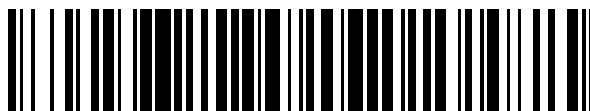


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 129**

51 Int. Cl.:
C11B 13/00 (2006.01)
C11C 1/04 (2006.01)
C11C 3/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09700952 .6**
96 Fecha de presentación: **06.01.2009**
97 Número de publicación de la solicitud: **2245126**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.11.2010**

54 Título: **Generación de triacilgliceroles a partir de gomas**

30 Prioridad:
07.01.2008 US 970270

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.06.2012

73 Titular/es:
Bunge Oils, Inc
11720 Borman Drive
St. Louis, MO 63146, US

72 Inventor/es:
DAYTON, Christopher, L.G.

74 Agente/Representante:
de Elizaburu Márquez, Alberto

ES 2 383 129 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

Generación de triacilgliceroles a partir de gomas.

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de EE.UU. de número de orden 11/970,270, presentada el 7 de enero de 2008, titulada "GENERATION OF TRIACYLGLYCEROLS FROM GUMS", de Christopher L.G. Dayton.

5 Antecedentes de la invención

Esta invención se refiere a un método para generar triacilgliceroles a partir de gomas que se recuperan de un procedimiento de refinado de aceite. Más en particular, esta invención se refiere a un procedimiento enzimático para tratar diversos fosfolípidos y lecitinas (conocidos colectivamente como "gomas") procedentes de aceites vegetales, con el fin de producir o "generar" triacilgliceroles (triglicéridos o aceites). La invención descrita en la presente memoria es un trabajo adicional basado en las invenciones descritas en la solicitud de patente de EE.UU. de número de orden 11/668,921 presentada el 30 de enero 2007 y la solicitud de patente de EE.UU. de número de orden 11/853,339 presentada el 11 de septiembre de 2007, las cuales están ambas cedidas al cesionario común y se incorporan en la presente memoria por referencia.

Los aceites vegetales brutos, obtenidos tanto por métodos de prensado como por métodos de extracción con disolventes, son una mezcla compleja de triacilgliceroles, fosfolípidos, esteroides, tocoferoles, ácidos grasos libres, metales traza y otros compuestos menores. Es deseable eliminar los fosfolípidos, ácidos grasos libres y metales traza con el fin de producir un aceite para ensaladas de calidad con un sabor suave, color claro, y una larga vida útil. Dicha eliminación de fosfolípidos, conocidos como "gomas", se ha conseguido en la técnica anterior por diversos métodos que incluyen el desgomado acuoso, el desgomado ácido, el desgomado cáustico, y el desgomado enzimático. La mayoría de estos métodos de desgomado implican una pérdida significativa de aceite junto con las gomas separadas.

Las solicitudes de patente antes mencionadas describen métodos para eliminar fosfolípidos de composiciones de aceite mediante el tratamiento de las composiciones de aceite con enzimas PLA y también enzimas PLC. El tratamiento con las dos enzimas puede ser secuencial o simultáneo. Se ha encontrado que, sorprendentemente, la cinética de las reacciones enzimáticas discurre mucho más rápidamente de lo esperado cuando las dos enzimas se utilizan juntas que cuando se utiliza cualquiera de ellas por separado. Además, se ha encontrado que cuando se utilizan juntas las dos enzimas las reacciones discurren más rápidamente de lo esperado, incluso aunque las condiciones de reacción no estén optimizadas para al menos una de las enzimas. También se ha encontrado que cuando se utilizan juntas las dos enzimas la reacción puede ocurrir en menos de aproximadamente una hora, y puede ocurrir en un tiempo tan corto como unos treinta minutos.

Se espera que las reacciones de enzimas PLA y PLC con las composiciones de aceite produzcan algunos subproductos de reacción que deben ser eliminados del aceite tratado. Estos subproductos incluyen restos portadores de fosfato escindidos de fosfolípidos por la acción de enzimas PLC, ácidos grasos libres escindidos de fosfolípidos por la acción de enzimas PLA, y *liso*-fosfolípidos resultantes de la escisión del ácido graso libre del fosfolípido. Los *liso*-fosfolípidos y cualesquiera subproductos portadores de fosfato deben ser eliminados de la composición de aceite tratado, y se espera que los otros subproductos de reacción antes mencionados sean retirados junto con los *liso*-fosfolípidos en una fracción pesada conocida como "gomas".

La patente de EE.UU. número 5,061,498 se refiere a un método para reformar grasas y aceites que comprende tratar las grasas y aceites que contienen glicéridos parciales con dos o más tipos diferentes de lipasas que son diferentes en especificidad frente a ácidos grasos y/o en especificidad de posición, en presencia de una pequeña cantidad de agua, para obtener grasas y aceites que contienen glicéridos parciales en un bajo contenido. En la realización descrita, se utiliza lipasa P porque reaccionará en cualquiera de las tres posiciones del esqueleto de glicerol. Se puede añadir a una composición que contiene glicéridos parciales un ácido graso deseado tal como el ácido oleico, y se utiliza una lipasa específica para este ácido graso deseado tal como la lipasa F. La presencia de lipasa F favorece la reacción del ácido graso preferido sobre otros ácidos grasos que puedan estar presentes, y la presencia de lipasa P favorece la esterificación del ácido graso preferido en cualquier lugar de los glicéridos parciales. La concentración de agua es preferentemente inferior a 1500 ppm, en particular de 10 a 200 ppm.

El documento EP 1624047 se refiere a un método para generar un aceite de triglicérido a partir de gomas de aceite húmedas, que comprende el tratamiento de las gomas con fosfolipasa PLA1 y la recuperación del aceite así producido.

Es un objeto de la presente invención proporcionar un método para tratar gomas separadas, con el fin de obtener productos de aceite utilizables que de lo contrario se perderían.

Sumario de la invención

Como desarrollo del trabajo descrito en las dos solicitudes de patente antes mencionadas, se realizaron análisis de gomas que habían sido separadas de aceites tratados con PLA/PLC. Se esperaba que las gomas contuviesen ácidos grasos libres y diacilgliceroles presentes en una cantidad proporcional a la cantidad de fosfolípidos presentes

en la composición de aceite original que había sido hecha reaccionar con las enzimas. En lugar de ello, se encontró que, sorprendentemente, había sustancialmente menos ácidos grasos libres y diacilgliceroles de lo esperado de acuerdo con la teoría. A partir de este sorprendente resultado se concluyó que los ácidos grasos libres y los diacilgliceroles que eran los subproductos de las reacciones de los fosfolípidos con PLA y PLC, respectivamente, habían reaccionado entre sí en presencia de las enzimas PLA y PLC para formar triacilgliceroles útiles, generando así en realidad nuevas moléculas de aceite que no habían existido antes de que hubiera comenzado el proceso de tratamiento con PLA/PLC. Con ello se descubrió que se podría utilizar la combinación de enzimas PLA y PLC para tratar fosfolípidos separados, independientemente del método utilizado para separar dichos fosfolípidos, con el fin de generar nuevas moléculas de triacilglicerol.

En consecuencia, la presente invención se refiere a un método para generar triacilgliceroles a partir de gomas de aceite, en donde el método comprende (a) proporcionar una composición de aceite que contiene una cantidad de gomas de aceite, en donde dichas gomas comprenden fosfolípidos, (b) separar dichas gomas de aceite de dicha composición de aceite para proporcionar una primera fracción sustancialmente libre de gomas de aceite y una segunda fracción que contiene dichas gomas de aceite separadas, (c) tratar dicha segunda fracción con una o más enzimas que tienen actividad de PLA para generar ácidos grasos libres, y (d) tratar dicha segunda fracción con una o más enzimas que tienen actividad de PLC para generar diacilgliceroles, de manera tal que dichos ácidos grasos y dichos diacilgliceroles reaccionan entre sí en presencia de al menos una de dichas enzimas para formar triacilgliceroles.

Descripción de las figuras

La Figura 1 es un dibujo que ilustra la configuración de fosfolípidos y triacilgliceroles.

La Figura 2 es un dibujo que ilustra los tres lugares estereoespecíficos de un fosfolípido.

La Figura 3 es un dibujo que ilustra las estructuras de cuatro grupos funcionales comunes que pueden estar conectados al resto de fosfato de un fosfolípido.

La Figura 4 es un dibujo que ilustra cuatro sitios diferentes de ataque enzimático a una molécula de fosfolípido.

La Figura 5 es un dibujo que ilustra la reacción de un fosfolípido en presencia de una enzima PLA y agua para producir un *liso*-fosfolípido y un ácido graso.

La Figura 6 es un dibujo que ilustra la reacción de un fosfolípido en presencia de una enzima PLC y agua para producir un diacilglicerol y un fosfato.

La Figura 7 es un dibujo que ilustra la estructura de fosfatidilcolina.

La Figura 8 es un dibujo que ilustra la estructura de *fosfo*-colina.

Descripción detallada de la invención

La eliminación de fosfolípidos origina casi la totalidad de las pérdidas asociadas con el refinado de aceites vegetales. Tal como se ilustra en la Figura 1, los fosfolípidos contienen un grupo fosfato en uno de los dos extremos del esqueleto de glicerol, mientras que un triacilglicerol contiene tres ácidos grasos. Para distinguir los derivados se emplea el sistema de numeración estereoespecífica ("Sn", por sus siglas en inglés). La Figura 2 muestra los tres lugares estereoespecíficos de un fosfolípido.

El grupo fosfato del fosfolípido es "hidrófilo", lo que significa que tanto el propio fosfato como el grupo funcional X son atraídos hacia el agua. Las cadenas de ácido graso R1 y R2 del fosfolípido son "lipófilas", lo que significa que son atraídas hacia los lípidos. Puesto que la molécula de fosfolípido posee a la vez un grupo funcional hidrófilo y cadenas de ácido graso lipófilas, es un emulsionante natural excelente. Las propiedades de emulsión de los fosfolípidos provocarán que, cuando se eliminen los fosfolípidos de aceites vegetales, se pierdan dos moléculas de fosfolípido y una molécula de triacilglicerol.

El grupo funcional que contiene fosfato del fosfolípido, indicado en la Figura 1 como "X", determina el grado de su naturaleza hidrófila. El grupo funcional X de la Figura 1 puede ser cualquiera de una variedad de tipos conocidos, algunos de los cuales están ilustrados en la Figura 3.

Los fosfolípidos que contienen los grupos funcionales colina y etanolamina tienen la máxima afinidad por el agua, mientras que los ácidos, sales de ácido (por ejemplo sales de calcio, de magnesio y de hierro) e inositol tienen afinidades hacia el agua mucho más reducidas. El ácido fosfatídico y las sales de ácido fosfatídico son conocidas comúnmente como "fosfolípidos no hidratables" o NHPs. Habitualmente, los fosfolípidos se miden en el aceite como "contenido de fósforo" en partes por millón. La Tabla 1 indica las cantidades típicas de fosfolípidos presentes en los principales cultivos de semillas oleaginosas, y la distribución de los diversos grupos funcionales como porcentaje del total de fosfolípidos presentes en los aceites. La Tabla 2 expone la distribución típica de los fosfolípidos presentes en la lecitina (gomas de semillas de soja). En la Tabla 2, "tal cual" significa la composición típica del fosfolípido extraído del aceite vegetal, con el aceite arrastrado (2 moléculas de fosfolípido y 1 molécula de aceite), que da un contenido

5 de porción insoluble en acetona de 67%. "Normalizada" significa la composición fosfolipídica sin ningún aceite presente, que da un contenido de porción insoluble en acetona de 100%. La Tabla 3 muestra los pesos moleculares de los principales tipos de fosfolípidos, *liso*-fosfolípidos, y los correspondientes *fosfo*-compuestos no lipídicos. Tal como se utiliza en la Tabla 3 y a lo largo de la presente memoria, el término *liso*-fosfolípido significa un fosfolípido en el cual uno de sus grupos de ácido graso ha sido escindido por una lipasa. El peso molecular del ácido oleico es 282,48, y el peso molecular del diacilglicerol en el cual los ácidos grasos están presentes como ácido oleico (C18:1) es 620,99.

Tabla 1

Cantidades y distribuciones típicas de fosfolípidos en aceites de semillas oleaginosas comunes			
	Aceite de soja	Aceite de canola	Aceite de girasol
P (ppm)	400 - 1200	200 - 900	300 - 700
PC (-colina)	12% - 46%	25% - 40%	29% - 52%
PE (-etanolamina)	8% - 34%	15% - 25%	17% - 26%
PA (-ácido)	2% - 21%	10% - 20%	15% - 30%
PI (-inositol)	2% - 15%	2% - 25%	11% - 22%

TABLA 2

Cantidades y distribuciones típicas de fosfolípidos en gomas de soja		
	Porcentaje "tal cual"	Porcentaje "normalizado"
Fosfatidilcolina	33,9	47,2
Fosfatidiletanolamina	14,3	19,9
Fosfatidilserina	0,4	0,6
Acido fosfatídico	6,4	8,9
Fosfatidilinositol	16,8	23,4
Total	71,8	100,0

10

Tabla 3

Pesos moleculares de fosfolípidos y compuestos típicos			
	Peso molecular del fosfolípido	Peso molecular del <i>liso</i> -fosfolípido	Peso molecular del <i>fosfo</i> -compuesto
Colina - C18:1	786,15	521,67	183
Etanolamina - C18:1	744,00	479,52	141
Serina - C18:1	787,03	522,55	184
Ácido - C18:1	721,90	457,42	98
Inositol - C18:1	863,98	599,50	260

Se pueden eliminar parcial o totalmente fosfolípidos de los aceites vegetales a través de distintos procedimientos, siendo los más comunes el desgomado acuoso, el desgomado ácido, el refinado cáustico, y el desgomado enzimático. La presente invención para generar aceites a partir de gomas puede ser utilizada en gomas derivadas de cualquiera de estos procesos, aunque, con fines de ilustración, se explicará con más detalle el desgomado enzimático.

15 El desgomado enzimático, también conocido como "refinado enzimático", se utiliza cuando el objetivo es la eliminación total de los fosfolípidos del aceite. En general, los tratamientos de desgomado enzimático de la técnica anterior se han llevado a cabo en aceites que habían sido previamente desgomados por uno de los otros métodos, típicamente mediante desgomado acuoso. Para aplicaciones en alimentos, el aceite desgomado enzimáticamente puede ser

sometido secuencialmente a decoloración y desodorización, un proceso conocido en la industria como "refino físico." El desgomado enzimático proporciona un rendimiento en aceite mejor que el desgomado acuoso, el desgomado ácido o el desgomado cáustico, con resultados económicos mejorados.

5 La reacción enzimática cambia la naturaleza del fosfolípido, escindiendo diferentes grupos funcionales de la molécula. En general, se puede hacer referencia a los grupos funcionales y a los productos de degradación como a "materiales grasos" y "material que contiene fósforo". La reacción enzimática reduce las propiedades emulsionantes de los fosfolípidos resultantes, de manera que se pierde menos aceite cuando se separan las gomas del aceite, con el consiguiente ahorro de aceite. Las enzimas que presentan actividad frente a los fosfolípidos se denominan comúnmente "fosfolipasas". Las fosfolipasas se clasifican en función de la posición de la molécula de fosfolípido sobre la cual actúa la enzima, y se denominan PLA1, PLA2, PLC y PLD. En la Figura 4 se ilustran las posiciones de la molécula de fosfolípido sobre las que actúan los diferentes tipos de fosfolipasas. La fosfolipasa B es una enzima adicional conocida en la técnica. Elimina el ácido graso final, ya esté presente en la posición *Sn-1* o en la posición *Sn-2* (Figura 2), de un *liso*-fosfolípido. En la Tabla 4 se expone un resumen de las diversas fosfolipasas y sus productos de reacción.

15

Tabla 4

	Material graso	Material que contiene fósforo
Fosfolipasa A1	ácido graso	<i>liso</i> -fosfolípido
Fosfolipasa A2	ácido graso	2 <i>liso</i> -fosfolípido
Fosfolipasa B	ácido graso	glicerofosfolípido
Fosfolipasa C	diacilglicerol	grupo de cabeza que contiene fosfato
Fosfolipasa D	alcohol	ácido fosfatídico

Cada tipo de fosfolipasa tiene su propia velocidad de reacción y sus propias condiciones de reacción óptimas en términos de pH, concentración de agua y temperatura. Cuando se utiliza sola, la PLA requiere generalmente un tiempo de reacción de al menos aproximadamente 4 horas, mientras que la PLC, cuando se utiliza sola, requiere generalmente un tiempo de reacción de aproximadamente una hora. Se sabe que el tratamiento enzimático debe producirse a un pH menor que o igual que 8, con el fin de minimizar la indeseable saponificación de aceite, pero la PLA tiene un pH de reacción óptimo de 4,5, mientras que la PLC tiene un pH de reacción óptimo de 7,0. Cada enzima tiene también diferentes tolerancias térmicas. Las enzimas PLA se desnaturalizan a aproximadamente 50°C mientras que las enzimas PLC se desnaturalizan a aproximadamente 65°C.

Están ampliamente descritas en la bibliografía, y descritas en patentes, secuencias de aminoácidos con actividad de fosfolipasa, y de algunas de ellas se ha publicado que poseen actividad sobre fosfolípidos presentes en aceites vegetales. Todo esto es conocido en la técnica.

Un producto de enzima PLA1 comercial con actividad de fosfolipasa es la fosfolipasa A1 Lecitase® Ultra de Novozymes. Tal como se describe en las indicaciones de uso de Novozymes denominadas Oils & Fats # 2002-185255-01 y 2002-05894-03, se puede mezclar este producto con aceite desgomado con 1-1,5% de tampón de ácido cítrico-NaOH a 4,5<pH<7,0 y 40°C<T<55°C. En estas condiciones, la PLA1 hidroliza selectivamente el ácido graso opuesto al grupo funcional fosfato en el esqueleto de glicerol para proporcionar *liso*-fosfolípidos polares y ácidos grasos polares. Tal como se ilustra en la Figura 4, la molécula de fosfolípido pierde un grupo funcional hidrófobo, es decir, el ácido graso, dejando el *liso*-fosfolípido, que ahora tiene un grupo fosfato hidrófilo y un grupo alcohol hidrófilo. Entonces, con dos sitios hidrófilos, la molécula de *liso*-fosfolípido es soluble en agua, y ha perdido sus propiedades emulsionantes. Por tanto, cuando se separa la fase acuosa de la fase oleosa, el *liso*-fosfolípido es eliminado en la fase acuosa, y no arrastra consigo nada de aceite, mientras que la molécula de ácido graso escindida del fosfolípido permanece en el aceite. En los procedimientos de la técnica anterior, esta molécula de ácido graso sería eliminada en un proceso de desodorización posterior. Así, el proceso de desgomado con PLA1 reduce las pérdidas por refino al no eliminar ningún aceite neutro junto con los *liso*-fosfolípidos en la fase acuosa, de manera tal que el único material eliminado es el indeseado *liso*-fosfolípido derivado de la molécula de fosfolípido original.

La cantidad teórica de ácidos grasos que se pueden generar por reacción de las gomas con una enzima de tipo PLA se puede calcular determinando la cantidad total de fosfolípidos de las gomas, la cantidad de cada tipo de fosfolípido y, finalmente, el cambio en el peso molecular que se produce para cada tipo de fosfolípido presente tras la conversión de un fosfolípido en un *liso*-fosfolípido. El contenido porcentual de fosfolípidos puede calcularse multiplicando por 31 (peso molecular del fósforo, 30,97) el nivel de fósforo elemental medido en partes por millón, y dividiendo por 10000. Se pueden calcular las cantidades de cada tipo de fosfolípido multiplicando la cantidad total de gomas por la distribución usual de tipos de fosfolípido que es conocida para ese tipo particular de aceite. Finalmente, se puede determinar la cantidad de ácido graso liberado a partir de cada tipo de fosfolípido.

Por ejemplo, para el aceite de soja bruto que contiene 800 ppm de fósforo con una distribución "normalizada" de fosfolípidos (Tabla 2), suponiendo que los ácidos grasos unidos a los fosfolípidos son ácido oleico (C18:1), se pueden calcular los ácidos grasos que se espera sean liberados, de la manera siguiente:

En primer lugar se calcula el porcentaje de fosfolípidos totales presentes.

$$5 \quad \text{Fosfolípidos totales} = (800 \text{ ppm} / 1.000.000) \times 31 \times 100 = 2,48 \text{ por ciento.}$$

Después se calcula la cantidad de cada tipo de fosfolípido presente.

$$\text{Fosfatidilcolina} = (2,48 \times 47,21) / 100 = 1,17 \text{ por ciento}$$

$$\text{Fosfatidiletanolamina} = (2,48 \times 19,92) / 100 = 0,49 \text{ por ciento}$$

$$\text{Fosfatidilserina} = (2,48 \times 0,56) / 100 = 0,01 \text{ por ciento}$$

$$10 \quad \text{Fosfatidilinositol} = (2,48 \times 23,40) / 100 = 0,58 \text{ por ciento}$$

$$\text{Ácido fosfatídico} = (2,48 \times 8,91) / 100 = 0,22 \text{ por ciento}$$

Finalmente, se determina la cantidad de ácidos grasos liberados por la reacción de PLA con cada tipo de fosfolípido de las gomas multiplicando la cantidad de cada tipo de fosfolípido por el porcentaje de ácido graso libre (FFA, por sus siglas en inglés) liberado, en donde el porcentaje de ácido graso se calcula como lo que queda después de restar la cantidad de *liso*-fosfolípido (véase la Tabla 3), de la manera siguiente:

$$15 \quad \text{FFA procedente de PC} = 1,17 \times (1 - (521,67 / 786,15)) = 0,39 \text{ por ciento}$$

$$\text{FFA procedente de PE} = 0,49 \times (1 - (479,52 / 744,00)) = 0,18 \text{ por ciento}$$

$$\text{FFA procedente de PS} = 0,01 \times (1 - (522,56 / 787,03)) = 0,00 \text{ por ciento}$$

$$\text{FFA procedente de PI} = 0,58 \times (1 - (599,50 / 863,98)) = 0,18 \text{ por ciento}$$

$$20 \quad \text{FFA procedente de PA} = (0,22 \times (1 - (457,22 / 721,90)) = 0,08 \text{ por ciento}$$

$$\text{Total de ácidos grasos libres que se espera sean generados} = 0,83 \text{ por ciento}$$

Aunque el desgomado enzimático ofrece ventajas significativas para los elaboradores de aceite, también presenta ciertos inconvenientes. Un inconveniente reside en que la reacción de la enzima con los fosfolípidos puede ser lenta y requerir mucho tiempo. En particular, la reacción de enzimas de fosfolipasa A con fosfolípidos puede requerir muchas horas, dependiendo de variables de reacción tales como el pH, la temperatura, las concentraciones relativas y las condiciones de mezclado. Estos prolongados tiempos de reacción puede tener un significativo impacto negativo sobre el valor económico global de los procedimientos de desgomado enzimático. Debido a la lentitud de la reacción de la PLA, el desgomado enzimático se lleva a cabo típicamente en composiciones de aceite que han sido sometidas primero a desgomado acuoso. Así, se puede someter a desgomado dos veces el aceite para obtener un producto que tenga un nivel de fósforo lo suficientemente bajo para los fines a los que se pretende destinar.

Es conocido en la técnica que las enzimas de PLC reaccionan con un fosfolípido hidrolizando selectivamente el grupo funcional fosfato, tal como se muestra en la Figura 6. La reacción proporciona un diacilglicerol ("DAG") y un grupo fosfatídico. La molécula de diacilglicerol ya no tiene el grupo funcional fosfato y no es necesario eliminarla del aceite. Por ejemplo, la reacción de fosfatidilcolina (PC), Figura 7, con una PLC proporcionará un DAG y el grupo funcional fosfato ilustrado en la Figura 8, más conocido como *fosfo*-colina o "C". El proceso de desgomado con PLC reduce la pérdida por refinado al conservar el DAG soluble en aceite, mientras que se elimina sólo el grupo funcional fosfato soluble en agua. No se pierde aceite neutro cuando se elimina la fase acuosa, ya que el fosfolípido ha sido destruido. Sin embargo, la enzima PLC no reacciona con todos los fosfolípidos presentes en el aceite. Generalmente, la PLC no reacciona ni con ácido fosfatídico (PA) ni con fosfatidilinositol (PI), ilustrado en la Figura 3, aunque se conoce una PLC específica para PI, identificada como PI-PLC. Sin embargo, tanto el PA como el PI son fosfolípidos no hidratables que permanecen en el aceite después del desgomado acuoso. Así, el aceite que ha sido tratado con PLC como única enzima debe ser tratado adicionalmente con agentes cáusticos u otras enzimas para eliminar las gomas residuales.

La cantidad teórica de diacilgliceroles generados por la reacción de gomas con una enzima de tipo PLC se puede calcular determinando el porcentaje de fosfolípidos presentes en el aceite, la cantidad de cada tipo de fosfolípido en ese tipo de aceite, y finalmente el cambio en el peso molecular que se produce para cada tipo de fosfolípido presente en el aceite crudo tras la conversión de un fosfolípido en un DAG. El contenido porcentual de fosfolípido en el aceite se puede calcular multiplicando por 31 (peso molecular del fósforo, 30,97) el nivel de fósforo elemental medido en partes por millón, y dividiendo por 10000. Los fosfolípidos individuales se pueden calcular multiplicando la cantidad total de gomas por la distribución normal de cada tipo de fosfolípido. Finalmente, la cantidad de diacilglicerol se puede determinar porque es el producto de reacción de cada uno de los tipos de fosfolípido.

Por ejemplo, para el aceite de soja bruto que contiene 800 ppm de fósforo con una distribución "normalizada" de fosfolípidos (Tabla 2), suponiendo que los ácidos grasos unidos a los fosfolípidos son ácido oleico (C18:1), los diacilgliceroles que se espera sean liberados se pueden calcular de la manera siguiente:

En primer lugar se calcula el porcentaje de cada tipo de fosfolípido, tal como se ha descrito más arriba.

- 5 A continuación, se puede determinar el porcentaje de cada tipo de diacilglicerol (DAG) liberado por la reacción de PLC con las gomas multiplicando la cantidad de cada tipo de fosfolípido por el porcentaje de diacilgliceroles (Tabla 3), siendo la cantidad de DAG lo que queda después de restar la cantidad de grupo fosfato, de la manera siguiente:

$$\text{DAG procedente de PC} = 1,17 \times (1 - (165,10 / 786,15)) = 0,93 \text{ por ciento}$$

$$\text{DAG procedente de PE} = (0,49 \times (1 - (123,10 / 744,00)) = 0,41 \text{ por ciento}$$

10 $\text{DAG procedente de PS} = (0,01 \times (1 - (166,08 / 787,03)) = 0,01 \text{ por ciento}$

$$\text{DAG procedente de PI} = (0,58 \times (1 - (243,00 / 863,98)) = 0,42 \text{ por ciento}$$

$$\text{DAG procedente de PA} = (0,22 \times (1 - (100,92 / 721,90)) = 0,19 \text{ por ciento}$$

$$\text{Total de diacilgliceroles generados} = 1,96 \text{ por ciento}$$

- 15 La presente invención se refiere a un tratamiento enzimático de fosfolípidos y composiciones de aceite que contienen fósforo para generar nuevas moléculas de triacilglicerol. El inventor ha encontrado que, sorprendentemente, el empleo de una combinación de fosfolipasas que tienen actividad de PLA y actividad de PLC no sólo escinde los "grupos" específicos, sino que también recombina un ácido graso (FA, por sus siglas en inglés) escindido, procedente de una reacción con PLA, y diacilglicerol (DAG) procedente de una reacción de PLC, para producir un triacilglicerol, o aceite. En particular, una fosfolipasa A (PLA) reacciona con una molécula de fosfolípido proporcionando un FA y *liso*-lecitina, mientras que una fosfolipasa C (PLC) reacciona con una molécula de fosfolípido diferente para producir un DAG y una *fosfo*-lecitina. El FA procedente de la reacción con PLA y el DAG procedente de la reacción con PLC se combinan luego por esterificación en presencia de una o más de las enzimas, para producir una nueva molécula de triacilglicerol (TAG).

- 20
25 La presente invención es particularmente útil cuando se utiliza para el tratamiento ulterior de gomas que han sido separadas de un aceite crudo por métodos tales como el refinado acuoso, refinado ácido o refinado cáustico, o mediante un refinado enzimático distinto de una combinación de enzimas PLA y PLC. Se cree que sería beneficioso para las gomas que hayan sido separadas por refinado cáustico que se ajustase a un valor de aproximadamente 8 o inferior el pH de dichas gomas, antes de proceder con los pasos de generación de aceite de la presente invención.

- 30 Los aceites que pueden ser tratados de acuerdo con la presente invención pueden incluir, pero sin quedar limitados a éstos, los siguientes: aceite de canola, aceite de ricino, aceite de coco, aceite de cilantro, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de avellana, aceite de cáñamo, aceite de linaza, aceite de semilla de mango, aceite de hierba de la pradera (*limnanthes alba*), aceite de pata de buey, aceite de oliva, aceite de palma, aceite de palmiste, oleína de palma, aceite de cacahuete, aceite de colza, aceite de salvado de arroz, aceite de cártamo, aceite de sasanqua, aceite de soja, aceite de girasol, aceite de resina, aceite de tsubaki (aceite de camelia), y aceite vegetal, y
35 cualquier combinación de los anteriores.

- La enzima fosfolipasa A utilizada en el método de la presente invención puede ser una enzima fosfolipasa A1 o una enzima fosfolipasa A2. La enzima fosfolipasa C utilizada en la presente invención puede ser una fosfolipasa C y/o una fosfolipasa C específica para inositol. Están disponibles comercialmente muchas variedades de enzimas de las familias de fosfolipasa A y fosfolipasa C, y se contempla que tales enzimas y sus equivalentes serán adecuadas para el uso en la presente invención.
40

En el método de la invención, las diferentes fosfolipasas utilizadas juntas en un procedimiento de desgomado enzimático de la presente invención se pueden mezclar antes de ser añadidas al aceite a tratar. Como alternativa, se pueden añadir al aceite por separado, ya sea de manera secuencial o simultánea.

- 45 El procedimiento de desgomado de la presente invención se lleva a cabo a un pH por debajo de aproximadamente 8, con preferencia entre aproximadamente 3-7, y muy preferiblemente entre aproximadamente 4-5. El pH del proceso de desgomado enzimático se puede conseguir mediante la adición de tampones conocidos. Es bien conocido que el ácido cítrico y el hidróxido de sodio son adecuados para este propósito. En caso necesario, se pueden utilizar otros agentes tamponadores para ajustar el pH en condiciones de reacción específicas.

- 50 La temperatura del procedimiento de desgomado enzimático de la presente invención puede situarse en el intervalo de aproximadamente 40-80°C, con preferencia en el intervalo de aproximadamente 40-60°C, y más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 45-55°C. Se ha encontrado que, sorprendentemente, con los métodos de la presente invención el desgomado con PLA puede discurrir a una temperatura por encima de su propio óptimo de 45°C, y cercana a la temperatura óptima de funcionamiento de la PLC, sin que se produzca una excesiva desnaturalización.

Después de que se ha completado el proceso de generación de aceite en las gomas, y se ha separado de las gomas el aceite recién generado, se puede someter a este aceite recién generado a etapas de elaboración adicionales conocidas en la técnica, tales como decoloración o desodorización, según sea necesario o deseable en función del uso final al cual se pretende destinar el producto de aceite recién generado.

5 En los ejemplos que siguen se exponen diversas realizaciones preferidas de la invención, junto con ejemplos testigo en los que se emplean las condiciones de la técnica anterior. En cada uno de los ejemplos que siguen, la mezcladora de accionamiento superior era una mezcladora Heidolph modelo Elector KG con una paleta de hoja plana; hecha funcionar a 90 r.p.m. para una agitación normal y a 350 r.p.m. para una agitación vigorosa. La centrífuga era una De Laval Gyro-Tester equipada con la unidad de tazón ("The Bowl Unit") para conseguir una
10 separación continua. El tazón de la centrífuga se cerró con los tornillos de tapón colocados. La mezcla con cizallamiento se llevó a cabo con un homogeneizador Ultra-Turrax SD-45 con un estator-rotor G450 a 10.000 r.p.m. La enzima PLA1 era Lecitase® Ultra (número de lote LYN05007) comercializada por Novozymes A/S de Dinamarca. La enzima PLC era Purifine® (PLC número de lote 90BU002A1 ó 90BU004A1) comercializada por Verenum Corporation de San Diego, California. La cantidad de fosfolípidos que quedaron en el aceite tratado se midió como
15 ppm de P de acuerdo con el método oficial de la American Oil Chemists' Society Ca 20-99, "Analysis of Phosphorus in Oil by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy" (Análisis de fósforo en aceite mediante espectroscopia de emisión óptica por plasma de acoplamiento inductivo). Los ácidos grasos libres (FFA) se midieron utilizando el método oficial de la American Oil Chemists' Society Ca 5a-40. La humedad se midió utilizando el método oficial de la American Oil Chemists' Society Ca 2c-25. El aceite neutro se midió utilizando el método que se
20 expone en el Apéndice a continuación. La materia Insoluble en acetona, que incluye los fosfolípidos, se midió utilizando el método oficial de la American Oil Chemists' Society Ja 4-46. El índice de ácido se midió utilizando el método oficial de la American Oil Chemists' Society Ja 6-55. Los procedimientos de NMR (siglas inglesas de Resonancia Magnética Nuclear) de P-31 y las medidas de diacilglicerol (DAG) por cromatografía líquida de altas prestaciones con detector de dispersión luminosa evaporativo (HPLC-ELSD, por sus siglas en inglés), se llevaron a
25 cabo utilizando los procedimientos descritos por Verenum Corporation (entonces denominada Diversa Corporation), "Analytical Profiling of Small Scale Reactions of phospholipase-C mediated Vegetable Oil Degumming" (Determinación del perfil analítico de reacciones a pequeña escala del desgomado de aceite vegetal por medio de fosfolipasa C), en la reunión de la American Oil Chemist's Society correspondiente al año 2007.

30 De los siguientes Ejemplos, los Ejemplos 1-10 corresponden directamente a los Ejemplos 13, 14, 18, 23, 24, 27, 29, 31, 33 y 36 de la antes mencionada solicitud de patente de EE.UU. de número de orden 11/853,339, presentada el 11 de septiembre de 2007, excepto en que los valores de ácidos grasos libres (FFA) y diacilgliceroles presentes en el aceite desgomado enzimáticamente han sido medidos por los métodos que se han expuesto en lo que antecede y que quedan incluidos en el presente documento.

Ejemplo 1

35 Se calentaron a 75-80°C, con agitación normal utilizando una mezcladora de accionamiento superior, 1999,1 gramos de aceite de soja bruto que contenía 769,5 ppm de fósforo. Se añadieron 2,0 gramos de disolución al 50% peso/peso de ácido cítrico y se mezcló con cizallamiento durante 1 minuto. Se sometió a agitación normal el aceite durante 1 hora utilizando una mezcladora de accionamiento superior. Se dejó enfriar el aceite, agitando a velocidad normal, hasta que la temperatura del aceite fue de 40°C, y después se añadieron 2,4 mililitros de disolución 4 molar
40 de hidróxido sódico, y se mezcló con cizallamiento la mezcla durante 10 segundos. El ácido cítrico y el agente cáustico formaron un tampón débil con un pH de 5,0. Mientras se mantenía la temperatura en 40°C, se añadieron 1,5008 gramos de Purifine™ de Verenum (lipasa PLC, número de lote 90BU002A1), seguidos de 30 gramos de agua desionizada, y se mezcló con cizallamiento toda la mezcla durante 120 segundos. Se agitó la mezcla oleosa a velocidad normal durante 60 minutos. Mientras se mantenía la temperatura en 40°C, se añadieron 0,2132 gramos de
45 Lecitase® Ultra de Novozymes (lipasa PLA1, número de lote LYN05007) y se mezcló con cizallamiento toda la mezcla durante 120 segundos. Se agitó la mezcla oleosa a velocidad normal durante 60 minutos a una temperatura de 40°C. Después se centrifugó el aceite tratado con enzimas, y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El contenido de fósforo residual en el aceite desgomado secuencialmente con PLC y después PLA1 era 6,5 ppm, el contenido de FFA era 0,56% y el de DAG 0,69%.

50 Ejemplo 2

Se enfriaron a 60°C, con agitación normal utilizando una mezcladora de accionamiento superior, 2010,5 gramos de aceite de soja bruto que contenía 785,1 ppm de fósforo. Mientras se mantenía la temperatura en 60°C, se añadieron 1,5316 gramos de Purifine™ de Verenum (lipasa PLC, número de lote 90BU002A1) y 0.2073 gramos de Lecitase®
55 Ultra de Novozymes (lipasa PLA1, número de lote LYN05007), seguidos de 30 gramos de agua desionizada, y se mezcló con cizallamiento toda la mezcla durante 45 segundos. Se agitó la mezcla oleosa a velocidad normal durante 60 minutos a una temperatura de 60°C. Después se centrifugó el aceite tratado con enzimas, y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El tratamiento enzimático combinado, con la mezcla de PLC y PLA1 a pH neutro, produjo un aceite desgomado con un contenido residual de fósforo de 109,6 ppm. El contenido de FFA era 0,61% y el de DAG 0,74%.

Ejemplo 3

Se calentaron a 75-80°C, con agitación normal utilizando una mezcladora de accionamiento superior, 2005,3 gramos de aceite de soja bruto que contenía 742,9 ppm de fósforo. Se añadieron 2,0 gramos de disolución al 50% peso/peso de ácido cítrico y se mezcló con cizallamiento durante 1 minuto. Se sometió a agitación normal el aceite durante 1 hora utilizando una mezcladora de accionamiento superior. Se dejó enfriar el aceite, agitando a velocidad normal, hasta que la temperatura del aceite fue de 60°C, y después se añadieron 2,4 mililitros de disolución 4 molar de hidróxido sódico, y se mezcló con cizallamiento la mezcla durante 10 segundos. El ácido cítrico y el agente cáustico formaron un tampón débil con un pH de 5,0. Mientras se mantenía la temperatura en 60°C, se añadieron 0,7491 gramos de Purifine™ de Verenium (lipasa PLC, número de lote 90BU002A1), seguidos de 60 gramos de agua desionizada, y se mezcló con cizallamiento toda la mezcla durante 45 segundos. Se agitó la mezcla oleosa a velocidad normal durante 60 minutos. Mientras se mantenía la temperatura en 60°C, se añadieron 0,1220 gramos de Lecitase® Ultra de Novozymes (lipasa PLA1, número de lote LYN05007) y se mezcló con cizallamiento toda la mezcla durante 45 segundos. Se agitó la mezcla oleosa a velocidad normal durante 60 minutos a una temperatura de 60°C. Después se centrifugó el aceite tratado con enzimas, y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El contenido de fósforo residual en el aceite desgomado secuencialmente con PLC y después PLA1 era de 2,2 ppm. Se encontró un contenido de FFA de 0,58% y de DAG de 0,42%.

Ejemplo 4

Se calentaron a 75-80°C, con agitación normal utilizando una mezcladora de accionamiento superior, 2002,0 gramos de aceite de soja bruto que contenía 747,3 ppm de fósforo. Se añadieron 2,0 gramos de disolución al 50% peso/peso de ácido cítrico y se mezcló con cizallamiento durante 1 minuto. Se sometió a agitación normal el aceite durante 1 hora utilizando una mezcladora de accionamiento superior. Se dejó enfriar el aceite, agitando a velocidad normal, hasta que la temperatura del aceite fue de 60°C, y después se añadieron 1,8 mililitros de disolución 4 molar de hidróxido sódico, y se mezcló con cizallamiento la mezcla durante 10 segundos. El ácido cítrico y el agente cáustico formaron un tampón débil con un pH de 4,5. Mientras se mantenía la temperatura en 60°C, se añadieron 2,2194 gramos de Purifine™ de Verenium (lipasa PLC, número de lote 90BU002A1), seguidos de 60 gramos de agua desionizada, y se mezcló con cizallamiento toda la mezcla durante 120 segundos. Se agitó la mezcla oleosa a velocidad normal durante 15 minutos. Mientras se mantenía la temperatura en 60°C, se añadieron 0,2198 gramos de Lecitase® Ultra de Novozymes (lipasa PLA1, número de lote LYN05007) y se mezcló con cizallamiento toda la mezcla durante 120 segundos. Se agitó la mezcla oleosa a velocidad normal durante 15 minutos a una temperatura de 60°C. Después se centrifugó el aceite tratado con enzimas, y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El contenido de fósforo residual en el aceite desgomado que había sido tratado secuencialmente con PLC y PLA1 era 4,6 ppm. El contenido de FFA era 0,37% y el de DAG era 0,42%.

Ejemplo 5

Se calentaron a 75-80°C, con agitación normal utilizando una mezcladora de accionamiento superior, 2000,8 gramos de aceite de soja bruto que contenía 747,3 ppm de fósforo. Se añadieron 2,0 gramos de disolución al 50% peso/peso de ácido cítrico y se mezcló con cizallamiento durante 1 minuto. Se sometió a agitación normal el aceite durante 1 hora utilizando una mezcladora de accionamiento superior. Se dejó enfriar el aceite, agitando a velocidad normal, hasta que la temperatura del aceite fue de 50°C, y después se añadieron 1,8 mililitros de disolución 4 molar de hidróxido sódico, y se mezcló con cizallamiento la mezcla durante 10 segundos. El ácido cítrico y el agente cáustico formaron un tampón débil con un pH de 4,5. Mientras se mantenía la temperatura en 50°C, se añadieron 2,2500 gramos de Purifine™ de Verenium (lipasa PLC, número de lote 90BU002A1) y 0,2216 gramos de Lecitase® Ultra de Novozymes (lipasa PLA1, número de lote LYN05007), seguidos de 90 gramos de agua desionizada, y se mezcló con cizallamiento toda la mezcla durante 45 segundos. Se agitó la mezcla oleosa a velocidad normal durante 120 minutos a una temperatura de 50°C. Después se centrifugó el aceite tratado con enzimas, y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El tratamiento enzimático combinado, con la mezcla de PLC y PLA1, produjo un aceite desgomado con un contenido residual de fósforo de 1,8 ppm. El contenido de FFA era 0,67% y el de DAG era 0,40%.

Ejemplo 6

Se enfriaron a 50°C, con agitación normal utilizando una mezcladora de accionamiento superior, 2010,0 gramos de aceite de soja bruto que contenía 810,8 ppm de fósforo. Mientras se mantenía la temperatura en 50°C, se añadieron 2,2608 gramos de Purifine™ de Verenium (lipasa PLC, número de lote 90BU002A1), seguidos de 30 gramos de agua desionizada, y se mezcló con cizallamiento toda la mezcla durante 60 segundos. Se agitó la mezcla oleosa a velocidad normal durante 60 minutos. Mientras se mantenía la temperatura en 50°C, se añadieron 0,1172 gramos de Lecitase® Ultra de Novozymes (lipasa PLA1, número de lote LYN05007) y se mezcló con cizallamiento toda la mezcla durante 60 segundos. Se agitó la mezcla oleosa a velocidad normal durante 60 minutos a una temperatura de 50°C. Después se centrifugó el aceite tratado con enzimas, y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El aceite desgomado por tratamiento secuencial con PLC y PLA1 a pH neutro tenía un contenido de fósforo residual de 72,6 ppm. El contenido de FFA era 0,53% y el de DAG era 1,03%.

Ejemplo 7

Se calentaron a 75-80°C, con agitación normal utilizando una mezcladora de accionamiento superior, 2006,3 gramos de aceite de soja bruto que contenía 795,3 ppm de fósforo. Se añadieron 2,0 gramos de disolución al 50% peso/peso de ácido cítrico y se mezcló con cizallamiento durante 1 minuto. Se sometió a agitación normal el aceite durante 1 hora utilizando una mezcladora de accionamiento superior. Se dejó enfriar el aceite, agitando a velocidad normal, hasta que la temperatura del aceite fue de 50°C, y después se añadieron 2,4 mililitros de disolución 4 molar de hidróxido sódico, y se mezcló con cizallamiento la mezcla durante 10 segundos. El ácido cítrico y el agente cáustico formaron un tampón débil con un pH de 5,0. Mientras se mantenía la temperatura en 50°C, se añadieron 1,5373 gramos de Purifine™ de Verenum (lipasa PLC, número de lote 90BU002A1) y 0,1168 gramos de Lecitase® Ultra de Novozymes (lipasa PLA1, número de lote LYN05007), seguidos de 90 gramos de agua desionizada, y se mezcló con cizallamiento toda la mezcla durante 120 segundos. Se agitó la mezcla oleosa a velocidad normal durante 30 minutos a una temperatura de 50°C. Después se centrifugó el aceite tratado con enzimas, y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El tratamiento enzimático combinado, con la mezcla de PLC y PLA1 a un pH de 5,0, produjo un aceite desgomado con un contenido residual de fósforo de 1,9 ppm. El contenido de FFA era 0,17% y el de DAG era 0,42%.

Ejemplo 8

Se calentaron a 75-80°C, con agitación normal utilizando una mezcladora de accionamiento superior, 2003,6 gramos de aceite de soja bruto que contenía 784,8 ppm de fósforo. Se añadieron 2,0 gramos de disolución al 50% peso/peso de ácido cítrico y se mezcló con cizallamiento durante 1 minuto. Se sometió a agitación normal el aceite durante 1 hora utilizando una mezcladora de accionamiento superior. Se dejó enfriar el aceite, agitando a velocidad normal, hasta que la temperatura del aceite fue de 40°C, y después se añadieron 1,8 mililitros de disolución 4 molar de hidróxido sódico, y se mezcló con cizallamiento la mezcla durante 10 segundos. El ácido cítrico y el agente cáustico formaron un tampón débil con un pH de 4,5. Mientras se mantenía la temperatura en 40°C, se añadieron 1,4603 gramos de Purifine™ de Verenum (lipasa PLC, número de lote 90BU002A1) y 0,1021 gramos de Lecitase® Ultra de Novozymes (lipasa PLA1, número de lote LYN05007), seguidos de 40 gramos de agua desionizada, y se mezcló con cizallamiento toda la mezcla durante 120 segundos. Se agitó la mezcla oleosa a velocidad normal durante 120 minutos a una temperatura de 40°C. Después se centrifugó el aceite tratado con enzimas, y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El tratamiento enzimático combinado, con la mezcla de PLC y PLA1 a un pH de 4,5, produjo un aceite desgomado con un contenido residual de fósforo de 10,7 ppm. Se encontró que el contenido de FFA era 0,48% y el de DAG era 0,83%.

Ejemplo 9

Se calentaron a 75-80°C, con agitación normal utilizando una mezcladora de accionamiento superior, 2000,4 gramos de aceite de soja bruto que contenía 697,7 ppm de fósforo. Se añadieron 2,0 gramos de disolución al 50% peso/peso de ácido cítrico y se mezcló con cizallamiento durante 1 minuto. Se sometió a agitación normal el aceite durante 1 hora utilizando una mezcladora de accionamiento superior. Se dejó enfriar el aceite, agitando a velocidad normal, hasta que la temperatura del aceite fue de 40°C, y después se añadieron 1,8 mililitros de disolución 4 molar de hidróxido sódico, y se mezcló con cizallamiento la mezcla durante 10 segundos. El ácido cítrico y el agente cáustico formaron un tampón débil con un pH de 4,5. Mientras se mantenía la temperatura en 40°C, se añadieron 1,508 gramos de Purifine™ de Verenum (lipasa PLC, número de lote 90BU002A1) y 0,1022 gramos de Lecitase® Ultra de Novozymes (lipasa PLA1, número de lote LYN05007), seguidos de 90 gramos de agua desionizada, y se mezcló con cizallamiento toda la mezcla durante 120 segundos. Se agitó la mezcla oleosa a velocidad normal durante 30 minutos a una temperatura de 40°C. Después se centrifugó el aceite tratado con enzimas, y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El tratamiento enzimático combinado, con la mezcla de PLC y PLA1 a un pH de 4,5, produjo un aceite desgomado con un contenido residual de fósforo de 2,2 ppm. El contenido de FFA era 0,20% y el de DAG era 0,41%.

Ejemplo 10

Se calentaron a 75-80°C, con agitación normal utilizando una mezcladora de accionamiento superior, 1999 gramos de aceite de soja bruto que contenía 695,1 ppm de fósforo. Se añadieron 2,0 gramos de disolución al 50% peso/peso de ácido cítrico y se mezcló con cizallamiento durante 1 minuto. Se sometió a agitación normal el aceite durante 1 hora utilizando una mezcladora de accionamiento superior. Se dejó enfriar el aceite, agitando a velocidad normal, hasta que la temperatura del aceite fue de 60°C, y después se añadieron 1,8 mililitros de disolución 4 molar de hidróxido sódico, y se mezcló con cizallamiento la mezcla durante 10 segundos. El ácido cítrico y el agente cáustico formaron un tampón débil con un pH de 4,5. Mientras se mantenía la temperatura en 60°C, se añadieron 1,5296 gramos de Purifine™ de Verenum (lipasa PLC, número de lote 90BU002A1) y 0,1241 gramos de Lecitase® Ultra de Novozymes (lipasa PLA1, número de lote LYN05007), seguidos de 90 gramos de agua desionizada, y se mezcló con cizallamiento toda la mezcla durante 120 segundos. Se agitó la mezcla oleosa a velocidad normal durante 30 minutos a una temperatura de 60°C. Después se centrifugó el aceite tratado con enzimas, y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El tratamiento enzimático combinado, con la mezcla de PLC y PLA1 a un pH de 4,5, produjo un aceite desgomado con un contenido residual de fósforo de 5,2 ppm. Se encontró que el contenido de FFA era 0,36% y el de DAG era 0,44%.

El objetivo de las invenciones de las solicitudes de patente antes citadas era desarrollar un procedimiento de desgomado enzimático que tuviera condiciones de reacción que dieran como resultado los valores de fósforo residual más bajos posibles con la menor cantidad de coadyuvantes de elaboración, equipo, y tiempo. Cuando se terminaron los experimentos y se completaron todas las pruebas analíticas posteriores, fue sorprendente descubrir que la cantidad de ácidos grasos y diacilgliceroles generados en los aceites no se correspondían con los niveles teóricos que deberían haber sido producidos. Suponiendo que toda la PC y la PE hubieran reaccionado con la PLC, se esperaría que el contenido de DAG se incrementase en aproximadamente 1,16 a 1,35 por ciento, dependiendo del contenido de fosfolípidos de partida. Después, suponiendo que la enzima PLA1 reaccionase con todos los fosfolípidos, se esperaría que el contenido de FFA se incrementase en aproximadamente 0,77 a 0,83 por ciento, de nuevo dependiendo del contenido de fosfolípidos de partida. Además, si la PLC reaccionase con toda la PC y PE, entonces el aumento de FFA esperado, debido a los fosfolípidos restantes que reaccionan con la PLA, sería de aproximadamente 0,53 a 0,59 por ciento para los ejemplos anteriores. El mayor incremento de DAG fue de 0,63 por ciento, con un incremento de ácido graso de 0,12 (Ejemplo 6), ambos muy por debajo de los niveles esperados.

Se llevaron a cabo análisis de la fase pesada separada o "gomas" de los Ejemplos 1-10 precedentes para determinar si las gommas estaban hidratadas y se habían eliminado físicamente; para determinar el avance de cada una de las reacciones enzimáticas, y para determinar si una enzima había reaccionado predominantemente respecto a la otra enzima. La Tabla 5 es un compendio de los análisis de composición/distribución de fosfolípidos realizados en la fase pesada separada, por medio de NMR de P-31, que indica la cantidad de fosfolípido sin reaccionar, la cantidad de *liso*-fosfolípidos, y la cantidad de fosfatos libres, estando todas las cantidades indicadas en términos de porcentaje en peso de la muestra. (Nota: no hay datos de fosfolípidos para el Ejemplo 6 debido al deterioro microbiano de la muestra)

Tabla 5

Ej.	PC	PE	PI	PA	<i>l</i> -PC	<i>l</i> -PE	<i>l</i> -PI	<i>l</i> -PA	"C"	"E"	"I"	"A"
1	0,00	0,00	1,73	0,00	1,81	0,22	5,71	7,01	3,82	2,75	0,00	0,81
2	0,00	0,00	0,19	0,00	1,43	2,27	6,11	4,22	4,56	3,40	0,00	0,82
3	1,02	0,00	2,77	0,00	9,55	0,21	8,30	13,25	2,47	1,34	0,00	0,50
4	0,99	0,00	4,76	0,95	5,28	0,32	5,93	10,81	3,73	1,81	0,00	0,49
5	1,62	0,00	3,35	0,78	12,29	0,21	8,28	11,91	1,49	0,89	0,00	0,46
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	0,00	0,16	1,10	0,00	1,32	0,38	5,35	1,24	3,56	2,95	0,00	0,93
8	0,00	0,15	1,08	0,00	1,60	0,67	6,37	1,98	4,37	3,57	0,00	1,33
9	0,08	0,00	3,03	0,00	1,93	0,08	5,07	10,80	3,85	2,58	0,00	0,84
10	2,09	0,00	4,26	0,00	7,22	0,24	6,90	12,81	2,06	1,14	0,00	0,49

El Ejemplo 1 fue una adición secuencial de enzimas a un pH de 5, permitiendo a la PC y la PE reaccionar primeramente con la enzima PLC, y permitiendo después que el PI y el PA, y cualquiera PC y PE remanentes reaccionasen con la enzima PLA1. La enzima PLC estuvo en contacto con el aceite durante 60 minutos a 40°C antes de que se añadiera la enzima PLA, permitiendo así que la enzima reaccionase con toda la PC y PE presentes en el aceite sin competencia con la enzima PLA. Después de la reacción inicial con PLC, se añadió la PLA, de manera que la PLA pudiese hidrolizar los fosfolípidos restantes presentes en el aceite. El fósforo residual, tal como se ha señalado más arriba, se redujo con éxito a 6,5 ppm. El aceite de partida tenía un contenido de DAG de 0,40 por ciento y un contenido de FFA de 0,41 por ciento en comparación con el aceite final que contenía 0,69 por ciento de DAG y 0,56 por ciento de FFA. Si las dos enzimas hubieran reaccionado con los fosfolípidos específicos, entonces los DAG deberían haber aumentado en 1,29 por ciento hasta llegar a 1,69 por ciento y los FFA deberían haber aumentado en 0,55 por ciento hasta llegar a 0,96 por ciento. Se encontró que los DAG reales sólo habían aumentado en 0,29 por ciento y los FA sólo habían aumentó en 0,15 por ciento. El análisis de las gommas por NMR de P-31 demostró que se habían hidrolizado todos los fosfolípidos originales excepto el PI. Estaban presentes cantidades significativas de *liso*-PI y *liso*-PA, con cantidades menores de *liso*-PC y *liso*-PE. Las especies "fosfo" de "C" y "E" también estaban presentes en las gommas recuperados, así como la especie fosfo "A", lo cual constituyó una sorpresa porque se había publicado que la PLC no reacciona con PA. Además, no se detectó fosfo-inositol. Al comparar la distribución encontrada en las gommas con el aceite original, ¡habían desaparecido 1,0 por ciento de DAG y 0,40 por ciento de FA!

El Ejemplo 2 fue una adición simultánea de enzimas, a un pH de 7, con 1,5 por ciento de agua, y una mezcladura por cizallamiento de 45 segundos. Ambas enzimas estuvieron en contacto con el aceite durante 60 minutos a 60°C,

por lo que las enzimas estuvieron compitiendo entre sí. El aceite centrifugado tenía un contenido de fósforo residual de 109,6 ppm; los DAG habían aumentado 0,34 por ciento, y los FFA habían aumentado 0,20 por ciento. El análisis por NMR de P31 de las gomas recogidas detectó sólo una pequeña cantidad de PI presente, y nada de PC, PE ni PA. Por tanto, todos los fosfolípidos originales habían reaccionado. En las gomas se detectaron cantidades significativas de las especies *liso* y *fosfo*, salvo en el caso de "I". Resultó sorprendente descubrir que los DAG habían aumentado sólo ligeramente en comparación con el Ejemplo 1, pero las cantidades de "C" y "E" eran mayores que las encontradas en el Ejemplo 1.

El Ejemplo 3 fue una adición secuencial de enzimas, a un pH de 5, con 3 por ciento de agua, y una mezcladura por cizallamiento aplicada durante 45 segundos después de la adición de cada enzima a 60°C. La enzima PLC estuvo en contacto con el aceite durante 60 minutos antes de que se añadiese la enzima PLA y se dejaron reaccionar ambas enzimas durante 60 minutos adicionales. El aceite centrifugado contenía 2,2 ppm de fósforo, el contenido de DAG no había aumentado esencialmente (de 0,40 a 0,42 por ciento) y el contenido de FFA había aumentado sólo en un 0,17 por ciento. Comparando las gomas recogidas en el Ejemplo 3 con el Ejemplo 2, existía un gran incremento en las especies *liso*, mientras que todas las especies *fosfo* habían disminuido. Estos resultados indican que, en estas condiciones, la reacción con PLA dominaba sobre la reacción con PLC, aunque la PLC se había añadido primero. ¡La cantidad de DAG y FFA debería haber sido mucho mayor que la existente en el aceite final, basándose en la desaparición de los fosfolípidos de partida y en la aparición de los productos de reacción!

El Ejemplo 4 fue una adición enzimática secuencial, a un pH de 4,5, con 3 por ciento de agua, y mezcladura por cizallamiento durante 120 segundos después de la adición de cada enzima a 60°C. La enzima PLC estuvo en contacto con el aceite durante 15 minutos antes de que se añadiera la enzima PLA, y se dejó que ambas enzimas reaccionasen durante 15 minutos más. El aceite centrifugado contenía sólo 4,6 ppm de fósforo, los DAG aumentaron sólo en 0,02 por ciento, mientras que los FFA se redujeron en 0,04 por ciento. La evaluación de las gomas obtenidas mostró que algo de PC, PA y PI no se habían hidrolizado. El contenido de especies *liso* y *fosfo* no era tan alto como el encontrado en el Ejemplo 3, pero era aún elevado teniendo en cuenta el contacto limitado con las enzimas.

El Ejemplo 5 fue una adición simultánea de enzimas, a un pH de 4,5, con 4,5 por ciento de agua, y una mezcladura por cizallamiento durante 45 segundos. Las dos enzimas estuvieron en contacto con el aceite durante 120 minutos a 50°C, por lo que las enzimas estuvieron compitiendo entre sí durante toda la reacción. El aceite centrifugado tenía un contenido de fósforo residual de 1,8 ppm; los DAG no aumentaron en absoluto, y los FFA aumentaron en 0,26 por ciento. Las gomas analizadas presentaron un gran aumento en la cantidad de especies *liso* y una disminución de especies *fosfo* en comparación con los cuatro ejemplos anteriores, lo que indica que la PLA domina sobre la PLC en la mezcla de reacción.

El Ejemplo 6 fue una adición secuencial de enzimas a un pH de 7. La enzima PLC estuvo en contacto con el aceite durante 60 minutos a 50°C antes de que se añadiera la enzima PLA, permitiendo así que la enzima reaccionase con toda la PC y PE presentes en el aceite sin competencia con la enzima PLA. Después de la reacción inicial con PLC, se añadió la PLA de manera tal que la PLA pudo hidrolizar los fosfolípidos restantes presentes en el aceite. El contenido de fósforo residual, tal como se ha indicado anteriormente, sólo se redujo a 72,6 ppm. El aceite de partida tenía un contenido de DAG de 0,40 por ciento y un contenido de FFA de 0,41 por ciento, mientras que el aceite final contenía 1,03 por ciento DAG y 0,53 por ciento de FFA. Si ambas enzimas hubieran reaccionado con los fosfolípidos específicos, los DAG deberían haber aumentado en 1,36 por ciento, hasta llegar a 1,76 por ciento, y los FFA deberían haber aumentado en 0,57 por ciento, hasta un total de 0,98. Se halló que el contenido real de DAG había aumentado en 0,63 por ciento y el de FFA sólo había aumentó en 0,12 por ciento. No se dispone de análisis RMN de P-31 de las gomas a causa del deterioro microbiano de la muestra.

El Ejemplo 7 fue una adición simultánea de enzimas. Las enzimas estuvieron en contacto con la muestra de aceite durante un total de sólo 30 minutos a un pH 5, con 4,5 por ciento de agua, y a una temperatura de 50°C. El contenido residual de fósforo en el aceite era sólo 1,9 ppm. Todas las especies *liso* habían disminuido, en especial la *liso*-PC. Todas las especies *fosfo* presentaban un contenido doble del encontrado en el análisis de las gomas del Ejemplo 5, lo que indica que en estas condiciones la PLC domina a la PLA. Sin embargo, el contenido de DAG no había aumentado sustancialmente (de 0,40 a 0,41 por ciento) en comparación con el aceite de partida, y los FFA no habían aumentado hasta el total esperado de 0,98 por ciento, ¡sino que en realidad habían disminuido en 0,24 por ciento hasta un total de FFA de 0,17 por ciento!

El Ejemplo 8 fue una adición simultánea de enzimas, a un pH de 4,5, con 2 por ciento de agua, y una mezcladura por cizallamiento de 120 segundos. Ambas enzimas estuvieron en contacto con el aceite durante 120 minutos a 40°C, por lo que las enzimas estuvieron compitiendo entre sí durante toda la reacción. El aceite centrifugado tenía un contenido de fósforo residual de 13,3 ppm; los DAG habían aumentado en 0,43 por ciento, y los FFA habían aumentado en 0,07 por ciento. Todas las especies *liso* habían disminuido, mientras que el contenido de las especies *fosfo* era aún mayor que en el Ejemplo 7.

El Ejemplo 9 fue similar a la reacción del Ejemplo 8, pero en lugar de 2 por ciento de agua, se añadió 4,5 por ciento de agua a la reacción enzimática simultánea, y el tiempo de contacto con las enzimas fue de 30 minutos en lugar de 120 minutos. El contenido de fósforo residual en el aceite fue 2,2 ppm. La cantidad de DAG presentes en el aceite se mantuvo esencialmente igual que el aceite de partida, mientras que los FFA disminuyeron con respecto al aceite

5 inicial en 0,21 por ciento. El bajo nivel de fósforo residual y las cantidades elevadas de todas las especies *liso*, en especial el *liso*-PA, indicaban una elevada actividad de la enzima PLA. De ello se esperaba que se hubiera generado una cantidad muy grande de FFA en el curso de la reacción. Las especies *fosfo* habían disminuido ligeramente en comparación con el Ejemplo 8, pero el contenido de DAG debería haber sido significativamente mayor, conforme a las cantidades de especies *fosfo* presentes en las gomas.

10 El Ejemplo 10 se llevó a cabo con una adición simultánea de enzimas, a un pH de 4,5, con 4,5 por ciento de agua, y una mezcladura con cizallamiento de 120 segundos. Las enzimas estuvieron en contacto con el aceite durante 30 minutos a 60°C. El contenido de fósforo residual en el aceite fue 5,2 ppm. La cantidad de DAG presente en el aceite esencial se mantuvo igual a la del aceite de partida (0,40 frente a 0,44) mientras que los FFA disminuyeron con respecto al aceite inicial en 0,05 por ciento; al mismo tiempo, se mantuvo aproximadamente la misma cantidad de subproductos en las gomas que en el Ejemplo 3. Las condiciones de reacción de los Ejemplos 3 y 10 eran diferentes, y sin embargo los resultados en términos de especies *fosfo*, DAG y FFA resultantes fueron aproximadamente los mismos, lo que indica que la reacción es muy robusta en la formación de TAG.

15 La Tabla 6 siguiente es un resumen de los contenidos iniciales de fósforo, DAG y FFA de los aceites de partida en cada uno de los Ejemplos 1-10 precedentes, la cantidad teórica de DAG y FFA que habría estado presente en el aceite tratado si todos los fosfolípidos del aceite de partida hubiesen reaccionado con las enzimas, y las cantidades de fósforo, DAG y AGL medidas en el aceite tratado.

Tabla 6

Ejemplo	Aceite de partida			Cantidades teóricas en el aceite tratado		Cantidades medidas en el aceite tratado		
	Fósforo (ppm)	DAG (%)	FFA (%)	DAG* (%)	FFA** (%)	Fósforo (ppm)	DAG (%)	FFA (%)
1	769.5	0.40	0.41	1.69	0.96	6.5	0.69	0.56
2	785.1	0.40	0.41	1.71	0.97	109.6	0.74	0.61
3	742.9	0.40	0.41	1.64	0.94	2.2	0.42	0.58
4	747.3	0.40	0.41	1.65	0.94	4.6	0.42	0.37
5	747.3	0.40	0.41	1.65	0.94	1.8	0.40	0.67
6	810.8	0.40	0.41	1.76	0.98	72.6	1.03	0.53
7	795.3	0.40	0.41	1.73	0.98	1.9	0.42	0.17
8	783.9	0.40	0.41	1.71	0.97	13.3	0.83	0.48
9	697.7	0.40	0.41	1.57	0.91	2.2	0.41	0.20
10	695.1	0.40	0.41	1.56	0.90	5.2	0.44	0.36

* El contenido teórico de DAG sólo incluye la generación desde fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina.

** El contenido teórico de FFA sólo incluye la generación desde fosfatidilserina, fosfatidilinositol, y ácido fosfatídico.

20 El análisis de las gomas mediante NMR de P-31 confirmó que las gomas no estaban siendo hidratadas y separadas físicamente del aceite como ocurre en los procedimientos "normales" de desgomado acuoso y/o ácido, sino que fueron hidrolizadas por las enzimas PLC y PLA. El análisis confirmó la formación de la especie *fosfo* escindidas y la creación de *liso*-lecitinas (Tabla 5). Sin embargo, no explicó porqué los niveles de DAG y FFA habían disminuido en los aceites tratados. No se pudo encontrar información en la técnica anterior que describiese por qué parecían estar ausentes cantidades significativas de DAG y FFA.

25 La solicitud de patente de EE.UU. de número de orden 11/668,921, y la solicitud de patente de EE.UU. de número de orden 11/853,339, de Dayton et al., divulgan un método enzimático para eliminar diversos fosfolípidos de aceites vegetales a fin de producir un aceite desgomado con una combinación de enzimas, en el cual el período de reacción puede ser de una hora o menos. Los inventores revelan un efecto sinérgico entre las enzimas PLC y las enzimas PLA, que mejora la cinética de la reacción desde una duración de dos a seis horas cuando las enzimas se utilizan solas, hasta una hora o incluso menos cuando se utilizan juntas las dos enzimas.

30

La presente invención se basa en los niveles inesperadamente bajos de DAG y FFA encontrados en los análisis posteriores de estos aceites tratados. Basándose en estos resultados, la invención de la presente memoria reside en el descubrimiento de que aparentemente la PLA y la PLC interactúan sinérgicamente en una matriz lipídica que contiene fosfolípidos y sus subproductos de hidrólisis por PLA/PLC, para producir triacilgliceroles. Sin desear quedar atados por la teoría, se cree que los subproductos de diacilglicerol escindidos procedentes de la hidrólisis por PLC y los ácidos grasos escindidos procedentes de la hidrólisis por PLA se combinan en las condiciones del procedimiento de desgomado enzimático para crear nuevos triacilgliceroles. Se teoriza que la proximidad o la orientación de las dos enzimas, o ambas cosas, permiten la formación de los triacilgliceroles durante la liberación conjunta de los diacilgliceroles y los ácidos grasos en la fase acuosa de la reacción.

Se llevó a cabo una serie adicional de ejemplos en gomas producidas a partir de aceite de soja crudo utilizando el procedimiento tradicional de desgomado acuoso tal como se ha descrito con anterioridad en la técnica anterior. Las gomas húmedas fueron obtenidas directamente de un procedimiento de desgomado acuoso industrial. Se utilizaron las gomas húmedas como materia prima para eliminar la mayoría de los triacilgliceroles presentes en el aceite, mientras se mantenían todos los demás componentes menores que pueden estar presentes en la matriz de desgomado "típica". El análisis de las gomas mediante NMR de P-31 detectó sólo las especies fosfatidílicas y ninguna de las especies *liso* o *fosfo*. Los datos de composición de fosfolípidos se enumeran a continuación en la Tabla 7. El contenido de diacilglicerol de las gomas obtenidas del procedimiento de desgomado acuoso industrial era 1,5 por ciento.

Se llevaron a cabo dos ejemplos testigo en cada una de las condiciones de reacción óptimas de la enzima a fin de determinar el hecho de base, para analizar posteriormente los experimentos. El primer testigo se llevó a cabo a un pH neutro para la enzima fosfolipasa C, y el segundo experimento se llevó a cabo a un pH de 4,5, el óptimo para la enzima fosfolipasa A.

Ejemplo 11

Testigo: Fosfolipasa C (PLC) a pH neutro - Se añadieron 50 gramos de gomas de soja húmedas a un matraz de fondo redondo de 500 ml. Se añadieron 10 gramos de Purifine™ de Verenium (lipasa PLC, número de lote 90BU004A1). Se mezcló el material con una mezcladora de paletas de accionamiento superior equipada con una paleta de acero inoxidable redondeada para adaptarse a la curvatura del matraz, a una velocidad de aproximadamente 150 r.p.m. Se cubrió el matraz con Parafilm® para evitar la evaporación del agua. Se calentaron a 45°C las gomas húmedas y la enzima, con agitación continua. Se mantuvo el sistema durante ocho horas. Después se desmontó el aparato, y se recogieron las gomas hidrolizadas. Se colocaron las gomas en un tubo de centrifuga y se centrifugaron durante 15 minutos a 5000 r.p.m. para separar la fase ligera ("aceite") de la fase pesada ("gomas").

Se determinó que el contenido de DAG del aceite recuperado era 32,6 por ciento, en comparación con un contenido de DAG de partida de 1,5 por ciento, es decir, una diferencia de 31,1 por ciento. El gran aumento en el contenido de DAG es consistente con una reacción de PLC, en la cual el DAG ya no continúa reaccionando. El perfil de fosfolípidos, obtenido por análisis mediante NMR de P31 de la fase pesada, confirmó que los grupos fosfatidilo habían sido hidrolizados a grupos *fosfo*. Inesperadamente, se detectó una pequeña cantidad de "I", así como pequeñas cantidades de todos los grupos *liso*. Por tanto, la PLC posee cierta actividad de PLA en las condiciones de reacción de este ejemplo.

Ejemplo 12

Testigo: Fosfolipasa A (PLA) a pH 4.5 - Se añadieron 50 gramos de gomas de soja húmedas a un matraz de fondo redondo de 500 ml. Se añadieron 2,0 gramos de disolución al 50% peso/peso de ácido cítrico y se mezcló durante 5 minutos. Después se añadieron 1,8 mililitros de disolución 4 molar de hidróxido sódico, y se mezcló la mezcla durante 5 minutos más. El ácido cítrico y el agente cáustico formaron un tampón débil con un pH de 4,5. Se añadieron 2 gramos de Lecitase® de Novozymes (lipasa PLA1, número de lote LYN05007). Se mezcló el material con una mezcladora de paletas de accionamiento superior equipada con una paleta de acero inoxidable redondeada para adaptarse a la curvatura del matraz, a una velocidad de aproximadamente 150 r.p.m. Se cubrió el matraz con Parafilm® para evitar la evaporación del agua. Se calentaron a 45°C las gomas húmedas y la enzima, con agitación continua. Se mantuvo el sistema durante ocho horas. Después se desmontó el aparato, y se recogieron las gomas hidrolizadas. Se colocaron las gomas en un tubo de centrifuga y se centrifugaron durante 15 minutos a 5000 r.p.m. para separar la fase ligera ("aceite") de la fase pesada ("gomas").

Se determinó que el aceite recuperado contenía 3,8% de DAG, un incremento de 2,3 por ciento. El perfil de fosfolípidos, obtenido por análisis mediante NMR de P31 de la fase pesada, confirmó la hidrólisis de los grupos fosfatidilo a los correspondientes grupos *liso*, lo cual es consistente con una reacción de PLA. Se detectaron cantidades muy pequeñas de "C" y "E", así como de "A". La PLA no posee ninguna actividad de PLC significativa.

Ejemplo 13

PLA a pH neutro - Se añadieron 50 gramos de gomas de soja húmedas, obtenidas de una centrifuga desgomadora industrial, a un matraz de fondo redondo de 500 ml. Se añadieron 2 gramos de Lecitase® de Novozymes (lipasa PLA1, número de lote LYN05007). Se mezcló el material con una mezcladora de paletas de accionamiento superior

equipada con una paleta de acero inoxidable redondeado para adaptarse a la curvatura del matraz, con una velocidad de aproximadamente 150 r.p.m. Se cubrió el matraz con Parafilm® para evitar la evaporación del agua. Se calentaron a 45°C las gomas húmedas y la enzima, con agitación continua. Se mantuvo el sistema durante ocho horas. Después se desmontó el aparato, y se recogieron las gomas hidrolizadas. Se colocaron las gomas en un tubo de centrífuga y se centrifugaron durante 15 minutos a 5000 r.p.m. para separar la fase ligera ("aceite") de la fase pesada ("gomas"). Se determinó que el contenido de DAG del aceite recuperado era 2,6 por ciento, que representa un incremento de DAG de sólo 1,1 por ciento. El perfil de fosfolípidos mostró que todas las gomas "originales" se habían hidrolizado, pero se encontró una cantidad disminuida de derivados *liso* y *fosfo en comparación* con las condiciones testigo del Ejemplo 12. Esto sugiere que, en las condiciones de reacción de este ejemplo, la enzima PLA no genera DAG, aceite ni especies *fosfo*, pero genera especies *liso* y ácidos grasos.

Ejemplo 14

PLC y PLA a pH neutro - Se añadieron 50 gramos de gomas de soja húmedas, obtenidas de una centrífuga desgomadora industrial, a un matraz de fondo redondo de 500 ml. Se añadieron 10 gramos de Purifine® de Verenium (lipasa PLC, número de lote 90BU004A1) y 2 gramos de Lecitase® de Novozymes (lipasa PLA1, número de lote LYN05007). Se mezcló el material con una mezcladora de paletas de accionamiento superior equipada con una paleta de acero inoxidable redondeada para adaptarse a la curvatura del matraz, a una velocidad de aproximadamente 150 r.p.m. Se cubrió el matraz con Parafilm® para evitar la evaporación del agua. Se calentaron a 45°C las gomas húmedas y las enzimas, con agitación continua. Se mantuvo el sistema durante ocho horas. Después se desmontó el aparato, y se recogieron las gomas hidrolizadas. Se colocaron las gomas en un tubo de centrífuga y se centrifugaron durante 15 minutos a 5000 r.p.m. para separar la fase ligera ("aceite") de la fase pesada ("gomas").

Se determinó que el contenido de DAG del aceite recuperado era sólo el 7,8 por ciento, en comparación con el 32,6% de contenido de DAG obtenido cuando se utilizó sola la PLC. El perfil de fosfolípidos confirmó que todos los grupos fosfatidilo habían sido hidrolizados a grupos *fosfo* y *liso*. Se detectaron los grupos *fosfo* de "C", "E" y "A" más o menos en la misma cantidad que se habían detectado en el Ejemplo 11, salvo la cantidad de "I", que era ligeramente más baja. La *I-PE* estaba ligeramente disminuida, mientras que los contenidos de *I-PC* y de *I-PA* eran aproximadamente el doble de la cantidad encontrada en el Ejemplo 11, pero no habían experimentado un gran aumento. La cantidad de *I-PI* y *I-PA* eran significativamente más altas de las encontradas en el Ejemplo 11, ya que también estaba presente PLA en la matriz de reacción, y convirtió el PI y el PA a sus formas *liso*.

El análisis mediante NMR de P-31 no sólo confirmó la conversión por la PLC de aproximadamente la misma cantidad de fosfolípidos a sus grupos *fosfo*, como en el Ejemplo testigo 11, sino que también confirmó que los grupos fosfatidilo restantes se habían convertido en sus formas *liso*, lo que indica la conversión por PLA. Esto constituye un resultado sorprendente, ya que las condiciones de pH no eran las óptimas para la conversión por PLA. La cantidad de DAG presente en el aceite debería haber sido aproximadamente 33 por ciento y no, como se determinó mediante análisis por HPLC, ¡7,8 por ciento!

Ejemplo 15

PLC y PLA a pH 4.5 - Se añadieron 50 gramos de gomas de soja húmedas, obtenidas de una centrífuga desgomadora industrial, a un matraz de fondo redondo de 500 ml. Se añadieron 2,0 gramos de disolución al 50% peso/peso de ácido cítrico y se mezcló la mezcla durante 5 minutos. Después se añadieron 1,8 mililitros de disolución 4 molar de hidróxido sódico, y se mezcló la mezcla durante 5 minutos más. El ácido cítrico y el agente cáustico formaron un tampón débil con un pH de 4,5. Se añadieron 10 gramos de Purifine™ de Verenium (lipasa PLC, número de lote 90BU004A1) y 2 gramos de Lecitase® de Novozymes (lipasa PLA1, número de lote LYN05007). Se mezcló el material con una mezcladora de paletas de accionamiento superior equipada con una paleta de acero inoxidable redondeada para adaptarse a la curvatura del matraz, a una velocidad de aproximadamente 150 r.p.m. Se cubrió el matraz con Parafilm® para evitar la evaporación del agua. Se calentaron a 45°C las gomas húmedas y la enzima, con agitación continua. Se mantuvo el sistema durante ocho horas. Después se desmontó el aparato, y se recogieron las gomas hidrolizadas. Se colocaron las gomas en un tubo de centrífuga y se centrifugaron durante 15 minutos a 5000 r.p.m. para separar la fase ligera ("aceite") de la fase pesada ("gomas").

El contenido de DAG del aceite recuperado fue el mismo que en el Ejemplo 14, 7,8 por ciento. El perfil de fosfolípidos confirmó que todos los grupos fosfatidilo habían sido completamente hidrolizados a los grupos *fosfo* y *liso*, como en los Ejemplos 12 a 14. Se detectaron los grupos *fosfo* de "C", "E", "I" y "A" más o menos en la misma cantidad que se habían detectado en el Ejemplo 11. Los contenidos de *I-PC* y de *I-PE* eran significativamente superiores a los encontrados en el Ejemplo 11, ya que también estaba presente PLA en la matriz de reacción, y convirtió el PI y el PA a sus formas *liso*. Al igual que en los Ejemplos de desgomado 1 al 10, la cantidad de DAG realmente encontrada era menor de la esperada en base al análisis por NMR de P-31, lo que sugiere que los DAG y FFA que se habían generado fueron consumidos en la posterior generación de TAG.

El análisis por NMR de P-31 no sólo confirmó la conversión por la PLC de aproximadamente la misma cantidad de fosfolípidos a sus grupos *fosfo*, como en el Ejemplo Testigo 11, sino que también confirmó que los restantes grupos fosfatidilo habían sido convertidos a sus formas *liso* por la PLA. La cantidad de DAG presente en el aceite debería

haber sido aproximadamente 33 por ciento, ciento y no, como se determinó mediante análisis por HPLC, ¡7,8 por ciento!

- 5 La Tabla 7 resume los perfiles fosfolipídicos obtenidos mediante NMR de P-31, en donde todos los valores están indicados como porcentaje en peso de las fases pesadas separadas de las mezclas de reacción de los Ejemplos 11-15, y muestra los restos fosfatidilo sin reaccionar, los grupos *liso* generados por la conversión mediante PLA, y los grupos *fosfo* generados por la conversión mediante PLC.

Tabla 7

Ejemplo	PC	PE	PI	PA	<i>l</i> -PC	<i>l</i> -PE	<i>l</i> -PI	<i>l</i> -PA	"C"	"E"	"I"	"A"
Material de partida	9,36	9,32	5,50	4,86	0,62	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
11	0,00	0,00	5,45	0,54	0,59	0,30	1,58	1,65	4,27	3,20	0,40	1,36
12	0,00	0,00	0,00	0,00	19,91	19,01	13,19	10,80	0,05	0,05	0,00	0,39
13	0,00	0,00	0,00	0,00	7,59	7,17	5,07	3,97	0,12	0,05	0,00	0,17
14	0,00	0,00	0,00	0,00	1,23	0,23	7,39	3,70	4,40	3,40	0,22	1,47
15	0,00	0,00	0,00	0,00	1,09	2,71	8,29	4,86	4,25	3,00	0,50	1,37

- 10 La Tabla 8 siguiente es un resumen del contenido inicial de DAG y el índice de acidez (AV, por sus siglas en inglés) de las gomas de partida de cada uno de los Ejemplos 11-15, la cantidad teórica de DAG y FFA que estarían presentes en el aceite final si todos los fosfolípidos del aceite de partida hubiesen reaccionado con las enzimas, y el contenido real de DAG presente en el aceite final. No se midió el contenido final de FFA porque el procedimiento de medida de FFA requería más aceite del que estaba disponible a partir de estos experimentos. En cada uno de estos ejemplos, se encontró en el aceite recuperado menos DAG de lo esperado, lo que da un apoyo adicional a la conclusión de que los DAG fueron consumidos en la generación de TAG por la reacción de DAG con FFA.

15

Tabla 8

Ejemplo	Lecitina de partida		Enzima	Total teórico		Aceite recuperado	
	DAG (%)	AV*** (%)	Tipo	DAG* (%)	FFA** (%)	DAG (%)	FFA**** (%)
11	1,5	21	PLC	40,2	0,0	32,6	-
12	1,5	21	PLA	1,5	24,1	3,8	-
13	1,5	21	PLA	1,5	24,1	2,6	-
14	1,5	21	PLC/PLA	40,2	7,6	7,8	-
15	1,5	21	PLC/PLA	40,2	7,6	7,8	-

* El contenido teórico de DAG sólo incluye la generación desde fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina.

** El contenido teórico de FFA sólo incluye la generación desde todos los fosfolípidos cuando se hace reaccionar PLA. Cuando se hacen reaccionar juntas PLC y PLA, sólo se calculan los FFA procedentes de fosfatidilserina, fosfatidilinositol, y ácido fosfatídico.

*** El índice de ácido (AV) es el número de miligramos de hidróxido potásico necesarios para neutralizar los ácidos de un gramo de muestra (1). El AV es una representación de la acidez valorable aportada tanto por los fosfolípidos como por los ácidos grasos libres (2).

**** No se midió el contenido de FFA debido a la gran cantidad de muestra necesaria para llevar a cabo la valoración.

El siguiente Ejemplo 16 es idéntico en términos de los pasos del proceso al Ejemplo 15, excepto que se duplicó en escala. El propósito de este Ejemplo fue el de realizar un balance de masa en toda la muestra antes y después de la reacción enzimática con PLA/PLC para verificar la generación de triacilgliceroles desde los subproductos de reacción de la hidrólisis por PLA/PLC de los fosfolípidos.

Ejemplo 16

5 PLC y PLA a pH 4,5 - Se añadieron 100 gramos de gomas de soja húmedas, obtenidas de una centrifuga
 desgomadora industrial, a un matraz de fondo redondo de 500 ml. Se añadieron 4,0 gramos de disolución al 50%
 peso/peso de ácido cítrico y se mezcló durante 5 minutos. Después se añadieron 3,6 mililitros de disolución 4 molar
 10 de hidróxido sódico, y se mezcló la mezcla durante 5 minutos más. El ácido cítrico y el agente cáustico formaron un
 tampón débil con un pH de 4,5. Se añadieron 20 gramos de Purifine™ de Verenium (lipasa PLC, número de lote
 90BU004A1) y 4 gramos de Lecitase® de Novozymes (lipasa PLA1, número de lote LYN05007). Se mezcló el
 material con una mezcladora de paletas de accionamiento superior equipada con una paleta de acero inoxidable
 15 redondeada para adaptarse a la curvatura del matraz, a una velocidad de aproximadamente 150 r.p.m. Se cubrió el
 matraz con Parafilm® para evitar la evaporación del agua. Se calentaron a 45°C las gomas húmedas y las enzimas,
 con agitación continua. Se mantuvo el sistema durante ocho horas. Se analizaron muestras "tal cual", tanto de las
 gomas de partida como de la mezcla tratada enzimáticamente, en cuanto a humedad, porcentaje de gomas y
 contenido de aceite neutro. El contenido de aceite neutro se midió mediante el método expuesto en el Apéndice a
 continuación. Después se analizó el aceite neutro separado en cuanto a contenido de diacilglicerol. En la Tabla 9 se
 muestran los resultados.

Tabla 9

	Gomas de partida	Gomas tratadas con enzimas
Humedad (%)	24,0	32,7
porcentaje de gomas ("tal cual")	55,8	27,3
porcentaje de gomas ("seco")	73,4	41,4
porcentaje de aceite neutro ("tal cual")	20,2	38,7
porcentaje de aceite neutro ("seco")	26,5	58,6
DAG (%)	1,5	13,2

El análisis de las gomas húmedas de partida es típico de gomas húmedas obtenidas de una operación industrial de
 desgomado acuoso de aceite de soja. Del material no acuoso de la muestra, las gomas constituían
 20 aproximadamente el 73 por ciento y el aceite neutro aproximadamente el 27 por ciento. El análisis de las "gomas
 tratadas con enzimas" del Ejemplo 16 demuestra que una porción sustancial de los fosfolípidos presentes habían
 sido hidrolizados por las enzimas PLA/PLC para dar fosfolípidos, como se demuestra por la disminución de las
 gomas del 73 al 41 por ciento, mientras que la cantidad de triacilgliceroles mostró un aumento del 26,5% al 58,6%.
 Teóricamente, la cantidad de diacilgliceroles que se esperaba fueran generados por el procedimiento era el 40,2%,
 pero se encontró que resultó ser sólo el 13,2%. Se concluye que la combinación de enzimas PLA y PLC utilizadas
 25 para el desgomado de aceite, la purificación o modificación de lecitinas, genera triacilgliceroles, o aceite.

Se ha descrito un método para generar triacilgliceroles desde gomas de aceite que contienen fosfatidilo, por
 tratamiento de las gomas con una combinación de enzimas PLA y PLC, con lo que el subproducto de DAG de la
 reacción con PLC y el subproducto de FFA de la reacción con PLA se combinan entre sí en presencia de las
 30 enzimas, para formar nuevas moléculas de TAG. Se pueden hacer reaccionar las dos enzimas diferentes con las
 gomas, tanto de manera simultánea como de manera secuencial; cuando se utiliza un procedimiento secuencial las
 enzimas se pueden añadir en cualquier orden. El tiempo de reacción de las enzimas con las gomas puede ser del
 orden de alrededor de cuatro horas o menos, y puede ser tan corto como aproximadamente treinta minutos. Las
 enzimas que tienen actividad de PLA se pueden seleccionar del grupo consistente en una enzima fosfolipasa A1 y
 una enzima fosfolipasa A2. La enzima PLA puede estar presente en la mezcla de reacción en una concentración de
 35 aproximadamente 2 ppm de enzima activa o menos; o bien 1 ppm de enzima activa o menos; o una concentración
 tan baja como 0,5 ppm de enzima activa o menos. Las enzimas que tienen actividad de PLC se pueden seleccionar
 del grupo consistente en una enzima fosfolipasa C y una enzima fosfolipasa C específica para fosfatidil-inositol. La
 enzima PLC puede estar presente en la mezcla de reacción en una concentración de aproximadamente 30 ppm de
 40 enzima activa o menos; o bien 20 ppm de enzima activa o menos; o una concentración tan baja como 10 ppm de
 enzima activa o menos.

Las reacciones enzimáticas se pueden llevar a cabo a una temperatura dentro del intervalo de aproximadamente
 40-80°C, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 40-60°C. El pH se puede situar en el intervalo de
 aproximadamente 3-7. La reacción enzimática puede ser facilitada por mezcladura con cizallamiento,
 preferiblemente durante unos cuarenta y cinco segundos o más cuando se realiza a escala de laboratorio. Se espera
 45 que el tiempo asignado para la mezcla con cizallamiento aumente a medida que el proceso sea escalado a niveles
 industriales, como es sabido por los expertos en la técnica. Además, la precipitación con acetona del material de que
 contiene fósforo permitiría la recuperación del aceite generado; tal procedimiento es conocido en la técnica en la
 producción de lecitinas desprovistas de aceite.

Aunque en la presente memoria se han expuesto realizaciones preferidas de la invención tal como son conocidas en el momento de esta solicitud, serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica otras realizaciones que abarquen el método de la invención, y se pretende que todas estas realizaciones y sus equivalentes estén cubiertas por la presente solicitud abarcada por las reivindicaciones de la misma.

5 Apéndice

Para determinar el aceite neutro de los ejemplos de esta solicitud se utilizó el método siguiente.

Definición

Este método permite determinar el aceite neutro total de que se encuentra en gomas húmedas, *liso*-gomas o material de jabón de aceite crudo.

10 Alcance

Aplicable a gomas, *liso*-gomas y material de jabón.

Referencia

Método A.O.C.S. G 5-40

Método A.O.C.S. Ca 2c-55

15 Método A.O.C.S. Ja 4-46

Aparatos

1. Probeta graduada - 100 ml

2. Probeta graduada - 50 ml

3. Probeta graduada - 25 ml

20 4. Tubos de centrifuga desechables - 50 ml (polipropileno)

5. Embudo de decantación - 500 ml

6. Vaso de precipitados - 500 ml

7. Vaso de precipitados - 400 ml

8. Vaso de precipitados - 250 ml

25 9. Varillas agitadoras de vidrio

10. Centrífuga

11. Desecador

12. Baño de vapor

13. Horno - 105 ° C.

30 Reactivos

1. Hidróxido potásico acuoso (KOH) - al 14% en peso.

2. Cloruro sódico (NaCl) - calidad reactivo.

3. Alcohol etílico - se permiten las Fórmulas SDA 30 y 3A, 50% en volumen. Mezclar 10 volúmenes de alcohol del 95% con 9 volúmenes de agua destilada.

35 4. Alcohol etílico - se permiten las Fórmulas SDA 30 y 3A, 10% en volumen. Mezclar 2 volúmenes de alcohol al 95% con 17 volúmenes de agua destilada.

5. Éter de petróleo - calidad ACS.

6. Acetona - calidad ACS.

7. Agua desionizada o destilada.

8. Nitrógeno - limpio y seco.

Procedimiento

- 5 1. Determinar el porcentaje de humedad de la muestra inmediatamente después de que se haya tomado la muestra. Nota: AOCS 2c-55, la temperatura se baja a 105°C debido a la formación de espuma en las muestras de jabón a 130°C. El tiempo se aumenta a 4 horas.
2. Mezclar a fondo la muestra y pesar inmediatamente.
3. Pesar 5 gramos (con una precisión de 0,0001 g) de muestra en un tubo de centrifuga de 50 ml desechable previamente tarado (Nota: incluir el tapón y el vaso (para sostener el tubo en la balanza)).
- 10 4. Añadir 35 ml de acetona fría (mantenida en un baño de hielo) a la muestra y mezclar muy bien con una varilla agitadora de vidrio. Romper el precipitado de lecitina con la varilla de vidrio. Nota: La acetona se tornará de color amarillo brillante.
5. Tapar el tubo de centrifuga.
6. Centrifugar la acetona durante 5 minutos para separar las gomas de la acetona.
7. Verter la acetona en un vaso de precipitados de 250 ml.
- 15 8. Repetir cuatro veces los pasos 4 a 7.
 - a. Después de la última extracción, separar las gomas y colocarlas en una cápsula de secado desechable, previamente pesada. Dejar que se evapore el exceso de acetona.
 - b. Colocar la muestra en un horno de convección a 105°C durante una noche.
 - 20 c. Enfriar hasta la temperatura ambiente en un desecador y pesar el contenido de la cápsula de secado y de la muestra.
 - d. Calcular el porcentaje de gomas en la muestra original y sobre base seca.
9. Verter la capa de acetona en un embudo de decantación de 500 ml ("A").
10. Añadir 50 ml de agua al embudo de decantación. Mezclar.
11. Añadir 50 ml de éter de petróleo (PE, por sus siglas en inglés). Mezclar.
- 25 12. Añadir una pizca de NaCl (~1/4 de cucharada de sal de mesa) al embudo de separación. Mezclar.
13. Dejar que se separen las dos capas. Retirar la capa inferior (acetona/agua), incluyendo la emulsión, y transferirla a un nuevo embudo de decantación ("B-1"). NO DESECHAR LA CAPA DE PE.
14. Añadir 50 ml de éter de petróleo (PE) a la acetona/agua del paso 13. Mezclar.
- 30 15. Dejar que se separen las dos capas. Retirar la capa inferior (acetona/agua), incluyendo cualquier emulsión, transfiriéndola a un embudo de decantación nuevo ("B-2").
16. Añadir la capa de éter de petróleo al extracto en PE original del paso 13, en el embudo de separación "A".
17. Repetir dos veces los pasos 14 a 16. La capa de acetona/agua se puede transferir a un embudo "B-1" usado en pasos anteriores. Una vez que se haya completado la última extracción, se podrá descartar la capa de acetona/agua.
- 35 18. Añadir 100 ml de etanol al 50% al embudo de decantación que contiene el PE. Mezclar.
19. Añadir 10 ml de KOH al 14%. Mezclar suavemente.
20. Añadir 50 ml de etanol al 50% al embudo de decantación. Mezclar.
21. Dejar que las capas se separen por completo. No dejar que la capa de PE permanezca en contacto con la capa de alcohol/KOH más de 30 minutos. NO DESECHAR LA CAPA DE PE.
- 40 22. Retirar la capa de alcohol/KOH y transferirla a un embudo de decantación nuevo.
23. Añadir 50 ml de PE al embudo de decantación que contiene la capa de alcohol/KOH. Mezclar.

24. Dejar que las capas se separen. Recoger la capa de alcohol/ KOH en un embudo de decantación nuevo. Añadir la capa de PE al PE del paso 21.

25. Repetir los pasos 23 y 24.

5 26. En el embudo de decantación que contiene las capas de PE, añadir 25 ml de alcohol al 10%, agitar enérgicamente. Dejar que las capas se separen. Retirar la capa de alcohol. Desechar la capa de alcohol.

27. Repetir dos veces el paso 26. Al tercer "lavado" (la capa de alcohol), agregar dos gotas de fenolftaleína para saber si la capa es neutra. Si la capa se vuelve rosa, repetir el paso 26.

28. Transferir la capa de PE a un vaso de precipitados tarado que ha sido previamente secado y enfriado en un desecador. Evaporar el PE en un baño de vapor bajo una ligera corriente de nitrógeno.

10 29. Una vez que se ha eliminado el PE, colocar el vaso de precipitados en un horno a 105°C durante 30 minutos.

30. Enfriar en un desecador hasta la temperatura ambiente y pesar.

31. Repetir hasta que se alcance un peso constante (se alcanza un peso constante cuando la pérdida (o ganancia) de peso no sea superior a 0,1% en períodos de secado sucesivos de 30 minutos).

Cálculos

15 Aceite neutro, en % (tal cual) = masa de aceite neutro / masa de la muestra x 100

Aceite neutro, en % (base seca) =

$$\{ \text{Masa de aceite neutro} / \text{masa de la muestra} \} / \{ 100 - \text{porcentaje de humedad} \} \times 100$$

Gomas, en % (tal cual) = Masa de gomas secas / masa de la muestra x 100

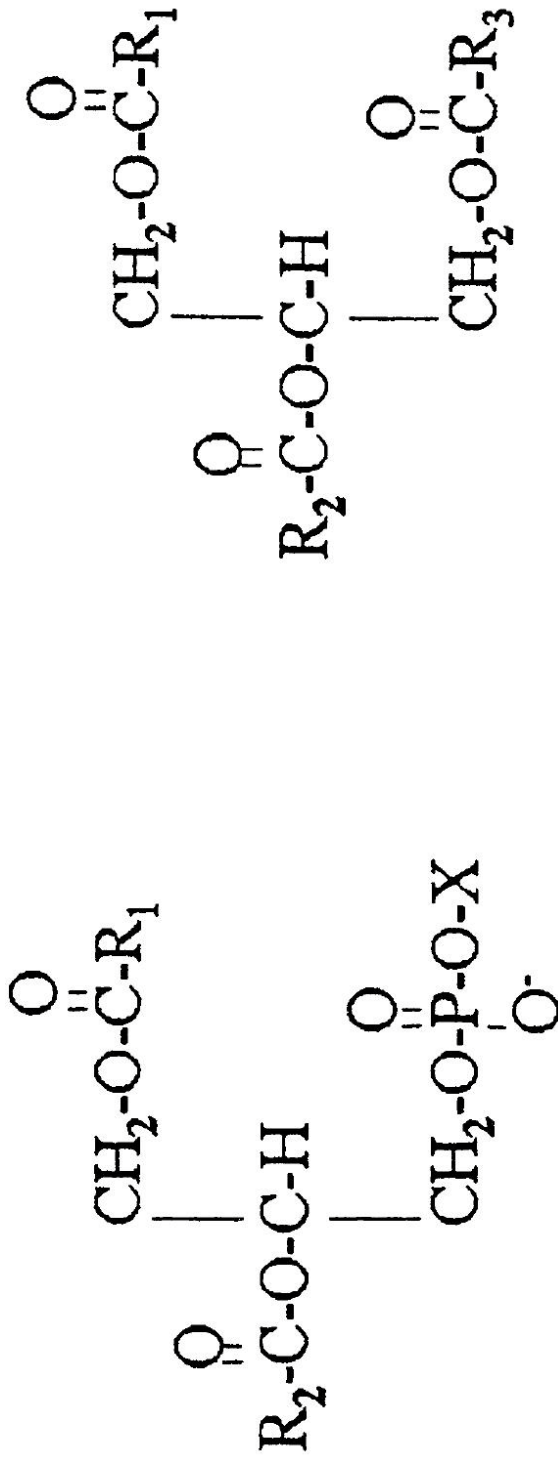
Gomas, en % (base seca) = {Masa de gomas secas / masa de la muestra} / {100 - porcentaje de humedad} x 100

20

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para generar triacilgliceroles a partir de gomas de aceite, en donde el método comprende
 - (a) proporcionar una composición de aceite que contiene una cantidad de gomas de aceite, en donde dichas gomas comprenden fosfolípidos,
 - 5 (b) separar dichas gomas de aceite de dicha composición de aceite para proporcionar una primera fracción en donde dichas gomas de aceite han sido eliminadas y una segunda fracción que contiene dichas gomas de aceite separadas,
 - (c) tratar dicha segunda fracción con una o más enzimas que tienen actividad de PLA para generar ácidos grasos libres,
 - 10 (d) tratar dicha segunda fracción con una o más enzimas que tienen actividad de PLC para generar diacilgliceroles, de manera que dichos ácidos grasos y dichos diacilgliceroles reaccionan entre sí en presencia de al menos una de dichas enzimas para formar triacilgliceroles.
- 2.- El método según la reivindicación 1, en donde los pasos (c) y (d) se producen de forma sustancialmente simultánea, o en donde el paso (c) se produce antes del paso (d), o en donde el paso (d) se produce antes del paso (c).
- 15 3.- El método según la reivindicación 1 ó 2, en donde la duración de la reacción de las enzimas con la segunda fracción no es superior a aproximadamente cuatro horas, o en donde la duración de la reacción de las enzimas con la segunda fracción es aproximadamente treinta minutos.
- 4.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dichas una o más enzimas que tienen actividad de PLA están seleccionadas del grupo consistente en una enzima fosfolipasa A1 y una enzima fosfolipasa A2, o en donde dichas una o más enzimas que tienen actividad de PLC están seleccionadas del grupo consistente en una enzima fosfolipasa C y una enzima fosfolipasa C específica para fosfatidil-inositol.
- 20 5.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicha reacción de las enzimas con la segunda fracción se produce a un pH de aproximadamente 8 o inferior, o en donde dicha reacción de las enzimas con la segunda fracción se produce a un pH de aproximadamente 3-7.
- 25 6.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicha reacción de las enzimas con la segunda fracción se produce a una temperatura de aproximadamente 40-80°C, o en donde dicha reacción de las enzimas con la segunda fracción se produce a una temperatura de aproximadamente 40-60°C.
- 7.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicha composición de aceite comprende un aceite bruto.
- 30 8.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicho paso de separar dichas gomas de dicha composición de aceite se lleva a cabo mediante un método seleccionado del grupo consistente en desgomado acuoso, desgomado ácido, refino cáustico, y desgomado enzimático distinto de desgomado con una combinación de PLA y PLC.
- 35 9.- El método según la reivindicación 8, en donde dicho paso de separar dicha gomas de dicho aceite se lleva a cabo mediante refino cáustico, y las gomas separadas son llevadas a un pH de aproximadamente 8 o inferior antes de ser tratadas con dichas enzimas.
- 10.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde dicha enzima PLC está presente en una cantidad de aproximadamente 30 ppm de enzima activa o menos, o en donde dicha enzima PLC está presente en una cantidad de aproximadamente 20 ppm de enzima activa o menos, o en donde dicha enzima PLC está presente en una cantidad de aproximadamente 10 ppm de enzima activa o menos.
- 40 11.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde dicha enzima PLA está presente en una cantidad de aproximadamente 2 ppm de enzima activa o menos, o en donde dicha enzima PLA está presente en una cantidad de aproximadamente 1 ppm de enzima activa o menos, o en donde dicha enzima PLA está presente en una cantidad de aproximadamente 0,5 ppm de enzima activa o menos.
- 45 12.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde la mezcla de la segunda fracción y las enzimas se mezcla inicialmente con cizallamiento.
- 13.- El método según la reivindicación 12, en donde dicha mezclado con cizallamiento prosigue durante una duración de al menos aproximadamente 45 segundos.
- 50 14.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, que incluye el paso de añadir una cantidad de agua.

15.- El método según la reivindicación 14, en donde dicha cantidad de agua es al menos aproximadamente 1,5% en peso de la mezcla total, o en donde dicha cantidad de agua es al menos aproximadamente 3,0% en peso de la mezcla total, o en donde dicha cantidad de agua es al menos aproximadamente 4,5% en peso de la mezcla total.



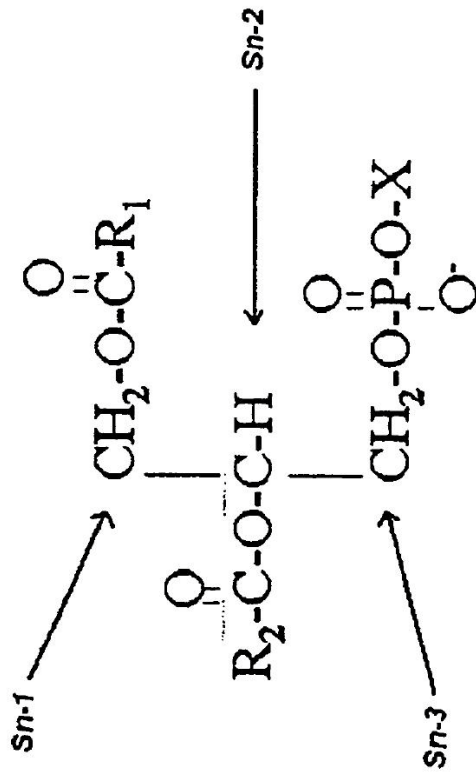
Fosfolípido

Triacilglicerol

$R_{\#}$ = cadenas de ácido graso

X = grupo funcional

FIG. 1



Fosfolípido

$R_{\#}$ = cadenas de ácido graso
 X = grupo funcional

FIG. 2

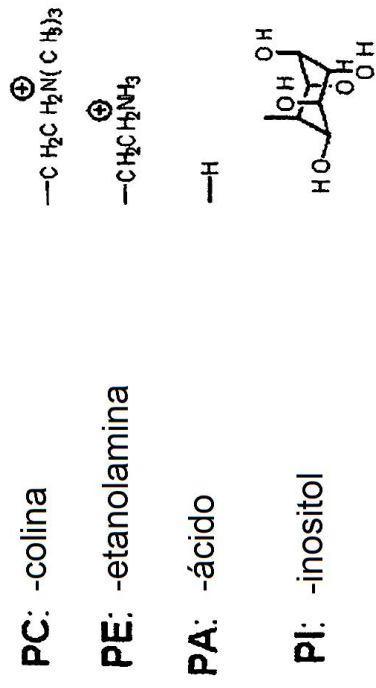
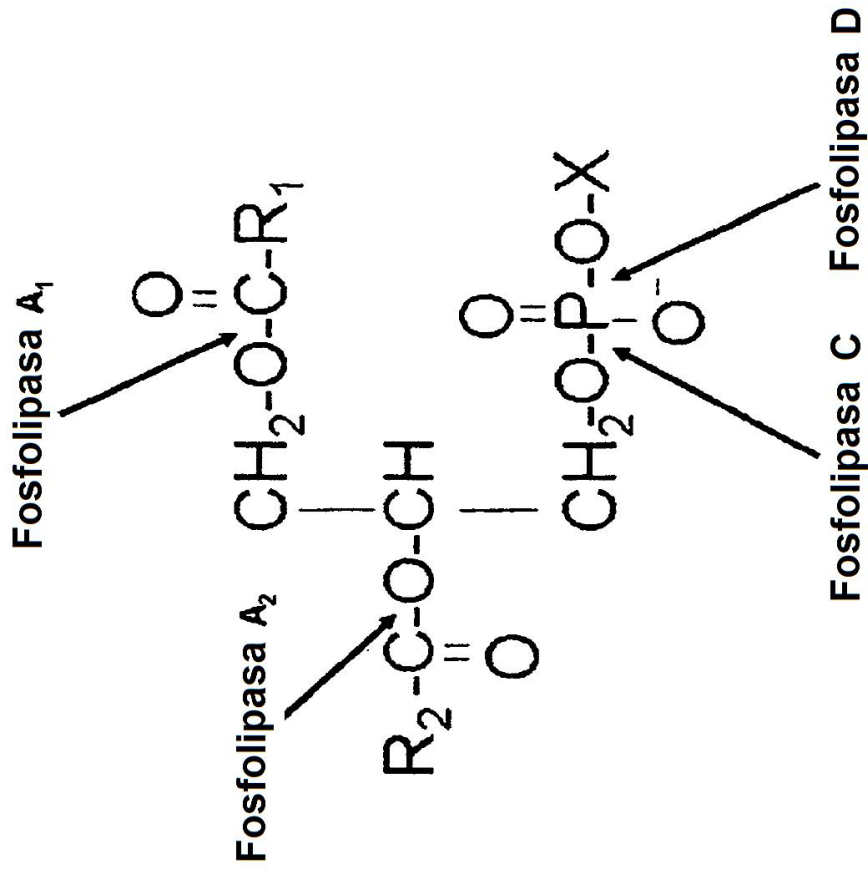


FIG. 3



X = H, colina, etanolamina, serina, inositol, etc.

FIG. 4

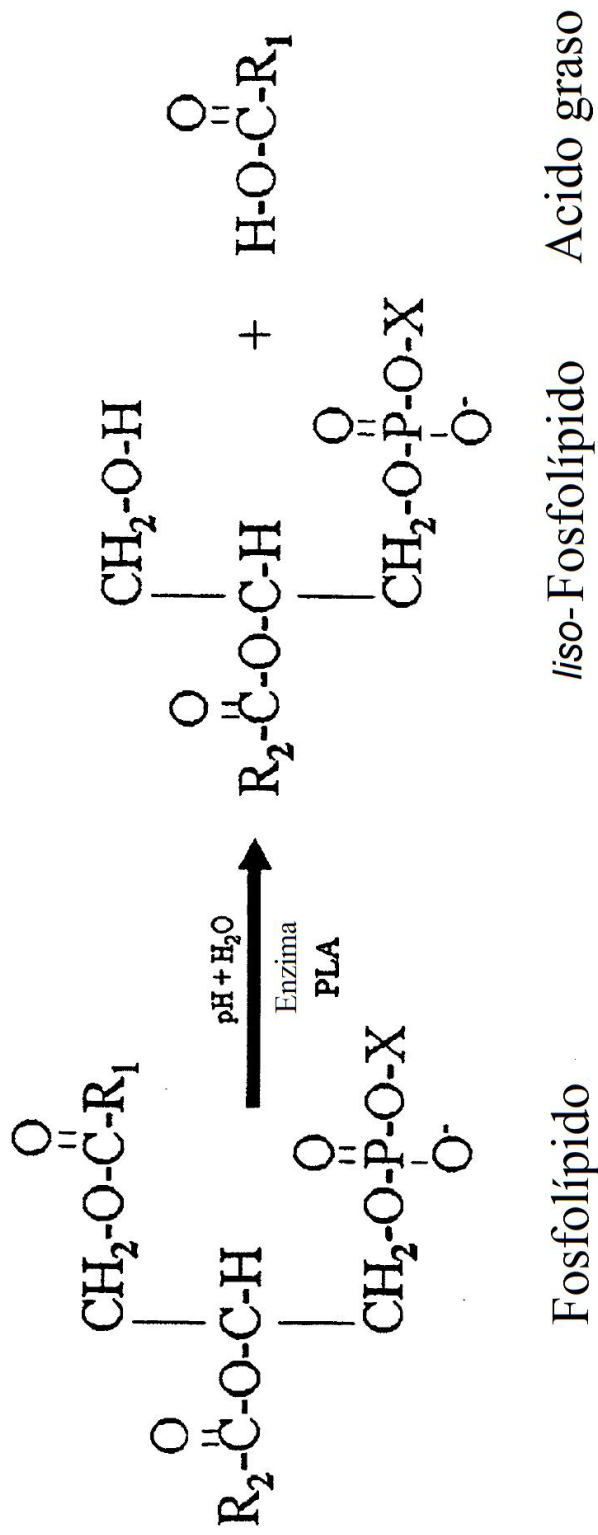


FIG. 5

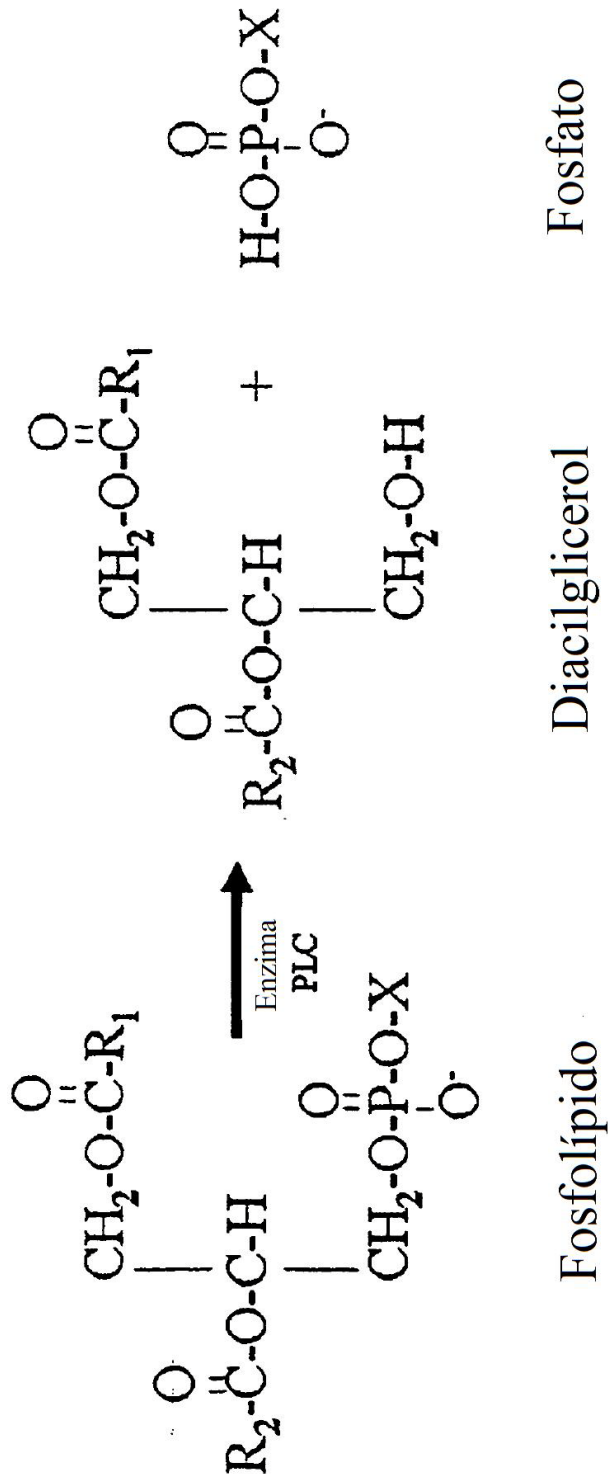
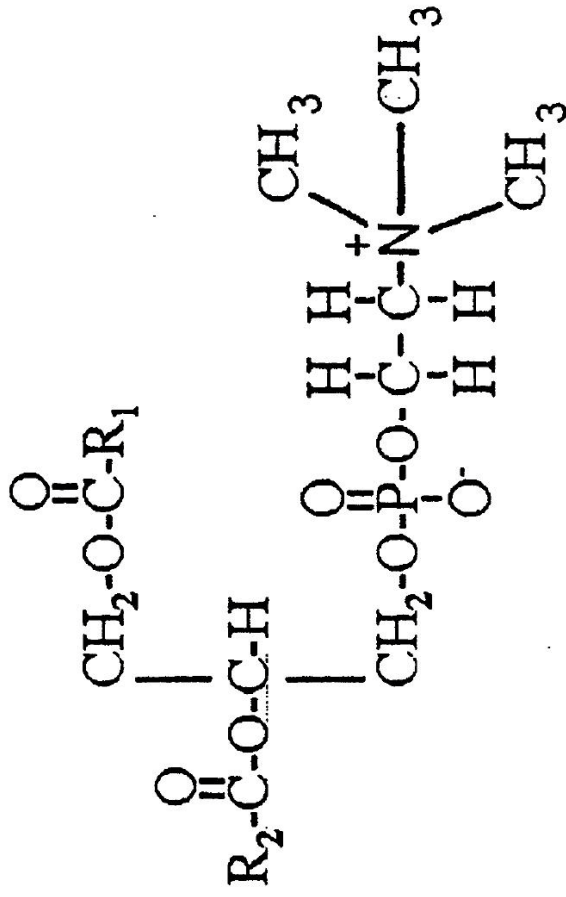
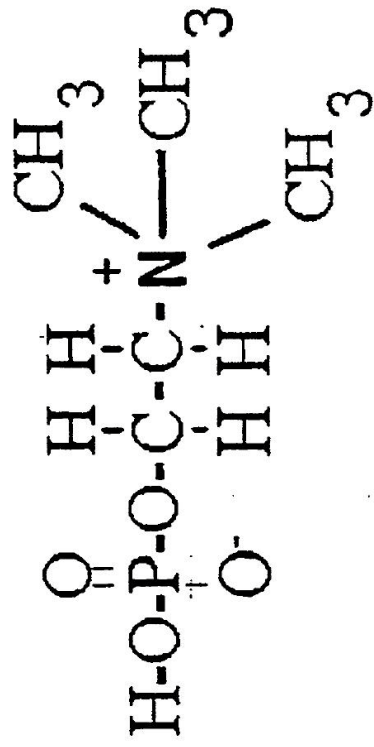


FIG. 6



Fosfatidilcolina

FIG. 7



fosfo-colina

FIG. 8