(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 342 200**

(51) Int. Cl.:
***C12M 1/40*** (2006.01)
***C12P 7/64*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **07005920 .9**
(96) Fecha de presentación : **22.03.2007**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1840204**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **03.10.2007**

(54) Título: **Modificación enzimática en una columna de lecho empaquetado regenerada en continuo.**

(30) Prioridad: **31.03.2006 EP 06006835**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
**02.07.2010**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
**02.07.2010**

(73) Titular/es: **CARGILL, INCORPORATED**
**15407 McGinty Road West**
**Wayzata, Minnesota 55391-5624, US**

(72) Inventor/es: **Peeters, Esther Hendrika Gerarda;**
**Kruidenberg, Marcus Bernardus y**
**Dell, Andrew James**

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Modificación enzimática en una columna de lecho empaquetado regenerada en continuo.

Se están utilizando crecientemente las reacciones enzimáticas para el procesamiento de materiales a escala industrial. Una etapa comercial importante ha sido el desarrollo de enzimas inmovilizados, es decir, enzimas que se unen físicamente a un soporte sólido, mediante adsorción o enlace químico, para facilitar la separación del enzima respecto de la solución de reacción. La inmovilización también permite la utilización múltiple o repetida de los enzimas y con frecuencia incrementa su estabilidad.

Se utilizan varios tipos de reactor conjuntamente con los enzimas inmovilizados: reactores de lecho empaquetado (también denominados reactores de lecho fijo), reactores de lecho fluidizado, reactores por lotes con agitación, reactores de tanque con agitación continua y reactores de membranas. En la producción a gran escala, se utilizan comúnmente reactores de lecho empaquetado para aplicaciones particulares. En este tipo de reactores, el enzima inmovilizado se empaqueta en una columna o lecho plano, bombeando simultáneamente los flujos de sustrato y de producto hacia el interior y el exterior del reactor, respectivamente. Las ventajas principales de este tipo de reactor son su fácil adaptación a escalas grandes, su elevada eficiencia, bajo coste, facilidad de operación y también un área superficial incrementada por unidad de volumen en comparación con los sistemas reactores de membranas (ver W.M. Willis y A.G. Marangoni, Enzymatic Interesterification, en: Food Lipids - Chemistry, Nutrition, and Biotechnology, editado por C.C. Akoh y D.B. Min, páginas 839 a 875).

Un tipo de reacción en el que la utilización de enzimas como catalizadores ha crecido en importancia en los últimos años en la industria de los aceites y grasas es la interesterificación. La interesterificación es el intercambio de grupos acilo entre un éster y un ácido (acidolisis), un éster y un alcohol (alcoholisis) o entre dos ésteres (transesterificación). Los enzimas capaces de reacciones de interesterificación son lipasas tales como las glicerol éster hidrolasas (EC 3.1.1.3). Estos enzimas se obtienen predominantemente a partir de bacterias, de levaduras y de hongos. Estos microorganismos secretan lipasas a su ambiente para digerir los materiales lipídicos para su posterior incorporación. En un ambiente acuoso, las lipasas catalizan la hidrólisis de triacilglicéridos para producir diacilglicéridos, monoacilglicéridos, glicerol y ácidos grasos libres. Sin embargo, bajo condiciones de limitación de agua, la reacción inversa, la síntesis de ésteres, también puede llevarse a cabo. Por lo tanto, la dirección de la reacción puede manipularse mediante la regulación de la actividad de agua. A concentraciones de agua muy reducidas predomina la síntesis de ésteres, con un contenido de agua superior a unos cuantos puntos porcentuales, la reacción prevalente es la hidrólisis, y entre ambas, habitualmente con un contenido de agua inferior a 1% (p/v), la transesterificación es la más efectiva.

Owusu-Ansar describió en 1994 la utilización de lipasas inmovilizadas en un reactor de tanque con agitación para la producción a gran escala de equivalentes de la manteca de cacao mediante interesterificación catalizada por lipasa (en: B.S. Carmail y Y. Kakuda (editores), Technological Advances in Improved and Alternative Sources of Lipids, páginas 360 a 389).

Se ha dado a conocer un procedimiento de interesterificación en lecho empaquetado en el documento WO 83/03844, en la que se disuelven triacilglicéridos en un solvente orgánico polar. La lipasa se inmoviliza mediante precipitación sobre kieselguhr, hidroxiapatito o partículas de alúmina.

El documento WO 97/01632 se refiere a otro procedimiento para la inmovilización de un enzima, específicamente una lipasa o una fosfolipasa, para el procesamiento de aceites triglicéridos.

Unilever ha dado a conocer además un procedimiento de dos etapas para la producción de equivalentes de manteca de cacao y Betapol utilizando columnas de lecho empaquetado (P. Quinlan y S. Moore, Inform 4, 580-585, (1993); A. Rozendaal y A.R. Macrae, en: F.D. Gansdone y F.B. Padlee (editores), Lipid Technologies and Applications, páginas 223 a 263, 1997).

X. Xu describe procedimientos adicionales con lipasas inmovilizadas, entre ellas un reactor de lecho empaquetado con una capacidad de 10 kg/día (en: U.T. Bornscheuer, Enzymes in Lipid Modification, páginas 190 a 215, 2000). El mismo autor describe un sistema de uno o varios reactores de lecho empaquetado separados para la modificación enzimática de lípidos utilizando un lecho empaquetado de enzima inmovilizado (Eur. J. Lipid Sci. Technol. 105:289-304, (2003)). Un reactor de lecho empaquetado similar para la hidrólisis de grasas líquidas se da a conocer en la patente US nº 4.629.742.

La patente US nº 4.209.591 da a conocer un reactor de columna que contiene varios lechos fluidizados discretos de enzima inmovilizado granular conectados en serie. En este reactor, las partículas de enzimas se pasan periódicamente de un lecho fluidizado al siguiente en contracorriente respecto al flujo del sustrato utilizando un sistema separado de tuberías y bomba.

El reactor dado a conocer en la patente alemana de utilidad DE nº 93 20 595 U1 utiliza un sistema similar de sectores múltiples separados con un tornillo sinfín o un rastrillo de agitación para transportar los microorganismos inmovilizados o suspendidos conjuntamente con el sector entero.

Los reactores de lecho empaquetado existentes adolecen del problema de una reducción de la tasa de conversión durante el tiempo. Aunque algunos enzimas, tales como las lipasas, son bastante estables, su eficacia inevitablemente cae durante el tiempo, resultando en velocidades de reacción más bajas y en una calidad del producto no uniforme. Esta reducción de la calidad puede contrarrestarse mediante la reducción del caudal, incrementando de esta manera el tiempo de residencia de los reactivos en el reactor. Sin embargo, esta reducción del caudal conduce a una tasa de producción no uniforme y, aunque puede reducir las fluctuaciones de la calidad del producto, no puede evitarlas por completo. Además, este tipo de procedimiento con frecuencia utiliza varios reactores discretos en serie, lo que requiere un control complejo del flujo para operar y mantener el sistema. La presente invención resuelve este problema y los problemas relacionados mediante la utilización de un nuevo tipo de procedimiento de columna de lecho empaquetado para la modificación enzimática de un sustrato.

**Sumario de la invención**

La invención se refiere a un procedimiento para la modificación de un sustrato, que comprende pasar el sustrato por una columna de lecho empaquetado de un volumen específico de enzima inmovilizado con un flujo de sustrato en una dirección y un intercambio periódico de enzima inmovilizado en la dirección contraria. El sustrato entra en la columna por uno de sus extremos o próximamente al mismo (el "extremo de entrada") y el sustrato modificado se descarga por su otro extremo o próximamente al mismo (el "extremo de salida"). Una parte del volumen de enzima inmovilizado se extrae periódicamente por el extremo de entrada de la columna, mientras que periódicamente se añade una parte equivalente de enzima inmovilizado por el extremo de salida, creando de esta manera un flujo de enzima inmovilizado en dirección contraria a la del flujo de sustrato.

En la presente solicitud, en las expresiones "próximo al extremo de entrada" o "próximo al extremo de salida" el término "próximo" hace referencia que se carga o descarga material (por ejemplo sustrato, sustrato modificado, enzima inmovilizado) del reactor (a través de una abertura, válvula o similar) a una distancia razonable de dicho extremo según determine el experto en la materia. Esta distancia podría ser, por ejemplo, 1% a 5%, ó 10% de la longitud de una columna medida desde el extremo real de la columna a la que se hace referencia. Además, expresiones tales como "en el extremo" debe entenderse que incluyen "en el extremo o próximo al mismo" en su utilización en referencia a la columna, a menos que se indique específicamente lo contrario.

**Descripción detallada de la invención**

En adelante en la presente memoria, las expresiones "sustrato" y "solución de sustrato" se utilizan sinónimamente para describir un compuesto líquido o mezcla de compuestos o una solución líquida de un compuesto o de una mezcla de compuestos, que se pretende hacer reaccionar en presencia del enzima inmovilizado. De esta manera, se produce un compuesto o mezcla de compuestos líquido, o una solución líquida de un compuesto o de una mezcla de compuestos, que se denomina "producto" o "sustrato modificado", sinónimamente.

La invención se refiere a un procedimiento para la modificación enzimática de un sustrato en el que se hace pasar el sustrato por una columna de lecho empaquetado de enzima inmovilizado. El sustrato entra en la columna de lecho empaquetado en un extremo de la columna o próximamente al mismo (en lo sucesivo denominado "extremo de entrada") y pasa por la columna hacia su otro extremo (en lo sucesivo en la presente memoria denominado "extremo de salida"), donde el sustrato sale de la columna.

Preferentemente, la columna es una columna vertical con su extremo de entrada en el fondo de la columna y su extremo de salida en el tope de la columna. En la presente forma de realización, el sustrato entra en el lecho en primer lugar por su parte inferior o en la proximidad de la misma y sale de la columna por su parte situada superior o en la proximidad de la misma.

Ventajosamente, los flujos de sustrato y de sustrato modificado pueden ser esencialmente continuos. Lo anterior significa que, aunque los flujos de sustrato y de sustrato modificado pueden detenerse para permitir el cambio periódico de una parte del volumen de enzima inmovilizado, no resulta necesario un periodo prolongado de tiempo de inactividad. Esto diferencia el presente procedimiento de los métodos existentes, en los que eran necesarios periodos prolongados de inactividad, entre otras cosas para cambiar el volumen completo de enzima inmovilizado. Lo anterior no sólo reduce costes *per se*, sino que también puede evitar fluctuaciones de los costes.

Según la presente invención, sólo se extrae periódicamente de la columna una parte definida del enzima inmovilizado. Esto puede conseguirse, a título únicamente ilustrativo, siguiendo el procedimiento siguiente. Se detiene el flujo continuo de sustrato. Se abre una válvula de descarga en el extremo de entrada de la columna y se libera una parte definida de la mezcla en suspensión que contiene material de enzima inmovilizado del extremo del fondo de la columna. Tras descargar una cantidad definida de mezcla en suspensión, se cierra la válvula de descarga y se abre una válvula de alimentación situada en el extremo de salida, o situada en una línea que alimenta hacia el extremo de salida del reactor, permitiendo de esta manera la entrada de una mezcla en suspensión fresca de material de enzima inmovilizado en la columna procedente de su recipiente de suministro.

La suspensión de enzima inmovilizado puede formarse mediante la introducción de una cantidad definida del sustrato modificado en el recipiente de suministro. En caso necesario, para potenciar la mezcla y para mejorar la humectación de los poros del enzima inmovilizado, el recipiente puede dotarse de un dispositivo de agitación y/o puede

operarse al vacío. En el momento de añadir al reactor una carga nueva de enzima, el recipiente de suministro puede desairearse y la suspensión, o una parte de la misma, vaciarse en la columna. Seguidamente se cierra la válvula de alimentación, permitiendo que la suspensión fresca sedimente al final del lecho empaquetado. Finalmente, se reabren las válvulas que regulan los flujos de sustrato y de producto.

El reactor puede hacerse funcionar al vacío. Sin embargo, preferentemente se hace funcionar bajo una presión determinada ("presión de diseño"). La presión de diseño debe seleccionarse para permitir una caída de presión máxima a lo largo de la columna. La caída de presión dependerá de las características de las partículas de enzima inmovilizado (por ejemplo la distribución de tamaños de partícula), el caudal de sustrato y la altura del lecho. A título de ejemplo únicamente, una presión de diseño adecuada en un lecho de enzimas relativamente alto y con un caudal de sustrato relativamente elevado puede ser de aproximadamente 10 bares. Con una altura de lecho más baja y un caudal más lento, este valor puede aproximarse más a 6 bares. La presión de diseño apropiada para cualquier reactor dado será fácilmente determinada por un experto en la materia.

Para garantizar que la presión de diseño no resulta excedida por la presión de alimentación, las bombas de alimentación no deben presentar una capacidad superior a la presión de diseño. Además, las entradas del reactor deben estar dotadas de válvulas de no retorno, de válvulas de apertura/cierre y de dispositivos de control del caudal.

Idealmente, la descarga de enzima agotado y la adición de enzima fresco se realizarán concurrentemente o de manera sustancialmente concurrente. Lo anterior significa que la descarga y la adición deben llevarse a cabo durante el mismo periodo de inactividad. También resulta preferente que se descargue sustancialmente la misma cantidad de material de enzima que la cantidad añadida, garantizando de esta manera que el reactor mantiene sus características de lecho empaquetado. La excepción a ambas reglas puede producirse, por ejemplo, tras el arranque inicial del reactor, debido a un determinado nivel de compactación de la columna. En efecto puede resultar necesario en esta situación añadir un poco más de suspensión que la descargada o incluso añadir suspensión sin ninguna descarga.

Mediante la repetición de este cambio de una parte del material de lecho, se garantiza un flujo gradual de enzima inmovilizado de tope a fondo de la columna. En consecuencia, la solución de sustrato primero entra en contacto con el material de enzima más agotado y al final, con el enzima más fresco.

Ventajosamente, el cambio periódico de una parte del enzima inmovilizado puede automatizarse en su mayor parte, limitando de esta manera la función de un operador, reduciendo costes asociados y restringiendo la probabilidad de que se produzcan errores de funcionamiento.

Este sistema puede compararse con múltiples reactores básicos pequeños separados en serie. En comparación con esta serie, la complejidad de la presente invención se ha reducido en gran medida, particularmente el número de válvulas de entrada y de salida. Además, la solución procesada no necesita transportarse entre los múltiples reactores. Esto resulta particularmente importante en el caso de que se debe almacenar la solución de sustrato y/o de producto a una temperatura determinada o en el caso de que presenten una viscosidad elevada. Además, un sistema de reactores pequeños requiere que uno o más de los reactores se encuentre periódicamente fuera de servicio mientras se extrae el enzima agotado y se añade enzima fresco. Ésta es una operación manual intensiva y durante este tiempo se reduce mucho la eficiencia del sistema entero. De acuerdo con lo anterior, el capital global y los costes de funcionamiento para este tipo de sistema no son óptimos. Además, el sistema de la presente invención permite una gradación prácticamente infinita de actividad enzimática, de enzima fresco a enzima agotado. Esto no podía conseguirse ni siquiera con un número elevado de reactores separados.

El procedimiento de la invención permite un caudal esencialmente continuo, debido a que básicamente todo el sustrato se encuentra con el mismo nivel de actividad de enzima durante su paso por el reactor. Debido a que la actividad del enzima inmovilizado varía con la edad y el uso, el contacto uniforme del sustrato con el enzima en diversas etapas de actividad resulta decisivo para garantizar una calidad del producto más constante. Por lo tanto, puede aplicarse un caudal constante.

La frecuencia con la que se sustituye material de enzima depende, entre otras cosas, de la tasa de reducción de la actividad del enzima durante el tiempo y del tiempo de residencia deseado de la solución de sustrato en el lecho de enzima empaquetado. El volumen de material de enzima cambiado y la duración de los intervalos entre estos cambios puede adaptarse fácilmente a las necesidades del procedimiento y/o del sustrato. Además, existe una relación entre la frecuencia con la que se refresca el enzima y el volumen de enzima que ha sido refrescado. Con todas las demás variables del procedimiento constantes, puede refrescarse una cantidad pequeña de enzima frecuentemente o una cantidad más grande de enzima menos frecuentemente. Preferentemente se refresca un porcentaje fijo del volumen total de la columna diariamente. Idealmente este porcentaje es inferior a 35% del volumen total de enzima inmovilizado. Preferentemente es inferior a 25%, más preferentemente es inferior a 10%, todavía más preferentemente es inferior a 5%. Según una posible forma de realización, se refresca diariamente entre aproximadamente 0,3% y aproximadamente 3% del volumen total de enzima inmovilizado.

Tras el paso por la columna de lecho empaquetado de enzima inmovilizado, debe alcanzarse una conversión suficiente del sustrato. En el tope de la columna puede facilitarse la salida de producto utilizando tamices de filtración pequeños de forma cilíndrica. Estos regulan el flujo de salida del producto, manteniendo el material de enzima inmovilizado en el interior del reactor. Existen dos tipos de tamices: tamices de ventilación y tamices estándares. Los tamices

estándares e utilizan para el flujo mismo de salida de producto, mientras que los tamices de ventilación se encuentran más arriba en la columna y facilitan el flujo de aire o gas durante el drenaje y el rellenado.

Las bombas que regulan la entrada y salida de las suspensiones de enzima deben diseñarse para que no rompan el enzima inmovilizado creando finos adicionales. Lo anterior ayuda a producir un flujo uniforme y evitar que pasen finos a dispositivos de filtración posteriores.

El enzima descargado será una suspensión de enzima inmovilizado utilizado (o "agotado") y solución de sustrato. Esta suspensión puede separarse y la solución de sustrato puede reintroducirse en el tanque que proporciona la entrada de sustrato a la columna de reacción. El enzima utilizado puede eliminarse. Sin embargo, preferentemente se procesa para su uso posterior.

El enzima extraído de la columna en efecto puede reciclarse. Por ejemplo, en algunos casos el enzima extraído de la columna todavía presenta cierta actividad residual, a la que puede accederse en el caso de que el material inmovilizado se rompa en partículas más pequeñas, exponiendo de esta manera sitios activos del enzima que previamente no se encontraban disponibles en absoluto o que simplemente eran accesibles al sustrato de manera restringida (este procedimiento se conoce como "reactivación"). Alternativamente, el enzima puede regenerarse y reutilizarse. De esta manera, en una forma de realización preferente del procedimiento según la invención, el material de enzima descargado de la columna se regenera o se reactiva o se reutiliza, por ejemplo para pretratar el sustrato, antes de introducirlo en la columna o de añadirlo al tanque que suministra la entrada de enzima inmovilizado. También puede reutilizarse en otros sistemas como modificación de lote.

El procedimiento de la presente invención puede operarse en una única columna o mediante el paso del sustrato por dos o más columnas de enzima inmovilizado dispuestas en paralelo. La expresión "enzima inmovilizado" adopta su significado normal de la técnica, es decir, de un enzima que se encuentra físicamente unido a un soporte sólido. Entre los soportes preferentes se incluyen los soportes de sílice y de resina. El enzima inmovilizado puede encontrarse presente en forma de gránulos, partículas aglomeradas o cualquier otra forma considerada adecuada por el experto en la materia.

La elección de enzima evidentemente dependerá del tipo de reacción que debe llevarse a cabo, es decir, de la naturaleza del sustrato y de la modificación deseada del mismo. Podría ser cualquier oxidorreductasa, transferasa, hidrolasa, lisasa, isomerasa o ligasa disponible de la técnica. A título ilustrativo, entre las hidrolasas adecuadas podrían incluirse hidrolasas de éster carboxílico (EC-3.1.1), tales como carboxilesterasas, triacilglicerol-lipasas, fosfolipasa A2, esterol-esterasas, acilglicerol-lipasas, fosfolipasa A1 e hidrolasas de éster de cera; e hidrolasas de diéster fosfórico (EC-3.1.4), tales como fosfolipasa C y fosfolipasa D. Estos enzimas pueden utilizarse, por ejemplo, para catalizar hidrólisis, alcoholisis o la conversión inversa correspondiente (condensación). El experto en la materia conocerá otros enzimas adecuados, dependiendo de la modificación específica que deba llevarse a cabo.

El sustrato puede ser cualquier material o sustancia sobre la que pueda actuar un enzima. Puede incluir, por ejemplo, uno o más lípidos, una o más proteínas, uno o más carbohidratos o una mezcla de los mismos. El término "lípido" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere no sólo a aceites crudos o procesados y fracciones de los mismos, sino también a triacilglicéridos, diacilglicéridos, monoacilglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos libres, ésteres de ácido graso y mezclas de los mismos. El término "proteína" puede referirse, entre otros, a polipéptidos tanto complejos como simples, en su estado plegado o desnaturalizado, a secuencias de péptido corto y a aminoácidos individuales. El término "carbohidrato" se refiere, por ejemplo, a unidades individuales de monosacárido, disacárido, oligosacárido y polisacárido, tal como almidón, celulosa y similares. El sustrato puede mezclarse con otros reactivos (tales como un alcohol o agua), o con un solvente en caso necesario. Si se desea, el sustrato puede refinarse antes de entrar en la columna. El refinado se refiere a la eliminación de impurezas, tales como residuos y productos secundarios, y contribuirá a prolongar la vida de los enzimas inmovilizados.

Tal como se ha mencionado anteriormente, el procedimiento de la presente invención puede utilizarse para llevar a cabo cualquier tipo de reacción enzimática. Sin embargo, a continuación se describen con mayor detalle algunas posibles formas de realización a título de ilustración. Éstas no deben interpretarse en modo alguno como limitativas del alcance de la invención. Por el contrario, debe apreciarse que sus enseñanzas, en su caso, resultan aplicables a la invención en su totalidad.

*Interesterificación*

La presente forma de realización se refiere a la interesterificación de aceites. La interesterificación modifica el perfil acilglicerol del aceite o mezcla de aceites, modificando de esta manera sus propiedades físicas.

Según la presente forma de realización, el enzima de elección es una lipasa. Idealmente el enzima se encuentra inmovilizado sobre un soporte de sílice. Un enzima inmovilizado adecuado es la lipasa Lypozyme TL IM de Novozymes.

El sustrato, que puede utilizarse en un estado refinado o no refinado dependiendo de las necesidades, típicamente comprende un acilglicérido, tal como un triacilglicérido, un diacilglicérido, un monoacilglicéridos, o una mezcla de dos o más de los mismos. Puede derivarse de una planta, animal, pez, alga o célula individual. Preferentemente se

deriva de una planta. Por lo tanto, entre los sustratos adecuados se incluyen, aunque sin limitación, aceite de palmiste, aceite de palma, aceite de coco, aceite de oliva, aceite de colza, aceite de canola, aceite de linaza, aceite de nuez molida, aceite de soja, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de semilla de calabaza, aceite de maíz, aceite de ricino, aceite de nuez y mezclas de dos o más de los mismos. El sustrato puede incluir aceites completos y/o fracciones de aceite, tales como estearinas u oleínas.

Según una forma de realización, el sustrato comprende estearina de palma, aceite de coco, aceite de palmiste o una mezcla de dos o más de los mismos. Preferentemente el sustrato comprende una mezcla de estearina de palma más aceite de coco o una mezcla de estearina de palma más aceite de palmiste. Todavía más preferentemente, la mezcla incluye 50% a 80% en peso de estearina de palma y 50% a 20% en peso de aceite de coco y/o de palmiste, basado en el peso total de sustrato. Idealmente la mezcla incluye 65% a 75% en peso de estearina de palma y 35% a 25% en peso de aceite de coco o 60% a 70% en peso de estearina de palma y 40% a 30% en peso de aceite de palmiste. Según una forma de realización más preferente, el sustrato de la presente invención está constituido por una de dichas mezclas.

El sustrato se bombea por una o más columnas en paralelo rellenas del enzima inmovilizado. El sustrato y material de enzima inmovilizado fluyen en direcciones contrarias, con la entrada de aceite en el fondo de la columna o próximamente al mismo, y añadiendo el material de enzima fresco en el tope o próximamente al mismo. Periódicamente se intercambia una parte del enzima inmovilizado por material de enzima fresco. Por lo tanto, el enzima en la columna presentará un perfil de calidad prácticamente constante. El enzima inmovilizado en el tope de la columna es el más fresco, con actividad prácticamente máxima, y el enzima inmovilizado próximo al fondo de la columna habrá agotado prácticamente su actividad. De acuerdo con lo expuesto anteriormente, existirá una gradación de actividad a lo largo de la columna.

La reacción de interesterificación debe llevarse a cabo a una temperatura definida. Esta temperatura se selecciona considerando varios factores:

- debido a que la mayoría de aceites y grasas interesterificados producidos según el presente procedimiento están destinados a productos alimenticios, el procedimiento preferentemente se encuentra libre de solventes orgánicos. Por lo tanto, el procedimiento debe llevarse a cabo a una temperatura que garantice que los aceites/grasas permanezcan en estado líquido,

- la temperatura debe ser suficientemente elevada para permitir una velocidad de reacción elevada que, a su vez, permita tiempos de residencia más cortos,

- la temperatura debe ser suficientemente baja para no afectar a la estabilidad y actividad del enzima. Las lipasas microbianas son bastante termoestables y se encontró que la inmovilización mejoraba adicionalmente la estabilidad de estos enzimas, de manera que las temperaturas óptimas para muchas lipasas se encuentran comprendidas entre 30ºC y 62ºC (W.M. Willis y A.G. Marangoni, en: Enzymatic Interesterification, Food Lipids - Chemistry, Nutrition, and Biotechnology, editado por C.C. Akoh y D.B. Min). Algunas lipasas incluso permiten temperaturas de entre 60ºC y 75ºC (patente WO 97/01632). El desarrollo futuro de los enzimas podría incluir variedades todavía más resistentes a la temperatura, por ejemplo resistentes a 80ºC, a 90ºC, a 100ºC o a temperaturas superiores. A estas temperaturas la mayoría de triacilglicéridos, incluso los totalmente saturados, se encontrarán en estado líquido.

Considerando dichos factores, el experto en la materia podrá determinar la temperatura de reacción ideal.

A título de ejemplo, la interesterificación de la estearina de palma con aceite de coco por la Lypozyme TL IM (Novozymes) preferentemente se lleva a cabo a aproximadamente 70ºC.

Tras calentar los aceites a la temperatura deseada y mezclar, en caso necesario, se envían a la válvula de entrada en el extremo de entrada del reactor o próximamente al mismo. El reactor preferentemente está diseñado para operar bajo vacío y hasta una presión adecuada.

Se suministra enzima inmovilizado fresco en el tope de la columna a intervalos regulares. Puede bombearse una cantidad definida de aceite de producto interesterificado introduciéndolo en el recipiente de suministro, y mezclarlo con el enzima inmovilizado para producir una suspensión de flujo libre. Para incrementar la mezcla y mejorar la humectación de los poros del enzima inmovilizado, puede aplicarse un vacío al recipiente. Ventajosamente el recipiente se purga con nitrógeno para impedir la oxidación del aceite.

En el caso de que deba añadirse una carga fresca de enzima a la columna, se desairea el recipiente de suministro, en caso aplicable, y la suspensión o una parte de la misma se vacía en el rector. En caso necesario, puede hacerse fluir un volumen determinado de producto aceite por el recipiente y tuberías para garantizar el vaciado completo del recipiente. Preferentemente, el recipiente de suministro se sitúa en la parte superior del reactor para facilitar la carga del enzima.

El procedimiento de la presente forma de realización preferentemente es esencialmente continuo. El único periodo de inactividad será el de unos cuantos segundos para intercambiar una parte del enzima de la columna. Este periodo de inactividad es sólo una fracción muy pequeña del tiempo global de funcionamiento del procedimiento.

*Alcoholisis*

A menos que se indique lo contrario, los detalles de la presente forma de realización son los mismos que para la reacción de interesterificación indicada anteriormente.

El sustrato es una mezcla convenientemente agitada de uno o más aceites y uno o más alcoholes. Entre los alcoholes adecuados se incluyen, aunque sin limitación, metanol, etanol, glicerol, monopropilenglicol, etilenglicol, butanodiol, eritritol, pentaeritritol, sorbitol, esteroles, estanoles, tocoferoles, polifenoles, ésteres de dichos alcoholes y mezclas de dos o más de los mismos. El enzima inmovilizado preferentemente es una lipasa.

La reacción preferentemente se lleva a cabo a una temperatura de entre 50ºC y 70ºC. Tras su recolección en la salida del reactor, los productos (ésteres de ácido graso y glicerol) pueden aislarse. El aislamiento puede llevarse a cabo mediante enfriamiento hasta una temperatura a la que se produzca la separación de fases, seguido del aislamiento de la fase de éster de ácidos grasos y una etapa de secado. El alcohol puede recuperarse mediante evaporación directamente a partir de la mezcla, o tras aislar los ésteres de ácido graso.

*Glicerolisis*

La glicerolisis es un tipo específico de alcoholisis, tal como se ha indicado anteriormente. El sustrato es una mezcla de uno o más aceites y glicerol. El enzima es una lipasa inmovilizada sobre un portador que es inerte frente al glicerol.

El sustrato se prepara mediante la mezcla o disolución de glicerol en el aceite o aceites a la temperatura de reacción o a una temperatura ligeramente superior. La cantidad de glicerol mezclada con el aceite puede incrementarse mediante la adición de un emulsionante. Dependiendo de la proporción de glicerol a aceite, el enzima más próximo al extremo de entrada del reactor actuará tanto purificando el sustrato como ajustando la concentración de equilibrio del glicerol en el sustrato.

La reacción preferentemente se lleva a cabo a una temperatura de entre 50ºC y 70ºC. El producto recuperado tras la modificación dependerá de la proporción de glicerol a aceite del sustrato.

*Hidrólisis*

En la presente forma de realización, que contempla la forma de realización de interesterificación indicada anteriormente, a menos que se indique lo contrario, el sustrato es una lecitina bombeable o solución de lecitina. Puede obtenerse una solución de lecitina mediante la mezcla de lecitina con un solvente, tal como hexano y agua.

El enzima es una lipasa o fosfolipasa. Dependiendo del enzima, se obtienen diferentes productos. De esta manera, en el caso de que se utilice una lipasa, el producto es una mezcla de fosfolípidos y monoglicéridos y/o diglicéridos. La utilización de la fosfolipasa A o B, a una temperatura de reacción preferente de entre 20ºC y 70ºC, conducirá a la producción de lisofosfolípidos. La utilización de fosfolipasa C, a una temperatura de reacción preferente de entre 20ºC y 50ºC, conducirá a la producción de diglicéridos y/o triglicéridos. La utilización de fosfolipasa D, a una temperatura de reacción preferente de entre 20ºC y 70ºC, conducirá a la producción de ácido fosfatídico. En caso necesario puede utilizarse una mezcla de diferentes enzimas para obtener el producto deseado.

Tras la conversión, pueden utilizarse las mezclas de producto sin modificación o tras etapas de purificación adicionales (por ejemplo de lavado, secado, evaporación, fraccionamiento, etc.).

*Isomerización*

Otra posible reacción que podría llevarse a cabo según el procedimiento de la presente invención es la isomerización. Un ejemplo típico de isomerización es la conversión de glucosa en fructosa. De esta manera, según una forma de realización, el sustrato preferentemente es glucosa (o un jarabe de glucosa) y el enzima inmovilizado preferentemente es una glucosa isomerasa (EC 5.3.1.5). La reacción idealmente se lleva a cabo a una temperatura de entre 55ºC y 75ºC. El producto es un jarabe que contiene tanto glucosa como fructosa. Si se desea, el contenido de fructosa puede incrementarse adicionalmente mediante purificación o dividiendo la glucosa y la fructosa en productos separados.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la modificación de un sustrato, que comprende pasar el sustrato por una columna de lecho empaquetado de un volumen específico de enzima inmovilizado, en el que:

a) el sustrato entra en la columna en o en la proximidad de un extremo de la columna, el "extremo de entrada", y el sustrato modificado sale en o en la proximidad del extremo opuesto de la columna, el "extremo de salida",

b) una parte del volumen del enzima inmovilizado se extrae periódicamente en o en la proximidad del extremo de entrada de la columna, y

c) una parte del enzima inmovilizado se añade periódicamente en o en la proximidad del extremo de la salida de la columna.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la columna es sustancialmente vertical, con su extremo de entrada en el fondo de la columna o próximo al mismo, y su extremo de salida en la parte superior de la columna o próximo a la misma.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que el procedimiento es esencialmente un procedimiento continuo.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la parte de enzima inmovilizado que se extrae de la columna es inferior a 35% del volumen total.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la parte de enzima inmovilizado que se extrae de la columna es sustancialmente equivalente en volumen a la parte de enzima inmovilizado que se añade.

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las etapas de extracción de enzima inmovilizado de la columna y de adición de enzima inmovilizado a la columna se producen de manera sustancialmente concurrente.

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la parte extraída del enzima inmovilizado se utiliza para pretratar el sustrato antes de que entre en la columna.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la parte extraída del enzima inmovilizado se regenera o se reactiva antes de utilizarse para pretratar el sustrato.

9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la modificación es una condensación o incluye etapas de condensación.

10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la modificación es una interesterificación.

11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la modificación es una isomerización.

12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el enzima es una hidrolasa.

13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que el enzima es una lipasa o un enzima modificador de lípidos y el sustrato comprende uno o más aceites crudos, uno o más aceites procesados o una mezcla de los mismos.

14. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que el sustrato comprende uno o más triacilglicéridos, diacilglicéridos, monoacilglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos libres, ésteres de ácidos graso o mezclas de dos o más de los mismos.

15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que el sustrato comprende además un alcohol.

16. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que el alcohol se selecciona de entre: metanol, etanol, glicerol, monopropilenglicol, etilenglicol, butanodiol, eritritol, pentaeritriol, sorbitol, esteroles, estanoles, tocoferoles, polifenoles, ésteres de dichos alcoholes y mezclas de dos o más de los mismos.

17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que el sustrato comprende además agua.

18. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que el sustrato comprende uno o más aceites o fracciones de aceites a base de planta.

19. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que el sustrato comprende estearina de palma, aceite de coco, aceite de palmiste o una mezcla de dos o más de los mismos.

20. Procedimiento según la reivindicación 19, en el que el sustrato comprende 50% a 80% en peso de estearina de palma y 50% a 20% en peso de aceite de coco.

21. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que el sustrato comprende 65% a 75% en peso de estearina de palma y 35% a 25% en peso de aceite de coco.

22. Procedimiento según la reivindicación 19, en el que el sustrato comprende 50% a 80% en peso de estearina de palma y 50% a 20% en peso de aceite de palmiste.

23. Procedimiento según la reivindicación 22, en el que el sustrato comprende 60% a 70% en peso de estearina de palma y 40% a 30% en peso de aceite de palmiste.