa preferentemente una lipasa derivada de *Rhizomucor miehei*, es decir, se usa una lipasa 1,3 específica. Se puede preparar una solución que contiene lipasa, palatasa (20000L) preparada por Novozymes Japan Co., Ltd, en forma de polvo para usar el producto resultante como la lipasa en polvo. Como esta lipasa en polvo, se usa preferentemente un polvo que es esférico y tiene un contenido en agua no mayor que 10% en peso. Es más preferible que el contenido en agua de la misma varíe de 6,5 a 20 8,5% en peso. Hasta ahora se ha usado algunas veces *Rhizomucor miehei* por pertenecer a *Mucor* sp.

La lipasa en polvo anteriormente mencionada se puede preparar fácilmente, por ejemplo, mediante secado por pulverización de una solución acuosa que contiene una lipasa.

- 25 En este documento, los ejemplos de la solución acuosa que contiene una lipasa incluyen una solución de cultivo de lipasa a partir de la cual se elimina un cuerpo celular, una solución de cultivo purificado del mismo, una solución en la que el polvo de lipasa obtenido a partir de estas soluciones de cultivo se disuelve y se dispersa de nuevo; una solución en la que el polvo de lipasa disponible comercialmente se disuelve y se dispersa de nuevo; y una lipasa líquida disponible comercialmente. Con el fin de potenciar la actividad de la lipasa es más preferible que se eliminen de la 30 solución componentes de bajo peso molecular tales como sales. Con el fin de potenciar la propiedad del polvo, es más preferible que se eliminen de la solución los componentes de bajo peso molecular tales como azúcar.

- Una solución de cultivo de lipasa incluye, por ejemplo, soluciones acuosas que contienen harina de soja, peptonas, licor de maíz fermentado, K_2HPO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ y similares. Las concentraciones de los mismos son 35 como siguen: la harina de soja es 0,1 a 20% en peso y preferentemente 1,0 a 10% en peso; peptona es 0,1 a 30% en peso y preferentemente 0,5 a 10% en peso; el licor de maíz fermentado es 0,1 a 30% en peso y preferentemente 0,5 a 10% en peso; K_2HPO_4 es 0,01 a 20% en peso y preferentemente 0,1 a 5% en peso; $(NH_4)_2SO_4$, es 0,01 a 20% en peso y preferentemente 0,05 a 5% en peso; y $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ es 0,01 a 20% en peso y preferentemente 0,05 a 5% en peso. Sus condiciones de cultivo se deben controlar como sigue: la temperatura de cultivo varía de 10 a 40°C 40 y preferentemente de 20 a 35°C; el caudal de aire varía de 0,1 a 2,0 VVM y preferentemente de 0,1 a 1,5 VVM; la velocidad de rotación para agitación varía de 100 a 800 rpm y preferentemente de 200 a 400 rpm; el pH varía de 3,0 a 10,0 y preferentemente de 4,0 a 9,5.

- La separación de un cuerpo celular se lleva a cabo preferentemente por centrifugación, procedimiento con filtro de 45 membrana y similares. La separación de los componentes de bajo peso molecular tales como sales y azúcar se pueden efectuar con membranas de ultrafiltración. Específicamente, después de tratamiento con membranas de ultrafiltración, la solución acuosa que contiene una lipasa se concentra hasta que llegue a su mitad del volumen, y después, se añade a esta la misma cantidad de un tampón fosfato que la de la solución concentrada. Repitiendo estos procedimientos de una a 5 veces, se puede obtener la solución acuosa que contiene una lipasa, a partir de la cual se separan los componentes 50 de bajo peso molecular.

- La centrifugación se controla preferentemente hasta 200 a 20.000 x g. La presión aplicada al filtro de membrana se controla preferentemente mediante membranas de microfiltración, un filtro prensa y similares para que no lleguen a ser mayores que 3,0 kg/m². En el caso de enzimas en el cuerpo celular, es preferible que su descomposición celular se 55 lleve a cabo mediante un homogeneizador, mezclador Waring, por ruptura ultrasónica, una prensa French, un molino de bolas y similares; después los restos de células se separan por centrifugación, el procedimiento de filtro de membrana y similares. La velocidad de rotación del homogeneizador para la agitación varía de 500 a 30.000 rpm y preferentemente de 1.000 a 15.000 rpm. La velocidad de rotación del mezclador Waring varía de 500 a 10.000 rpm y preferentemente de 1.000 a 5.000 rpm. El tiempo de agitación varía de 0,5 a 10 minutos y preferentemente de 1 a 5 minutos. Es preferible 60 que la ruptura ultrasónica se lleve a cabo en la condición de 1 a 50 Khz y más preferentemente de 10 a 20 Khz. Es preferible que el molino de bolas tenga pellas de vidrio que tengan 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 en sólidos.

- 65 En el presente documento, las concentraciones del contenido en sólidos en la solución acuosa que contiene una lipasa se pueden determinar como % Brix usando, por ejemplo, el analizador de contenido en azúcar (refractómetro) (CIS Corporation., Ltd.; BRX-242).

ES 2 321 963 T3

Inmediatamente antes del proceso de secado tal como secado por pulverización, es preferible que la solución acuosa que contiene una lipasa se ajuste hasta un pH de 6 a 7,5. Es más preferible que se ajuste hasta pH igual o inferior a 7 y más preferentemente hasta pH 6,5 a 7,0. El ajuste de pH se puede llevar a cabo en cualquier fase antes del proceso de secado tal como secado por pulverización. El pH de la solución acuosa que contiene una lipasa se puede 5 ajustar de manera preliminar de modo que inmediatamente antes del proceso de secado el pH esté dentro del intervalo anterior. Se pueden usar diversos compuestos químicos alcalinos y ácidos para el ajuste de pH y preferentemente se usan hidróxidos de metales alcalinos tal como hidróxido de sodio.

En alguna fase antes del proceso de secado, se puede concentrar la solución acuosa que contiene una lipasa. Los 10 procedimientos de concentración no están particularmente limitados e incluyen evaporación, evaporación ultrarrápida, concentración por microfiltración, precipitación salina mediante sales orgánicas, procedimientos de precipitación con disolventes, procedimientos de absorción con celulosa de intercambio iónico y similares, y procedimientos de absorción de agua con geles de absorción de agua. Entre éstos, se prefieren la concentración por ultrafiltración y evaporación. El módulo para la concentración por ultrafiltración es preferentemente una membrana plana o una membrana 15 de filtro de fibra hueca que tiene un peso molecular fraccionado de 3.000 a 100.000 y más preferentemente de 6.000 a 50.000. Los materiales de la membrana son preferentemente poliacrilonitrilo, polisulfonas y similares.

Es preferible que el secado por pulverización se lleve a cabo mediante secadores por pulverización tal como flujo en contracorriente de boquillas, flujo en contracorriente de discos, flujo paralelo de boquillas y flujo paralelo de discos, 20 siendo más preferible el flujo paralelo de discos. El secado por pulverización se controla preferentemente como sigue: la velocidad de rotación del atomizador varía de 4.000 a 20.000 rpm; y el calentamiento varía de 100 a 200°C para la temperatura de entrada y de 40 a 100°C para la temperatura de salida.

Otra lipasa del componente (a) usada en la presente invención es una lipasa derivada de *Penicillium* sp. Como la 25 lipasa, una lipasa derivada de *Penicillium camemberti*, es decir, se usa preferentemente una lipasa específica 1,3. Como lipasa en polvo, se puede usar Lipasa G "AMANO" 50 comercializada por AMANO ENZYME Co., Ltd. y similares. El pH óptimo de esta lipasa es 5,0, en particular, la lipasa actúa de manera eficaz entre pH 4,5 y 6,0. La temperatura óptima de la lipasa es 40°C. Esta lipasa en polvo es un polvo fino de color blanco a beige que no está soportada.

Además de esta lipasa, una lipasa derivada de *Penicillium* sp. se puede obtener en forma de un material en polvo 30 mediante el procedimiento que se explica en relación con la lipasa mencionada anteriormente derivada de *Rhizomucor* sp.

La lipasa del componente (b) usada en la presente invención es una lipasa derivada de *Alcaligenes* sp. Como 35 material en polvo de esta lipasa se puede usar Lipasa QL y Lipasa PL de Meito Sangyo Co., Ltd. y similares.

Las propiedades de la Lipasa QL son como sigue: el peso molecular determinado mediante filtración en gel varía de 180.000 a 190.000, el punto isoeléctrico es 4,1 el pH óptimo varía de 7 a 8,5, la temperatura óptima es 60°C, la 40 estabilidad del pH varía de 6 a 10 y la estabilidad de temperatura es 40°C o menor. Las propiedades de la Lipasa PL son como sigue: el peso molecular determinado mediante filtración en gel varía de 350.000 a 370.000, el punto isoeléctrico es 4,5 el pH óptimo varía de 7 a 8,5, la temperatura óptima varía de 37 a 40°C, la estabilidad de pH varía de 7 a 10 y la estabilidad de temperatura es 40°C o menor. Ambas lipasas son un polvo fino amarillo lanoso que no están soportadas. De acuerdo con la presente invención, se usa preferentemente la Lipasa QL.

Además de esta lipasa, una lipasa derivada de *Alcaligenes* sp. se puede obtener en forma de un material en polvo 45 mediante el procedimiento que se explica en relación con la lipasa mencionada anteriormente derivada de *Rhizomucor* sp.

Otra lipasa del componente (b) usada en la presente invención es una lipasa derivada de *Rhizopus* sp y una lipasa 50 derivada de *Thermomyces* sp. Como lipasa derivada de *Rhizopus* sp., se usa preferentemente una derivada de *Rhizopus oryzae*. Como material en polvo de esta lipasa, se puede usar la lipasa en polvo F-AP15 de AMANO ENZYME Co., Ltd.

Como lipasa derivada de *Thermomyces* sp., se usa de manera preferible una lipasa derivada de *Thermomyces lanuginosus*. Como material en polvo de esta lipasa se puede usar un material en polvo obtenido sometiendo la lipozima 55 TL (100L) de NOVOZYME Japan Co., Ltd para tratamiento con membrana y después triturar lo resultante por secado por pulverización.

El diámetro de partícula de las lipasas en polvo de los componentes (a) y (b) es opcional. Sin embargo, el 90% o 60 más de los polvos de lipasa preferentemente tienen un diámetro de partículas de 1 a 100 µm. Por ejemplo, el diámetro de partícula de la lipasa en polvo se puede determinar con el Analizador de Distribución de Tamaño de Partículas (LA-500) de HORIBA, Ltd.

De acuerdo con la presente invención, en cuanto a la proporción de las lipasas en polvo de los componentes (a) y 65 (b), la relación de peso del componente (a) al componente (b) varía preferentemente de 1:99 a 99:1. En particular la relación de peso de (a), la lipasa en polvo que es una lipasa derivada *Rhizomucor* sp., a (b), la lipasa en polvo que es una lipasa derivada de *Alcaligenes* sp. varía más preferentemente de 60:40 a 98:2, y lo más preferentemente de 70:30 a 95:5. Además, la relación de peso de (a), la lipasa en polvo que es una lipasa derivada de *Penicillium* sp. a (b), la

ES 2 321 963 T3

lipasa en polvo que es una lipasa derivada de *Alcaligenes* sp. varía más preferentemente de 10:90 a 90:10, y lo más preferentemente de 70:30 a 30:70. En particular esta combinación de estas lipasas se caracteriza por la relación de combinación extremadamente amplia de las dos lipasas en polvo que produce efectos ventajosos.

5 La relación de peso de (a), la lipasa en polvo a (b), la lipasa en polvo que es una lipasa derivada de *Rhizopus* sp. varía más preferentemente de 10:90 a 70:30, y lo más preferentemente de 20:80 a 40:60. Además la relación en peso de (a), la lipasa en polvo y (b), la lipasa en polvo que es una lipasa derivada de *Thermomyces* sp. varía más preferentemente de 10:90 a 90:10, y lo más preferentemente de 30:70 a 80:20.

10 El procedimiento de esterificación que usa la composición de lipasa en polvo de la presente invención se explica más adelante.

El compuesto que tiene al menos un grupo hidroxilo alcohólico en la molécula, que está esterificado incluye diversos compuestos tales como diversos monoalcoholes, alcoholes polihidroxilados, amino alcoholes, etc. El ejemplo
15 del compuesto incluye alcoholes de cadena corta, de cadena media o de cadena larga, saturados o no saturados, lineales o ramificados, alcoholes polihidroxilados tales como glicoles, glicerina, eritritoles. Entre éstos, se prefiere la glicerina.

Por otra parte, los ejemplos de ácido carboxílico incluyen ácido carboxílico de cadena corta, de cadena media o de cadena larga, saturado o no saturado, lineal o ramificado. Éstos incluyen ácidos grasos C_{6-30} tales como ácido octa-
20 noico, ácido decanoico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico, etc. Estos ácidos carboxílicos se pueden usar de manera individual o en combinación de dos o más. Entre éstos, se prefiere ácido graso insaturado, en particular se prefiere ácido linoleico conjugado.

La esterificación se puede llevar a cabo, por ejemplo, en la condición descrita en la Publicación no examina-
25 da de patente Japonesa (KOKAI) Hei 13-169795 y la Publicación no examinada de patente Japonesa (KOKAI) Hei 15-113396. Para un ejemplo, basándose en el peso total del sustrato, es decir, el peso total del compuesto (s) que tiene (n) grupo hidroxilo alcohólico y ácido(s) carboxílico(s), se añade 0,1 a 2% en peso de la composición de lipasa en polvo de acuerdo con la presente invención, y la reacción se lleva a cabo a 30 a 60°C durante 24 a 72 horas. En este caso, la reacción se lleva a cabo preferentemente mientras el agua producida por la esterificación se elimina (deshidra-
30 tación) reduciendo la presión del sistema de reacción. El nivel de despresurización (grado de presión reducida) varía preferentemente de 1 a 100 hPa, más preferentemente de 1 a 50 hPa, y lo preferentemente de 1 a 25 hPa. Dentro de este intervalo, la deshidratación se lleva a cabo más preferentemente mientras el nivel de despresurización se incre-
menta progresivamente. Además, la deshidratación se puede llevar a cabo más eficazmente inyectado nitrógeno en el tratamiento de deshidratación. En el caso en el que se use la lipasa en polvo que es una lipasa derivada de *Penicillium*
35 sp., se prefiere que, basándose en el peso total del sustrato, se añada con antelación de 0,1 a 5% en peso de agua y se inicia la reacción y después, la reacción se lleva a cabo mientras se elimina el agua producida por la esterificación.

De acuerdo con la presente invención, se puede obtener una relación extremadamente alta de esterificación, en particular, se puede preparar triglicérido directamente a partir de glicerina y ácido carboxílico con buen rendimiento.
40

La presente invención se explicará en detalle mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo de preparación 1

45 Se separan los componentes de bajo peso molecular mediante el uso del módulo de UF (Asahi Chemical Industry Co., Ltd. SIP-0013) a partir de una lipasa derivada de *Rhizomucor miehei* de NOVOZYME Japan Co., Ltd., nombre comercial. Palatasa (20000L), que se disolvió y se dispersó en una solución acuosa obteniendo una solución acuosa que contiene una lipasa (concentración del contenido en sólidos: 10,6% en peso). Específicamente, la lipasa líquida (Palatasa) se trató con membranas de ultrafiltración bajo enfriamiento con hielo y se concentró de manera que se
50 llegara a la mitad de su volumen. Después, se añadió a esta la misma cantidad de un tampón fosfato 0,01 M que de la solución concentrada. Se llevaron a cabo los mismos procedimientos de ultrafiltración y adición de un tampón fosfato tres veces a la solución resultante obteniendo una solución acuosa que contiene una lipasa (la relación en volumen de una solución concentrada de lipasa /tampón = 1 / 1).

55 Se ajustó el pH de la solución acuosa que contiene una lipasa con una solución acuosa de hidróxido de sodio para que llegara a ser el pH 6,8 a 6,9.

Después la solución se pulverizó usando un secador de pulverización (SD-1000: TOKIO RIKAKIKAI CO, LTD) en las condiciones de temperatura de entrada: 130°C, el contenido en aire para secar: 0,7 a 1,1 m³/min, y presión de
60 pulverización: 11 a 12 kPa obteniendo polvo de lipasa. La forma del polvo de lipasa así obtenida era esférica, 90% en peso o más del polvo de lipasa tiene un tamaño de partículas de 1 a 100 µm y su tamaño de partícula medio era 8,2 µm. El tamaño de partículas se determinó mediante el Analizador de Distribución de Tamaño de Partículas (LA-500) de HORIBA, Ltd. El contenido en agua después de secar por calor a 105°C durante 1 hora fue de 7,9% en peso.

65 La concentración del contenido en sólidos en la solución acuosa que contiene una lipasa se determinó como % Brix mediante el uso del analizador de contenido en azúcar (CISC o., Ltd.: BRX-242).

Ejemplo 1

Reacción de esterificación en la condición de inyección de nitrógeno usando diversas lipasas o composiciones de lipasa

Al recipiente de reacción con agitador, se añadieron 10 g de glicerina y 90 g de ácido linoleico conjugado. A la mezcla, se añadió con agitación la siguiente enzima de polvo de lipasa. Inmediatamente después se dejó el producto resultante reposar durante 30 minutos mientras se mantenía la temperatura a aproximadamente 45°C en un baño de agua, se llevó a cabo la despresurización mediante una bomba de despresurización. En ese momento, se inyectó nitrógeno para permitir una fácil producción de agua.

Al principio, el nivel de despresurización se mantuvo a aproximadamente 40 hPa. Después de 2 a 3 horas, la temperatura se incrementó de manera gradual hasta aproximadamente 50°C. Después de 2 a 3 horas más, la temperatura se incrementó hasta aproximadamente 60°C. Después se mantuvo esta temperatura. Por otra parte, el nivel de despresurización se incrementó de manera gradual, finalmente hasta aproximadamente 10 hPa.

Si se usó G, o G + QL como enzima, antes de la reacción, se añadió a esta agua al 2% en peso basándose en el peso total de glicerina y ácido linoleico conjugado.

El progreso de la reacción de esterificación se confirmó mediante análisis de GLC mientras se llevaba a cabo el muestreo según fuera necesario. En este caso, se determinaron los porcentajes de glicerina sin reaccionar, MG, DG, TG, y la velocidad de producción de TG se mostró en la siguiente Tabla 1 y en la Fig 1.

Lipasa usada

RM (1%): La lipasa en polvo derivada de *Rhizomucor miehei* que pertenece a *Rhizomucor* sp., preparada mediante el Ejemplo de preparación 1 se usó sola. Los valores numéricos mostrados en paréntesis indican la cantidad de lipasa usada. Si dicho valor numérico es 1%, significa que la cantidad de lipasa usada es 1% en peso basándose en el peso total de la glicerina y ácido linoleico conjugado (de aquí en adelante, el mismo).

RM (1%) + QL (0,1%): (presente invención): Se usó la combinación de la lipasa en polvo derivada de *Rhizomucor miehei* que pertenece a *Rhizomucor* sp., preparada mediante el Ejemplo de preparación 1 y la lipasa en polvo QL derivada de *Alcaligenes* sp., preparada por Meito Sangyo Co., Ltd. La cantidad usada se mostró en paréntesis (de aquí en adelante, el mismo).

G (1%): La lipasa en polvo G "AMANO" 50 derivada de *Penicillium* sp., preparada por AMANO ENZYME Co., Ltd, se usó sola.

G (0,7%) + QL (0,3%): (presente invención): Se usó la combinación de la lipasa en polvo G "AMANO" 50 derivada de *Penicillium* sp., preparada por AMANO ENZYME Co., Ltd, y la lipasa en polvo QL derivada de *Alcaligenes* sp., preparada por Meito Sangyo Co., Ltd.

QL (1%): La lipasa en polvo QL derivada de *Alcaligenes* sp., preparada por Meito Sangyo Co., Ltd., se usó sola.

TABLA 1

Tiempo de reacción (h)	RM (1%)	RM (1%) + QL (0,1%)	G (1%)	G (0,7%) + QL (0,3%)	QL (1%)
0	0	0	0	0	0
4				14	2
5,5		25			
8	26		0	28	
16				53	
20	56	81		64	3
22			2	69	
24	64	85			
28	69	87	3		
44	75	91	4	87	3

ES 2 321 963 T3

A partir del resultado mostrado en la Tabla 1, se encuentra que el rendimiento de triglicérido después de 44 horas se había incrementado en gran medida, en particular entre 75% y 91% cuando se usó una combinación de la lipasa en polvo derivada de *Rhizomucor miehei* que pertenece a *Rhizomucor* sp., y la lipasa en polvo QL derivada de *Alcaligenes* sp., (RM (1%) + QL (0,1%)) en lugar de la lipasa en polvo usada sola derivada de *Rhizomucor miehei* que pertenece a *Rhizomucor* sp., (RM (1%)). Además, a la vista de la producción de triglicérido, el tiempo en el que la producción de triglicérido alcanzó el 75% fue superior a 40 horas en el caso de RM (1%). Por otra parte, en el caso de RM (1%) + QL (0,1%), el tiempo fue la mitad del de RM (1%), es decir 20 horas.

Para los expertos en la técnica, fue sorprendente que incluso si se usaba la lipasa en polvo QL derivada de *Alcaligenes* sp. sola en una cantidad de 1%, apenas se producía triglicérido.

Por otra parte, para los expertos en la técnica, fue sorprendente que incluso si se usaba sola la lipasa en polvo G "AMANO" 50 derivada de *Penicillium* sp., (G (1%)) o la lipasa en polvo QL derivada de *Alcaligenes* sp., (QL (1%)), apenas se producía triglicérido, pero si se usaba una combinación de estas lipasas G (0,7%) + QL (0,3%), la producción de triglicérido después de 44 horas era muy alta, en particular, 87%.

Ejemplo 2

Reacción de esterificación usando RM o diversas composiciones de lipasa

Para llevar a cabo la reacción de esterificación, se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 salvo porque no se llevó a cabo la inyección de nitrógeno gas, se añadió agua o no se añadió, y los niveles de despresurización finales fueron los mostrados en la tabla 2. El muestreo se llevó a cabo después de 47 horas desde el comienzo de la reacción, y la velocidad de producción de TG se confirmó mediante análisis de GLC. En este caso, se determinaron los porcentajes de glicerina sin reaccionar, MG, DG, TG. La velocidad de producción de TG se muestra en la siguiente Tabla 2. En la Tabla 2, en el caso en el que no aparece la descripción de "agua añadida", no se añadió agua. Además, los valores numéricos expresados como % en la columna de enzima en la Tabla 2 indican la cantidad usada de lipasa. Si el valor numérico es 1%, la cantidad usada de lipasa es 1% en peso basándose en el peso total de glicerina y ácido linoleico conjugado. Además la relación numérica descrita entre paréntesis en la columna de Enzima en la Tabla 2 indica la relación de peso de diversas combinaciones de lipasa.

Lipasa usada

RM (1%): La lipasa en polvo derivada de *Rhizomucor miehei* que pertenece a *Rhizomucor* sp., que es la misma que la del Ejemplo 1.

QL: La lipasa en polvo QL derivada de *Alcaligenes* sp., preparada por Meito Sangyo Co., Ltd., que es la misma que la del Ejemplo 1.

G: La lipasa en polvo G "AMANO" 50 derivada de *Penicillium* sp., preparada por AMANO ENZYME Co., Ltd, que es la misma que la del Ejemplo 1.

PL: La lipasa en polvo PL derivada de *Alcaligenes* sp., preparada por Meito Sangyo Co., Ltd.

TL: El polvo obtenido sometiendo la lipozima TL (100 L) derivada de *Thermomyces lanuginosus* preparada sometiendo NOVOZYME Japan Co., Ltd., a tratamiento de membrana y después secado por pulverización.

F-AP: La lipasa en polvo F-AP15 derivada de *Rhizopus oryzae*, preparada por AMANO ENZYME Co., Ltd.

TABLA 2

Enzima	TG %	Despresurización, hPa
RM usada sola 1%	69	20
RM + QL (1%, 8:2)	82	19
G + QL (1%, 5:5) agua añadida 2%	80	19
RM + PL (1%, 8:2)	83	17
G + TL (1%, 5:5) agua añadida 1%	89	5
G + F-AP (1%, 3:7) agua añadida 2%	83	3
RM + TL (0,6%, 8:2)	72	16

A partir del resultado mostrado en la Tabla 2, es evidente que una combinación de las lipasas particulares (a) y (b) mejora la relación de esterificación.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de lipasa que comprende (a) una lipasa en polvo que es una lipasa derivada de *Rhizomucor* sp. o una lipasa en polvo derivada de *Penicillium* sp. y (b) una lipasa en polvo seleccionada del grupo constituido por una lipasa en polvo que es una lipasa derivada de *Alcaligenes* sp., una lipasa en polvo que es una lipasa derivada de *Rhizopus* sp. y una lipasa en polvo que es una lipasa derivada de *Thermomyces* sp.
- 10 2. La composición de lipasa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la lipasa en polvo (b) es la lipasa en polvo derivada de *Alcaligenes* sp.
3. La composición de lipasa de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que la lipasa en polvo (a) es una lipasa en polvo derivada de *Rhizomucor miehei*.
- 15 4. La composición de lipasa de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que la lipasa derivada de *Penicillium* sp. es una lipasa derivada de *Penicillium camemberti*.
5. La composición de lipasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que las lipasas en polvo de (a) y (b) no están soportadas sobre soportes.
- 20 6. La composición de lipasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el contenido en agua de las lipasas en polvo de (a) y (b) es igual o inferior a 10%.
- 25 7. La composición de lipasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que 90% en peso o más de las lipasas en polvo tienen un tamaño de partículas de 1 a 100 μm .
8. La composición de lipasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que se usa para esterificación.
- 30 9. Un procedimiento para preparar un compuesto(s) esterificado(s), que comprende esterificar un compuesto(s) que tiene(n) al menos un grupo hidroxilo alcohólico en la molécula, en presencia de la composición de lipasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, con un ácido(s) carboxílico(s).
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9 en el que el compuesto que tiene al menos un grupo hidroxilo alcohólico en la molécula es glicerina.
- 35 11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9 ó 10, en el que el ácido carboxílico es ácido graso insaturado.
- 40 12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que la esterificación se lleva a cabo a presión reducida.

FIG. 1

