

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 543**

51 Int. Cl.:

C11C 3/10 (2006.01)

A23D 9/00 (2006.01)

A23D 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2004 E 04804359 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2012 EP 1709143**

54 Título: **Modificación enzimática de grasas de triglicéridos**

30 Prioridad:

26.01.2004 EP 04075249

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.02.2013

73 Titular/es:

**UNILEVER N.V. (100.0%)
WEENA 455
3013 AL ROTTERDAM, NL**

72 Inventor/es:

**BRINK, HILDA, BATSHEVA, TEN;
FLÖTER, ECKHARD;
HUIZINGA, HINDRICK;
LAWRENCE, CORRINE, FRANCES y
ZUIDERWIJK, MATTHEUS, ADRIANUS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 396 543 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

Modificación enzimática de grasas de triglicéridos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de interesterificación de grasas de triglicéridos. Más particularmente el procedimiento se refiere a un proceso de interesterificación enzimática que se designa adicionalmente como un procedimiento de reorganización enzimática.

Antecedentes

10 La interesterificación química de una grasa de triglicéridos tiene como objetivo un intercambio de residuos de ácidos grasos del resto glicérido de la grasa. Después de la interesterificación, en los triglicéridos resultantes los residuos de ácidos grasos se han intercambiado con otros residuos. Los residuos de ácidos grasos se pueden originar a partir de la misma o de diferentes moléculas de triglicéridos o pueden proceder de ácidos grasos libres que estuvieran presentes en la mezcla de reacción.

15 El intercambio de residuos de ácidos grasos da como resultado eventualmente una distribución estadísticamente aleatoria de los residuos de ácidos grasos sobre las posiciones terminales y medias de la molécula de glicéridos. Se dice que la grasa obtenida ha llegado a estar totalmente modificada al azar.

Los procedimientos de interesterificación química necesitan un catalizador, que usualmente es un hidróxido de metal alcalino o un alcanolato de metal alcalino, tal como metanolato de sodio.

20 Sin embargo, los consumidores prefieren de manera creciente alimento e ingredientes alimentarios que no se hayan expuesto a productos químicos durante su preparación. Por lo tanto ha surgido una necesidad general para procedimientos de modificación no químicos de grasas de triglicéridos. La interesterificación puede ocurrir también por medio de reorganización enzimática. Tal procedimiento enzimático no afecta la naturaleza de la grasa.

Contrariamente a la interesterificación química que se lleva a cabo instantáneamente, la reorganización enzimática se desarrolla gradualmente y por lo tanto lleva más tiempo.

25 Para la reorganización enzimática (ER) se usa una enzima lipasa como catalizador. Las lipasas usadas para ER comprenden la lipasa de *Mucor miehei* microbiana, la lipasa de *Thermomyces lanuginosa* y la de *Rhizopus oryzae* (anteriormente *Rhizopus delemar*).

Generalmente, las lipasas usadas en un procedimiento de ER son específicas de sn-1 y sn-3 lo que quiere decir que solamente se afectan los residuos de ácidos grasos terminales.

30 En el curso de la reacción enzimática, puede ocurrir alguna modificación al azar en la posición media. Sin embargo cuando esto pasa se debe a migración de acilo (véanse Torres y cols., *JAOCS* vol. 79, n.º: 8 (2002) p. 775-781, Torres y cols. *JOACS*, vol. 79 n.º: 7 (2002) p. 655-661 y Zhang y cols. *JAOCS* vol. 78, n.º: 1 (2001) p. 57-64) que es una reacción química secundaria que tiene lugar a tiempos de reacción largos. La migración de acilo se debe a la presencia de diacilglicéridos que surgen abundantemente a tiempos de reacción largos y en presencia de agua.

35 Esta diferencia en modificación al azar da como resultado productos de triglicéridos con una composición de triglicéridos y con propiedades que son bastante diferentes de la grasa de triglicéridos totalmente modificada al azar que resulta de la interesterificación química. Desafortunadamente, el conocimiento extensivo y la experiencia adquirida usando grasas interesterificadas químicamente totalmente modificadas al azar para elaborar productos alimentarios no se puede usar para grasas enzimáticamente interesterificadas (Zhang y cols. *JAOCS*, vol. 78, n.º: 1 (2001) páginas 57-64).

40 Adicionalmente la posición media en una grasa de materia prima natural es un ácido graso insaturado, a menudo ácido oleico. Los triglicéridos del tipo palmítico-oleico-palmítico pueden causar granulosidad en la mezcla de grasas. Debido a que la posición media de los triglicéridos en una reacción de reorganización enzimática está duramente afectada, los triglicéridos con una posición media saturada apenas están presentes en grasas reorganizadas enzimáticamente, a menos que ya estén presentes en el material de partida. Esta distribución típica de ácidos grasos naturales a lo largo de los triglicéridos tiene algunas consecuencias. En primer lugar es nutritivamente beneficioso tener un ácido graso insaturado en la posición media, dado que la lipasa 2 en nuestro sistema digestivo administra un 2-monoacilglicérido y 2 ácidos grasos libres que están derivados de las posiciones de triacilglicéridos terminales. Este efecto digestivo está confirmado por Nielsen (*Oils and fats international* (vol. 18, n.º: 4 (2002)). Él estableció que la acción IM de TL de lipozima inmovilizada está restringida a la posición 1 y 3 en el triglicérido, dejando la posición media inalterada. Sin embargo, esta configuración de ácidos grasos a la largo de la estructura de glicerol de los triacilglicéridos tienen también un inconveniente. Con respecto a la funcionalidad de estructuración estos triacilglicéridos, con una posición media insaturada, son menos funcionales. Esto se debe a su punto de fusión más bajo comparado con triacilglicéridos completamente saturados y su complicado comportamiento de cristalización.

Como se ha explicado anteriormente, la reorganización en la posición media puede ocurrir durante la reorganización

enzimática, sin embargo con el fin de que ocurra en una cantidad apreciable la reorganización enzimática tiene que desarrollarse en el equilibrio (conversión al 100 % de posición de sn1 y sn-3) o más allá. La reorganización química se desarrolla instantáneamente, queriendo decir que se obtiene instantáneamente una modificación al azar completa. Es la naturaleza de la reacción enzimática que en el comienzo de la reacción la conversión de las posiciones sn-1 y sn3
 5 funcione rápidamente, pero que hacia el equilibrio la velocidad de conversión proceda más y más lentamente (véase figura 1). Consecuentemente, para obtener conversión del 100 % se necesitan tiempos de contacto de enzimas largos.

El procedimiento de reorganización enzimática, aunque estrictamente específico de sn-1 y sn-3, está acompañado siempre por algún cambio de la distribución de ácidos grasos en la posición sn-2. Esto se debe al procedimiento químico inevitable que tiene lugar en glicéridos de ácidos grasos parciales. Xu y cols. (Enzymatic Production of
 10 Structured lipids: Process reactions and Acyl migration, informe 11 (2000) páginas 1121-1131) comunicó que la acilmigración puede atribuirse primariamente a tiempos de residencia más largos. Sin embargo, el flujo lento relacionado a través del reactor de lecho empaquetado hace al procedimiento caro para usar a escala industrial. (Xu y cols. JAOCS, vol. 79, n.º: 6 (2002) páginas 561-565). De hecho, Torres y cols. recomiendan tiempos de reacción cortos para reducir la modificación al azar de los residuos de ácidos grasos (JOACS, vol. 79, n.º: 8 (2002) páginas 775-781).

15 Sin pretender vincularse a una teoría, el procedimiento migración de acilo es independiente de la enzima usada, sin embargo esto se debe a la velocidad relativamente lenta del procedimiento. Solamente ocurre efecto significativo en la posición media a tasas de conversión muy altas, a menudo del 100 %, que están relacionadas con tiempos de contacto muy largos. Esto se ilustra por Fig. 3.

20 Los procedimientos comunicados en la técnica anterior hacen referencia típicamente a combinaciones de tiempos y concentraciones de enzimas que se refieren a conversión del 100 % de la posición de sn-1 y de sn-3 (equilibrio) y a menudo en exceso del tiempo necesario para obtener conversión del 100 % de las posiciones terminales. Como una consecuencia lógica estas reacciones proporcionan también una cierta cantidad de modificación al azar de la posición media. Sin embargo, estos procedimientos son económicamente no atractivos, debido a que los tiempos de contacto largos se necesitan para obtener una cantidad razonable de modificación al azar de sn-2.

25 Por ejemplo Berben y cols. en Society of chemical industry (en Internet el 16 de febrero de 2001) describen un procedimiento de reorganización enzimática en el que han hecho reaccionar la reacción hasta el equilibrio y obtienen una modificación al azar de la posición media del 18 %.

30 El documento WO96/14756 describe ER de mezclas grasas usando SP392 específica de sn-1 y sn-3 como catalizador de lipasa. El procedimiento se caracteriza porque la reorganización no tiene lugar más allá de un grado de conversión de la posición sn-1 y sn-3 del 90 % (pero siendo al menos el 20 %), lo que da como resultado tiempos de reacción más cortos. Sin embargo, no se observa modificación al azar en la posición sn-2.

35 Algunas lipasas raras que incluyen lipasas de *Candida cylindraceae* y de *Arthrobacter* son no específicas. Un procedimiento de ER usando esas lipasas administra una grasa reorganizada en todas las posiciones de glicéridos. Sin embargo, bien se ha encontrado que esas lipasas no son adecuadas para uso a una escala industrial y/o no se han aprobado para elaboración de comida.

40 El procedimiento descrito en el documento EP 652289 usa una lipasa específica de sn-1 y de sn-3 común. La reorganización requiere la presencia de una cantidad sustancial de al menos el 4 % en peso de diacilglicéridos (también designados como diglicéridos) en la mezcla de reacción. La grasa llega a reorganizarse en todas las tres posiciones, pero al final ello contiene muchos diglicéridos y otros subproductos, todos los cuales se necesitan para eliminarse por un procedimiento de purificación subsiguiente.

Se necesita un procedimiento de ER rentable que dé como resultado reorganización sustancial también en la posición media. Un procedimiento tal haría económicamente disponible un nuevo intervalo de grasas de triglicéridos modificadas de forma natural.

45 Es por lo tanto un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento de reorganización enzimática en el que tiene lugar una cantidad apreciable de reorganización en la posición intermedia. Un objeto adicional de la invención es un procedimiento con un tiempo de reacción corto. Otro objeto de la invención es proporcionar un procedimiento de reorganización enzimática sin el uso deliberado de diacilglicéridos.

Sorprendentemente uno o más de los objetos anteriormente mencionados se obtiene usando un catalizador con una actividad que excede de 250 IUN (22 g/(g · h)) según se mide en la iniciación del procedimiento.

50 Descripción de las figuras:

Fig. 1: representación de grado de conversión Re frente al tiempo.

Fig. 2: representación de modificación al azar en posición 2 (Ra) frente al tiempo de contacto.

Fig. 3: representación de modificación al azar en posición 2 (Ra) frente al tiempo Re > 1 indica que el tiempo de reacción ha excedido el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio con respecto a la modificación al azar de la

posiciones sn-1 y sn-3.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento de reorganización en el que los residuos de ácidos grasos en un resto de glicéridos se modifican al azar por encima de las posiciones terminales y medias, en las que el proceso se desarrolla a un grado de conversión en las posiciones terminales, Re , que varía desde 0,3 hasta 0,95 y en el que un grado de conversión en la posición media, Ra , varía desde 0,06-0,75 y en el que Ra es mayor de $0,32Re-0,08$,

el procedimiento comprende la exposición de una grasa de triglicéridos a un catalizador que comprende una lipasa caracterizada por que la lipasa es una lipasa de *Thermomyces lanuginosa* que tiene una actividad de al menos 250 IUN que corresponden a $22 \text{ g}/(\text{g} \cdot \text{h})$ en la iniciación del procedimiento y el contenido de agua en la mezcla de reacción es desde el 0,001 hasta el 0,1% en peso.

La IUN es una medida de la actividad de la enzima y se determina de acuerdo con el procedimiento como se describe más adelante en la sección experimental.

La actividad de la enzima puede medirse también con otro procedimiento, más conveniente. El procedimiento mide la cantidad de aceite convertida por la cantidad de catalizador en una hora ($\text{g}/(\text{g} \cdot \text{h})$). Una actividad de 250 IUN corresponde a $22 \text{ g}/(\text{g} \cdot \text{h})$. El procedimiento se describe en la sección experimental.

El procedimiento inventado tiene el beneficio con respecto a los procedimientos de reorganización de la técnica anterior que este proporciona una cantidad apreciable de reorganización en la posición media de los triglicéridos, este no necesita un exceso de diacilglicéridos y por lo tanto no necesita una etapa de purificación engorrosa al final. Además, el procedimiento de la invención tiene tiempos de contacto cortos.

El grado de conversión Re es la conversión real entre la posición sn-1 y la posición sn-3. Es el grado de conversión dividido en cierto momento por el estado de equilibrio (conversión al 100 % de posición sn-1 y sn-3). El grado de conversión de Ra es la conversión real de la posición sn-2 solamente. Es la conversión de la posición sn-2 a un cierto tiempo dividida por el estado de equilibrio en la posición sn-2 que es idéntica a la distribución de ácidos grasos de sn-2 de mezcla interesterificada químicamente. La determinación del grado de conversión Re y Ra de una muestra de grasa reorganizada se basa bien en su perfil de número de carbonos o bien en el cambio en fracciones molares de tipos específicos de triglicéridos. Las medidas se explican en la sección experimental.

El procedimiento de la presente invención es tal que incluso antes de lograr el equilibrio con respecto a la modificación al azar de sn-1 y sn-3 ($Re = 1$), se logra una modificación al azar sustancial de la posición media (Ra), que varía de 0,06-0,75. El procedimiento de la presente invención por lo tanto no se desarrolla más allá de un Re de grado de conversión de 0,95. Esto permite tiempo de residencia corto tal como se describe en el documento WO96/14756. Los procedimientos de la técnica anterior desarrollan hasta el equilibrio o más allá véase por ejemplo Berben y cols. en *Society of chemical industry* (en Internet el 16 de febrero de 2001), Torres y cols., *JAACS* vol. 79, n.º: 8 (2002), páginas 775-781, Torres y cols. *JOACS*, vol. 79, n.º: 7 (2002) páginas 655-661 y Zhang y cols. *JAACS* vol. 78, n.º: 1 (2001) páginas 57-64.

Con el procedimiento de la presente invención se evitan el tiempo de contacto largo y los tiempos de reacción largos que pertenecen a los procedimientos de la técnica anterior.

Además, incluso a tiempos de contacto cortos, es decir a grado de conversión bajo, ya tiene lugar una modificación al azar mínima en la posición de sn-2. Para Re entre 0,3 y 0,95, la reorganización de la posición media (Ra) es mayor de $0,32Re - 0,08$. Preferentemente Ra es al menos $0,32Re - 0,06$ e incluso más preferentemente Ra es al menos $0,32Re - 0,04$.

Preferentemente el grado de conversión Re es menor de 0,9, más preferentemente menor de 0,85. El grado de conversión Re es preferentemente al menos 0,35 e incluso más preferentemente al menos 0,4.

El suministrador de Lipozyme® TL IM recomienda un flujo de 1500 kg de aceite por hora por 400 kg de catalizador en un reactor de lecho empacado. Esto da como resultado tiempo de residencia de 32 minutos. Un descripción general de este procedimiento se puede encontrar también en Nielsen, *Oils and Fat international*, vol. 18, n.º: 4 (2002).

En contraste la presente invención donde la enzima tiene una actividad de al menos 250 IUN que corresponden a $22 \text{ g}/(\text{g} \cdot \text{h})$, permite el procesamiento de 4400 kg de aceite por hora empleando la misma cantidad de enzima que da como resultado un tiempo de residencia de solamente 11 minutos. Sin embargo, aún tiene lugar una cantidad sustancial de modificación al azar en la posición media.

Adecuadamente durante la primera hora de dirigir al aceite a través de un reactor de lecho empacado el tiempo de residencia del aceite en el lecho de catalizador de Lipozyme® TL IM de la presente invención preferentemente es menor de 25 minutos, más preferentemente menor de 20 minutos y aún más preferentemente menor de 15 minutos. Estos tiempos de residencia son los tiempos en el comienzo de la reorganización cuando el catalizador recién preparado está presente. En el curso del procedimiento el catalizador gradualmente pierde actividad y se necesitan

tiempos de residencia más largos para el mantenimiento del grado de conversión Re. Los tiempos de residencia más largos se pueden llevar a cabo comúnmente reduciendo el flujo del aceite a través del reactor de lecho catalizador. Para la presente invención, incluso cuando la actividad del catalizador en es curso de la reacción está reducida y el flujo está ajustado, aún la modificación al azar de la posición sn-2 está a una velocidad apreciable (véase Fig. 2).

- 5 La presente invención puede usarse también en un procedimiento por lotes. Sin embargo en lugar del tiempo de residencia corto o del flujo de aceite alto, se pueden usar concentraciones bajas de un catalizador. En comparación con los procedimientos de la técnica anterior donde la concentración del catalizador es el 10 % en peso, la concentración del catalizador de la presente invención en un procedimiento por lotes puede variar desde el 0,05-9 % en peso, más preferentemente desde el 0,05-5 % en peso y aún más preferentemente 0,05-3 % en peso calculado en la mezcla de reacción.

10 El presente procedimiento usa preferentemente la lipasa de *Thermomyces lanuginosa* que contiene Lipozyme® TL IM de catalizador ER que está comercialmente disponible de NOVOZYMES, Dinamarca, como un agregado de enzima y sílice. La actividad catalizadora de IUN se define por este procedimiento para medir por NOVOZYMES, según se describe más adelante en la sección experimental. Alternativamente la actividad se puede medir por otra medida de actividad conveniente que se describe también en la sección experimental.

15 En la técnica de la reorganización enzimática se comunica que la presencia de sílice cataliza la modificación al azar de la posición media. Sin desear comprometerse con una teoría, se piensa que la sílice retiene el agua y que el agua hidroliza los triglicéridos a diacilglicéridos que catalizan la reorganización en la posición de sn-2. Así, en los procedimientos de la técnica anterior, más sílice conduce a más diacilglicéridos, que conducen a más modificación al azar de sn-2. Sin embargo, cuando se usa la lipasa activa de acuerdo con la presente invención, se ha encontrado sorprendentemente que menos sílice conduce a un incremento de modificación al azar en la posición media.

20 Un beneficio relacionado con la economía del presente procedimiento es que este no necesita la purificación final engorrosa a partir de diglicéridos como es necesario para el procedimiento del documento EP 652289.

25 Partiendo de la técnica anterior el catalizador de Lipozyme® TL IM se dispensa con agua y después se añade a la mezcla de reacción.

El presente procedimiento se lleva a cabo con contenido relativamente bajo de agua. La cantidad de agua está en el intervalo del 0,001-0,1 % en peso, preferentemente en el intervalo del 0,001-0,05 % en peso.

30 La medida del contenido de agua se determina por medio de valoración de Karl Fischer estándar, pero no más pronto de 30 minutos después de poner en contacto el catalizador con la materia prima en un reactor por lotes. Cuando se procesa en un reactor de lecho empaquetado, la medida de agua se hace en una muestra de aceite tomada corriente abajo del reactor pero no más pronto de 30 minutos después de que el aceite haya comenzado a fluir a través del lecho catalizador con el fin de permitir medidas fiables.

Adecuadamente la temperatura de la mezcla de reacción es desde 40 hasta 85 °C, preferentemente desde 45 hasta 80 °C, más preferentemente desde 50 hasta 75 °C.

35 El procedimiento de la invención se puede aplicar a una diversidad de mezclas de grasas de triglicéridos, pero es más apropiado para mezclas de grasas de triglicéridos en las que hay una diferencia en la distribución de ácidos grasos sobre la posición de sn-1, sn-3 y sn-2 de la molécula de glicéridos.

El procedimiento de la presente invención es particularmente adecuado para una materia prima que comprende

- 40 - cualquier mezcla que comprende un aceite líquido y un aceite hidrogenado, preferentemente el aceite hidrogenado está totalmente hidrogenado ya que conduce a ácidos grasos no trans, o
- cualquier grasa de triglicéridos que no se haya sometido a hidrogenación, o,
- una mezcla de grasa de palma o de fracción de grasa de palma y una grasa láurica o una fracción de grasa láurica.

45 Se prefiere la mezcla de grasa de palma o de fracción de grasa de palma y una grasa láurica o una fracción de grasa láurica.

50 La invención también comprende el uso de un agregado de lipasa de *Thermomyces lanuginosa* y sílice como catalizador para reorganizar parcialmente residuos de ácidos grasos de una grasa de triglicéridos a un grado de conversión de las posiciones terminales Re de 0,3 a 0,95, que comprende una reorganización de la posición media a un grado de conversión Ra de 0,06 a 0,75, en el que el agregado de lipasa/sílice tiene una actividad de al menos 250 IUN (22 g/(g · h)), preferentemente al menos 300 IUN (25,5 g/(g · h)), más preferentemente al menos 350 IUN (29 g/(g · h)).

La invención también comprende una grasa de triglicéridos obtenible por reorganización enzimática a partir de la que el grado de conversión de las posiciones terminales Re es desde 0,3 hasta 0,95 y a partir de la que el grado de

conversión de la posición media de la Ra de triglicéridos es desde 0,06 hasta 0,75, ya que Ra es mayor de 0,32Re-0,08, preferentemente es mayor de 0,32Re-0,06, más preferentemente mayor de 0,32Re-0,04.

Debido a que el procedimiento de reorganización enzimática de la presente invención es diferente de la interesterificación química usada a menudo y que el procedimiento de conversión enzimática se desarrolla hasta conversión del 100 % en la posición sn-1 y la posición sn-3, las grasas resultantes del procedimiento de reorganización enzimática tienen propiedades diferentes que aquellas obtenidas por la interesterificación química convencional y el procesamiento de conversión enzimática que se desarrolla hasta conversión del 100 % en la posición sn-1 y sn-3 (como Berben y cols. en Society of chemical industry (en Internet el 16 de febrero de 2001), Nielsen, Oils and Fat international, vol. 18, n.º: 4 (2002), Torres y cols., JAOCS vol. 79, n.º: 8 (2002) páginas 775-781, Torres y cols. JOACS, vol. 79 n.º: 7 (2002) páginas 655-661 y Zhang y cols. JAOCS vol. 78, n.º: 1 (2001) páginas 57-64).

Preferentemente la grasa de triglicéridos se obtiene por reordenamiento enzimático del que el grado de conversión de las posiciones terminales Re es menor de 0,9, preferentemente menor de 0,85. Preferentemente el grado de conversión Re es al menos 0,35, preferentemente al menos 0,4.

Las grasas de acuerdo con la invención son adecuadas para la preparación de composiciones alimentarias, particularmente para la preparación de una fase grasa de constitución que comprende un aceite líquido y una grasa de estructuración. Tales fases grasas se usan ampliamente para la preparación de emulsiones continuas de grasa usadas en la elaboración de por ejemplo dispersiones.

Debido a un procedimiento de reorganización enzimática calificado como natural, esas grasas también deben calificarse como naturales.

El procedimiento de acuerdo con la invención permite la producción de grasas enriquecidas con triglicéridos que tienen un residuo de ácido graso saturado en la posición media. Tales grasas se usan en aplicaciones alimentarias donde el comportamiento de cristalización de la fase lipídica es crítico para la calidad final del producto. Dichos triacilglicéridos influyen fuertemente tanto en la estabilidad de los productos finales contra condiciones de temperatura adversa como en los parámetros de procedimientos relacionados con la cristalización en base a las propiedades de cristalización intrínsecas de la grasa.

Así los procedimientos de acuerdo con la invención permiten la producción de grasas como las del documento EP 831711 con granulosis baja a pesar de tener un contenido de ácido palmítico alto. Aunque la materia prima es una mezcla con aceite de palma o una fracción con aceite de palma, la fase grasa reorganizada no causa granulosis en dispersiones de emulsiones de grasa continua preparadas con tal fase grasa, o al menos la granulosis está sustancialmente reducida.

La invención también comprende los productos alimentarios en los que se incorpora una grasa que se obtiene por el procedimiento de la presente invención.

La presente invención tiene el beneficio con respecto a los procedimientos de reorganización enzimática de la técnica anterior de que este tiene tiempo de reacción mucho más corto, permitiendo así un procedimiento económicamente viable. Además con el procedimiento de la invención es posible una cantidad sustancial de modificación al azar en la posición sn-2, mientras que se mantiene aún la naturalidad de la grasa. Además, debido a que ya hay una cantidad sustancial de modificación al azar de la posición media a tiempo de reacción corto y de grado de conversión bajo en la posición de sn-1 y sn-3, el procedimiento de reorganización puede detenerse en diversos momentos, dando como resultado grasas con diferentes propiedades. Alguien puede escoger el grado de conversión, Re y Ra, deteniendo la reacción a un cierto tiempo y por lo tanto ajustando finamente la propiedad de la grasa obtenida.

Sección experimental

Determinación del tiempo de residencia

El tiempo de residencia en horas se determina tomando el volumen del aceite inclusivo del lecho de catalizador, sustrayendo el volumen del catalizador y dividiendo la diferencia por el volumen de aceite que atraviesa el lecho en una hora.

Establecer la actividad de IUN de catalizador de lipasa

1. Principio

El procedimiento se proporciona por el suministrador de catalizador y se basa en interesterificación de triglicéridos por una lipasa inmovilizada. La conversión de tristearina en un sustrato compuesto por el 27 % p/p de aceite de semilla de soja totalmente hidrogenado y 73 % p/p de aceite de soja refinado, blanqueado y desodorizado a 70 °C y sometido a agitación a 200 rpm se usa para cuantificar la actividad del catalizador. La concentración de tristearina se determina usando un procedimiento analítico basado en HPLC.

2. Especificidad y sensibilidad

Los componentes que tienen el mismo tiempo de retención que tristearina en el procedimiento cromatográfico usado causarán una sobreestimación de la concentración de tristearina.

3. Definición de unidades

- 5 La actividad de interesterificación se define como la velocidad de conversión inicial para tristearina en condiciones convencionales. 1 IUN corresponde a una velocidad de conversión de 0,01 g de tristearina//minuto/gramo de catalizador.

4. Aparatos

Balance analítico

- 10 Agitador de baño de agua

Pipetas Pipeta de desplazamiento positivo para tomar muestras de aceite (debido a la viscosidad alta del líquido). Pipetas estándar (por ejemplo Finnpiquette) para las otras etapas en el análisis.

Sistema de HPLC incluyendo los siguientes módulos: bomba de HPLC, sistema de inyección y calentador de columna.

Detector de dispersión lumínica, por ejemplo Sedex 55.

- 15 Columna de HPLC RP 18e (5 mm), LiChroCart 250-4.

Adquisición de datos: los datos pueden adquirirse y procesarse usando software cromatográfico.

Condiciones analíticas

Temperatura de columna: 40 °C

Flujo: 1,5 ml/min.

- 20 Fase móvil: La fase móvil consiste en 50 % volumen/volumen de acetonitrilo, calidad HPLC y de 50 % volumen/volumen de diclorometano, calidad HPLC.

Volumen de inyección: 20 µl.

Tiempo de funcionamiento: al menos 11 minutos.

Temperatura de la columna: 40 °C (± 2 °C)

- 25 Detector: 40 °C (± 2 °C), presión de nitrógeno 230.000 pascales (2,3 bar).

Sensibilidad del detector: Ganancia 6

5. Reactivos y sustratos**Productos químicos**

Tristearina. Calidad SIGMA, aprox. el 99 %.

- 30 **Soluciones**

Sustrato (20 gramos):

27 % p/p de aceite de semilla de soja totalmente hidrogenado (administrado por ADM, Illinois, EE.UU.)

73 % p/p de aceite de semilla de soja refinado, blanqueado y desodorizado (administrado por ADM, Illinois, EE.UU.)

Catalizador (2 gramos): Las muestras se acondicionaron a $a_w = 0,3$ durante al menos 24 horas.

- 35 **6. Muestras y estándares**

Estándares

Una curva estándar de tristearina se hace en el intervalo de concentración desde 0,25 hasta 2,0 mg/ml.

Control de nivel

Muestra de referencia: Se usa Lipozyme® TL IM de referencia PPW6503-3, fracción de tamaño de partícula 425-500

µm (determinación única).

7. Procedimiento:

5 Se elabora como sustrato una mezcla de 27 % p/p de aceite de semilla de soja totalmente hidrogenado (FH SBO) y 73 % p/p de aceite de semilla de soja refinado, blanqueado y desodorizado (RBD SBO). La mezcla de aceite se calienta a 80 °C en un baño de aceite y se mezcla bien.

La mezcla de aceite se pesa aparte en matraz cónico de 100 ml con un tapón de tuerca de botella de vino, aproximadamente 20 gramos en cada una. El peso preciso se escribe con 2 decimales. Los matraces (lotes) se sitúan en el baño de agua agitador a 70 °C y 200 rpm.

10 Una cantidad catalizadora que corresponde a aproximadamente el 10 % de la cantidad de aceite se pesa aparte (aproximadamente 2 gramos). El peso preciso del catalizador se determina con 2 decimales.

Cuando la mezcla de aceite es homogénea, se toma una muestra a tiempo cero. Se toman 100 µl del aceite con una pipeta de desplazamiento positivo (Gilson microman). La punta de la pipeta se limpia con un kleenex para retirar mezcla de aceite del exterior y la mezcla se deposita en un vial de HPLC (tipo BROWN 12 x 32 mm con Silicona/PTFE Septa).

15 La cantidad pesada de catalizador se añade a los matraces que contienen la mezcla de aceite y las muestras se toman a los tiempos: 15, 30, 45 y 60 minutos. Todas las muestras son de 100 µl. Las muestras se almacenan en un congelador hasta el análisis de HPLC.

20 Las muestras en los viales de HPLC se diluyen con 900 µl de diclorometano. Esta solución se mezcla en un agitador de vórtice, antes de que se haga una dilución adicional de 100 µl a 900 µl de diclorometano (dilución total de 100x). Después de una mezcla adicional esta muestra se está analizando por HPLC.

Las muestras diluidas se analizaron por HPLC-ELSD.

La respuesta frente a concentración de los estándares de tristearina se ajustó a un modo exponencial.

8. Cálculo

La concentración de tristearina en las muestras se calcula por el uso de la curva estándar.

25 La conversión de (el decrecimiento en) concentración de tristearina frente al tiempo se ajusta a un modelo exponencial, por estimación de parámetros no lineal. El modelo es:

$$C_{Tristearina}(t) = C_{0,est} \cdot \exp(-k_{est} \cdot t)$$

Donde

$C_{tristearina}(t)$ = es la concentración de tristearina en la mezcla de reacción a tiempo t.

30 $C_{0,est}$ = concentración inicial de tristearina (parámetro estimado)

k_{est} = velocidad constante (parámetro estimado)

t = tiempo de reacción

A partir de la constante de velocidad estimada, k_{est} , la actividad en condiciones convencionales, la actividad en IUN, se puede calcular de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$IUN/g = k_{est} \cdot C_{0,std} \cdot 100 \cdot \frac{W_{std}}{W} \cdot \frac{M_{aceite}}{M_{aceite,std}}$$

35 $C_{0, std}$ = concentración de partida en condiciones convencionales.

W_{std} = peso de catalizador en condiciones convencionales (2g)

W = peso real de catalizador

M_{aceite} = peso real de aceite

40 $M_{aceite, std}$ = peso de aceite en condiciones convencionales (20 g)

Determinación de actividad en g/(g · h)

Calcular actividad

Sustratos:

50 g de fracción mp 53 de de estearina de palma fraccionada pura de calidad blanqueada y desodorizada refinada

- 5 50 g de aceite de palmiste fraccionado puro de calidad blanqueado y desodorizado refinado tal que un grado de conversión Re entre 0,2 y 0,4 se obtiene en aproximadamente 1 hora. Algunos experimentos con diferentes cantidades de enzima son usualmente suficientes para encontrar la cantidad correcta de enzima. Para una enzima con una actividad de 455 IUN/38 g/(g · h) se obtiene un grado de conversión Re entre 0,2 y 0,4 a aproximadamente 1 hora con una cantidad del 1 % en peso.

10 **Procedimiento:**

Los dos aceites se mezclan bien conjuntamente en un recipiente de reacción cerrado y se llevan a 70 °C en agitación. El catalizador enzimático se añade al sustrato de aceite y la mezcla se agita a 70 °C. Se toma una muestra de aceite después de 1 hora, asegurando que no está presente ningún catalizador enzimático y después cada hora hasta que la reacción está en equilibrio.

- 15 Se hace un trazado de grado de conversión Re frente al tiempo como se muestra en la figura 1.

Se determinó después la actividad de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad} = -\ln(1-x) * \frac{\text{cantidad de aceite (g)}}{(\text{cantidad cat. (g)} \cdot t \text{ (h)})}$$

donde,

- 20 x es el grado de conversión, Re (determinado según se describe) y es un punto después de aproximadamente 1 hora cuando Re está entre 0,2 y Re = 0,4. Sin embargo Re no debería estar nunca por encima de 0,4.

t es el tiempo

la cantidad de aceite y catalizador está en gramos y son parámetros conocidos.

Se debería de tener cuidado de que el punto x se tome en la parte lineal de la curva y no demasiado cerca del punto de partida.

25 **Determinación de Re y Ra**

La determinación del grado de conversión Re de una muestra de grasa reorganizada se basa bien en su perfil de número de carbonos o bien en el cambio en fracciones molares de tipos específicos de triglicéridos. La determinación se desarrolla como sigue:

- 30 Para una muestra de grasa a ser reorganizada se analiza la composición de ácidos grasos general, la composición de ácidos grasos en la posición media y la composición de triglicéridos. Se usan procedimientos de análisis comunes que comprenden análisis de FAME, el procedimiento de CGL/número de átomos de carbono y el procedimiento en fase de HPLC/plata son como se describe por ejemplo en los documentos EP 78568, EP 652289, JAOCS, (1991), 68 (5), 289-293 y Hammond E.W.J., Chromatography, 203, 397, 1981.

- 35 La fracción molar ($pA_{sn1,3}$) de cualquier residuo de ácidos grasos (A) específico en una posición terminal (bien la posición sn-1 o bien la posición sn-3, posiciones que se asume que son idénticas) se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$pA_{sn1,3} = (3 \cdot pA_{total} - 1 \cdot pA_{sn2})/2$$

- 40 donde pA_{total} designa la aparición total de un residuo de ácidos grasos A en la mezcla de grasas y pA_{sn2} designa la aparición en la posición 2 del residuo de ácido graso A situado. Para todos los residuos de ácidos grasos que tienen una fracción molar mayor de 0,002 se establece el valor $pA_{sn1,3}$. La distribución de estas fracciones molares se normalizaría a 1,0.

El perfil de triglicéridos de una grasa de triglicéridos totalmente modificada al azar se calcula por estadísticas simples conocidas por el experto en la técnica. La fracción molar $p(ABB)$ del triglicérido ABB, por ejemplo, se calcula usando la fórmula: $p(ABB) = 2 \cdot PA_{sn1,3} \cdot PB_{sn2} \cdot PB_{sn1,3}$

Generalmente, el número de átomos de carbono de una molécula de triglicérido específica es el número total de átomos de carbono en sus tres residuos de ácidos grasos. El perfil de número de átomos de carbono de una mezcla de grasas particular consiste en los porcentajes de aparición de todos los números de átomos de carbono de la mezcla de grasas.

- 5 El perfil de número de átomos de carbono de una mezcla de grasas se deriva de su composición de triacilglicéridos (la colección de todos los triglicéridos de la fracción molar).

A partir del perfil de triacilglicerol de la mezcla de grasas se puede derivar fácilmente el perfil de número de átomos de carbono.

- 10 Se establece el perfil de número de átomos de carbono por análisis para la mezcla de grasas de partida y para una muestra parcialmente reorganizada tomada de una mezcla de reacción. El perfil de número de átomos de carbono de la mezcla de grasas totalmente modificada al azar en sn-1 y sn-3 se encuentra por un cálculo estadístico del perfil de triglicéridos según se describe anteriormente.

El grado de conversión de la muestra de grasas parcialmente modificada al azar se calcula como sigue:

- 15 Para cada número de átomos de carbono en el intervalo de 30-60 las diferencias se calculan entre la fracción molar en el comienzo de la reacción y la fracción molar en la modificación al azar de sn-1 y sn-3 total (equilibrio). La suma de los valores (absolutos) de estas diferencias (cambio absoluto del 100 % de los números de átomos de carbono) define reorganización del 100 % de la mezcla de grasas.

- 20 Del mismo modo para una mezcla específica tomada a partir de una mezcla de reacción para cada número de átomos de carbono entre 30 a 60 se calculan las diferencias de la fracción molar en el comienzo de la reacción y la fracción molar real cuando se toman muestras del producto de reacción. De nuevo se acumulan los valores absolutos de estas diferencias. La suma es el cambio absoluto del número de átomos de carbono hasta el momento de tomar muestras.

Para la muestra específica el grado de conversión $Re = (\text{cambio absoluto real de número de átomos de carbono}) / (\text{cambio absoluto al 100 \% de números de átomos de carbono})$.

- 25 Esta ecuación se aplica para productos de triglicéridos donde el cambio absoluto al 100 % de números de átomos de carbono es al menos 0,15. Si no, el grado de conversión Re debería determinarse de un modo alternativo:

Para cada triglicérido del tipo H3, H2O y H2L (donde H indica residuos de ácidos grasos de ácido palmítico o esteárico, O de ácido oleico y L de ácido linoleico) la fracción molar se establece por análisis. Para cada uno de estos triglicéridos se calcula el cambio absoluto de la fracción molar al comienzo de la reacción y en modificación al azar en sn-1 y sn-3 total. La suma de los valores absolutos de estos cambios pertenece al estado de conversión al 100 %.

- 30 Para una muestra específica tomada durante la reacción del procedimiento la diferencia entre la fracción molar al comienzo de la reacción y el estado actual del producto de la reacción se calcula para los mismos triglicéridos seleccionados. Los valores absolutos de las diferencias en fracción molar se acumulan. La suma define reorganización del 100 % de la mezcla de grasas.

El grado de conversión Re de la muestra específica se sigue de la ecuación:

- 35 **$Re = (\text{cambio real de triacilglicéridos}) / (\text{cambio absoluto al 100 \% de triacilglicéridos})$.**

Determinación de Ra , el grado de reorganización en la posición media, se desarrolla como sigue:

- 40 Para la materia prima inicial y para una muestra tomada a partir de la mezcla de reacción primero se estableció la aparición total de residuos de ácidos grasos y la aparición de residuos de ácidos grasos situados en la posición 2 del triglicérido se estableció usando GLC-FAME y análisis de la posición 2. Para procedimientos véanse las referencias descritas anteriormente.

- 45 Para cada ácido graso que se da en la grasa de triacilglicéridos a un nivel molar de al menos 0,002 se calcula la diferencia absoluta de su fracción molar de Sn-2 en el comienzo de la reacción y se calcula su fracción molar en la mezcla de reacción, en la que la última mezcla es igual a la grasa modificada al azar químicamente. La suma de los valores absolutos de estos cambios ($Fa - Sn2 - 100 \%$) para todos los ácidos grasos seleccionados define el estado de grado del 100 % de aleatoriedad de Sn-2.

- 50 Para una muestra tomada durante la reacción de procedimiento de la misma manera el cambio absoluto entre la fracción molar al comienzo de la reacción y el estado real del producto de la reacción se calcula para cada uno de los ácidos grasos seleccionados. La suma de los valores absolutos de estos cambios ($Fa - Sn2 - \text{real}$) es el cambio absoluto real de ácidos grasos en la posición Sn-2.

Para la muestra específica el valor de Ra se sigue de la ecuación:

$$Ra = (Fa-Sn2-real)/(Fa-Sn2-100 \%)$$

Ejemplo 1

Se mezclaron conjuntamente 60 g de aceite de palma y 40 g de aceite de palmiste en un recipiente de reacción de 100 ml y se calentaron a 70 °C. Se añadió 1 % en peso de Lipozyme® TL IM (actividad 455 IUN, 38 g/(g · h)) a la mezcla y esta se agitó a 70 °C. Se tomaron muestras a intervalos y el grado de conversión Re y el grado de conversión Ra se determinaron de acuerdo con los procedimientos descritos en otros lugares en esta memoria descriptiva por medio de establecer cambios en la composición de ácidos grasos en la posición media.

En los grados de conversión Re de 0,85 y 0,5, se han encontrado los siguientes grados de reorganización de la posición media:

TABLA I

Grado de conversión Re	Grado de conversión Ra
0,85	0,28
0,5	0,1

Ejemplo 2

Se ha repetido el Ejemplo 1 pero usando un catalizador lipasa Lipozyme® TL IM de baja actividad y el 10 % de la concentración del catalizador según se usa en la técnica anterior.

Ejemplo 3

Se ha repetido el Ejemplo 1 usando el mismo catalizador Lipozyme® TL IM de alta actividad, pero con la misma concentración de catalizador alta como se usa en el ejemplo de comparación 2, permitiendo un tiempo de contacto que es mucho más corto que el necesario en los ejemplos 1 y 2.

TABLA II:

ER usando catalizador Lipozyme® TL IM	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3
Concentración de catalizador (% en peso)	1	10	10
Agua (% en peso)	0,013	0,025	0,024
Tiempo de reacción (h)	5,25	2,75	0,60
Actividad (IUN)	455	160	455
Actividad g/(g · h)	38	18	38
Conversión Re	0,85	0,85	0,85
Aleatoriedad de Ra	0,28	0,08	0,21
Ra > 0,32Re - 0,08	sí	no	sí
Ra > 0,32Re - 0,06	sí	no	igual
Ra > 0,32Re - 0,04	sí	no	no

El catalizador Lipozyme® TL IM de alta actividad (ejemplo 1) causa a una concentración baja el mismo Re de conversión que el catalizador de baja actividad de la técnica anterior del Ejemplo 2 pero acompañado por una reorganización alta de la composición media. Cuando se incrementa la concentración catalizadora de acuerdo con el Ejemplo 3 se obtiene el mismo efecto que el Ejemplo 1 con un tiempo de contacto mas corto, lo que permite un rendimiento más alto.

Ejemplos 4-6

Los Ejemplos 1-3 se ha repetido en las mismas condiciones, respectivamente, pero usando tiempos de contacto más cortos. Los tiempos de contacto más cortos dan como resultado un grado bajo de Re de conversión, pero incluso a estos grados de conversión más bajos se observa la misma reorganización relativamente alta en la posición media.

5

TABLA III

ER usando catalizador Lipozyme® TL IM	Ejemplo 4	Ejemplo 5	Ejemplo 6
Concentración de catalizador (% en peso)	1	10	10
Agua (% en peso)	0,013	0,025	0,024
Actividad (IUN)	455	160	455
Actividad g/(g · h)	38	18	38
Conversión Re	0,4	0,4	0,4
Aleatoriedad de Ra	0,08	0,02	0,08
Ra > 0,32Re - 0,08	sí	no	sí
Ra > 0,32Re - 0,06	sí	no	sí
Ra > 0,32Re - 0,04	no	no	no

Ejemplo 7 Granulación en dispersiones

El endurecedor A se preparó por el siguiente procedimiento:

10 Se mezclaron conjuntamente 50 % en peso de aceite de palma y 50 % en peso de aceite de palmiste en un recipiente de reacción y se añadió a la mezcla 0,53 % en peso de Lipozyme® TL IM (actividad 38 g/(g · h)). Esto se agitó a 70 °C hasta que se alcanzó un Re de conversión de 0,63. La reorganización de la Ra de posición sn-2 se determinó como que es 0,18.

Se preparó una mezcla de grasas a partir de lo siguiente:

- 15 ■ 42 % en peso de endurecedor A
- 5 % en peso de estearina de aceite de palma (62 % en peso) fraccionado en seco interesterificado con aceite de palmiste (38 % en peso)
- 53 % en peso de aceite de colza

20 Se preparó una fase grasa mezclando 99,7 partes de mezcla de grasas, 0,2 partes de lecitina y 0,1 partes de monoglicéridos (Hymono 8903). Una fase acuosa se preparó a partir de 96,3 partes de agua, 2,2 partes de suero lácteo ácido y 1,5 partes de sal. El pH se ajustó a 4,6 por medio de adición de ácido cítrico. Se combinaron 80 partes de fase grasa y 20 partes de fase acuosa y se procesaron de una manera convencional usando un rotador, obteniéndose una dispersión que se empaqueta en botes. Las dispersiones se produjeron usando una secuencia de AAC. La temperatura después de la segunda unidad A fue 8 °C y después de la unidad C fue 16 °C. Las unidades A se operaron a 600 rpm y la unidad C a 230 rpm. El tiempo de residencia en la unidad C fue aproximadamente 90 segundos. El

25

Por comparación, las margarinas se fabricaron usando una mezcla de grasas en la que:

- i. Se usó endurecedor B (Re 0,62, Ra 0,10), que se preparó con Lipozyme® TM IM de actividad 18 g/(g · h)
- ii. Se usó endurecedor C (Re 0,60, Ra 0,05) que se preparó con Lipasa D (Rhizopus oryzae en transportador Accurel).

30 Todo lo demás se mantuvo igual.

Un panel de expertos juzgó los productos en lo que respecta a la presencia de granos tropicales.

En margarinas que se han fabricado con endurecedor A, los granos fueron escasos y apenas apreciables.

En margarinas que se han fabricado con endurecedor B, los granos fueron patentes a niveles inaceptables, creando un defecto de producto intolerable.

5 En margarinas que se han fabricado con endurecedor C, los granos fueron claramente abundantes por todo el producto y de este modo un defecto inaceptable claro.

TABLA IV

	Catalizador enzimático		
	Lipozyme® TL IM (endurecedor A)	Lipozyme® TL IM (endurecedor B)	Lipasa D (endurecedor C)
Actividad (g/(g · h)) IUN	38 455	18 160	53 -
Concentración en % en peso	0,53	1,03	0,34
Re	0,63	0,62	0,60
Ra	0,18	0,10	0,05
Presencia de granos en el producto final	Escasa, aceptable	Numerosa, inaceptable	Abundante, inaceptable

10 En el producto fabricado con el procedimiento de la presente invención endurecedor A, donde Ra es más alto, no se detectó ningún grano tropical o se detectaron algunos. Por el contrario, los productos fabricados bien con lipasa de actividad baja (endurecedor B) o bien con lipasa específica de sn-1 y sn-3 (endurecedor C) dan lugar a niveles inaceptables de granos tropicales.

Ejemplo 8: Granulosidad

15 Se mezclaron conjuntamente aceite de palma al 60 % en peso y aceite de palmiste al 40 % en peso en un recipiente de reacción y se añadió a la mezcla 0,9 % en peso de Lipozyme® TL IM (455 IUN de actividad, 38 g/(g · h)). Esto se agitó a 70 °C dando endurecedor A con Re 0,68. Ra se determina que es 0,22. Se elaboró endurecedor B con Re 0,26 y Ra 0,08 y Lipozyme® TL IM al 0,6 % en peso (455 IUN de actividad, 38 g/(g · h)).

Se preparó una mezcla de grasas a partir de lo siguiente:

endurecedor A al 42 % en peso

5 % en peso de estearina de palma interesterificada con aceite de palmiste

20 aceite de colza al 53 % en peso

Se preparó una fase grasa mezclando 0,9971 partes de mezcla de grasas, 0,0020 partes de lecitina y 0,0009 partes de monoglicérido.

25 Se preparó una fase acuosa a partir de 0,9630 partes de agua, 0,0220 partes de polvo de suero lácteo ácido y 0,0150 partes de sal y ácido cítrico a un pH de 3,8. Se combinaron 80 partes de fase grasa y 20 partes de fase acuosa y se procesaron de una manera convencional usando un rotador, obteniéndose una dispersión que se empaqueta en botes. Las dispersiones se produjeron usando una secuencia de ACAA. La temperatura después de la primera unidad A fue 15 °C, después de la unidad C 18 °C y después de la última unidad A 10 °C. Las unidades A se operaron a 600 rpm y la unidad C a 200 rpm. El tiempo de residencia en la unidad C fue aproximadamente 90 segundos. El producto se almacenó a 5 °C durante 5 semanas. No se desarrollaron granos tropicales en el producto.

30 Para comparación, se fabricaron margarinas usando una mezcla de grasas en la que se usó endurecedor B.

En productos en los que se usó endurecedor A, no se desarrollaron granos tropicales.

En productos en los que se usaron los endurecedores B, se identificaron los granos tropicales después de 5 semanas de almacenamiento a 5 °C.

TABLA V

	Endurecedor	
	A	B
Actividad en IUN	455	455
g/(g · h)	38	38
Re	0,68	0,26
Ra	0,22	0,08
Granos tropicales	No	Sí

5 Ejemplo 9: Ra frente a tiempo de reacción

Siguiendo el mismo procedimiento que se destaca en el Ejemplo 1, se llevaron a cabo cuatro experimentos en un reactor por lotes. En la tabla IV se dan el tipo de enzima, su actividad y su concentración en el reactor.

Tabla VI

experimento	Lipasa	Concentración (p/p) %	Actividad g/g/h
1	Lipozyme® TL IM	2,4	38
2	Lipozyme® TL IM	10	38
3 comparativo	Lipozyme® TL IM	10	18
4 comparativo	Lipasa D	10	53

- 10 La mezcla de reacción de nuevo consta de 60 partes de aceite de palma y de 40 partes de grasa de palmiste. Las cuatro reacciones se sometieron a seguimiento estrechamente a lo largo del tiempo. Se tomaron y se analizaron un número de muestras. La última muestra se tomó después de tiempo de reacción de 10 horas. A partir de los datos analíticos el grado de conversión (Re) y la modificación al azar de la posición sn-2 (Ra) se derivaron como se destaca en el texto. La figura 3 ilustra la evolución de Re y Ra a lo largo del tiempo para las diferentes reacciones.
- 15 La gráfica muestra claramente que para la Lipasa D (experimento 4) y la Lipozyme® TL IM de baja actividad (experimento 3) las cargas pequeñas en la composición de la posición de sn-2 están progresando de forma lineal con el tiempo. Esto está en línea con la técnica anterior que establece el efecto de migración de acilo en glicéridos de ácidos grasos parciales (véanse Torres y cols., JAOCS vol. 79, n.º: 8 (2002) p. 775-781, Torres y cols. JOACS, vol. 79, n.º: 7 (2002) p. 655-661 y Zhang y cols. JAOCS vol. 78, n.º: 1 (2001) p. 57-64).
- 20 En contraste con esto, la Lipozyme® TL IM con una alta actividad y un nivel de concentración del 10 % (p/p) (experimento 2) proporciona modificación al azar considerablemente incrementada de la modificación al azar de la posición sn-2 en el mismo tiempo de reacción. Debería señalarse que en comparación con el experimento 4 (lipasa D) estos tiempos están correspondiéndose realmente con grados prácticamente idénticos de conversión con respecto a la modificación al azar de las posiciones sn-1 y sn-3 (Re). Las formas diferentes de las curvas ilustran también esto.
- 25 También el experimento 1, con una concentración de Lipozyme® TL IM más baja muestra un comportamiento claramente diferente que los experimentos comparativos (3 y 4). Cuando se comparan los experimentos 1 y 2 alguien encuentra que para un grado dado de conversión (la modificación al azar de las posiciones sn-1 y sn-3 (Re)) el experimento emplea una concentración baja del catalizador enzimático. Realmente proporciona grados más altos de modificación al azar de la posición sn-2 (Ra). Este incremento en Ra está coincidiendo con la presencia de menos
- 30 sílice en el recipiente de reacción.

Como demuestra claramente este ejemplo, el procedimiento que los autores de la presente invención han encontrado es sustancialmente diferente de los procedimientos comunicados en la técnica anterior.

Ejemplo 10: RA frente tiempo de contacto

Se mezclan bien 60 partes de aceite de palma con 40 partes de aceite de palmiste a 70 °C y se añadieron a un tanque de alimentación de un sistema de reactor de lecho empacado (PBR), del cual la temperatura es también 70 °C.

5 Se carga un PBR de 20 ml de volumen con 3 g de Lipozyme® TL IM (Actividad IUN 455, 38 g/(g · h)) dando un volumen de lecho catalizador de 7 ml.

El caudalímetro, que controla el flujo de aceite a través del reactor se ajusta a 35 g/hora, que corresponde to a un tiempo de residencia de alrededor de 8 minutos, con el fin de lograr un Re de aproximadamente 0,6. Las muestras se tomaron a intervalos regulares y el flujo se ajustó de acuerdo con ello con el fin de compensar la desactivación de la enzima y así retener un Re de 0,6.

10

TABLA VII

Actividad relativa (%)	Re	Ra	Flujo (g/h)	Tiempo de residencia (minutos)
100	0,58	0,15	35	8
42	0,63	0,15	13	22
32	0,62	0,14	10	28
9	0,64	0,12	3	105

Del mismo modo, se llevó a cabo un segundo experimento en el que el flujo se ajustó a 20 g/h, lo que corresponde a un tiempo de residencia de 14 minutos, con el fin de lograr un Re de aproximadamente 0,8.

TABLA VIII

Actividad relativa (%)	Re	Ra	Flujo (g/h)	Tiempo de residencia (minutos)
100	0,84	0,30	20	14
77	0,83	0,29	16	17
47	0,83	0,27	10	28
8	0,84	0,25	2	165

15

Los resultados documentados en las tablas VII y VIII, anteriores, ilustran que con el fin de mantener un grado constante de conversión a lo largo del tiempo en un reactor de flujo de lecho empacado, es necesario ajustar el caudal en una manera recíproca para la reactivación del catalizador enzimático (reducción de actividad). Para su sorpresa, los autores de la presente invención han encontrado que la modificación al azar resultante de la posición sn-2 (Ra) prácticamente no está afectada por estos tiempos de residencia, desde 14 hasta 165 minutos. Si la modificación al azar encontrada fuera el resultado de la migración de acilo citada a menudo en glicéridos de ácidos grasos parciales, la modificación al azar de sn-2 (Ra) se incrementaría considerablemente con tiempo de residencia creciente. El procedimiento de acuerdo con la invención, sin embargo, proporciona que la modificación al azar de sn-2 (Ra) es prácticamente contante cuando el tiempo de residencia se incrementa.

20

25

Los datos también muestran que la modificación al azar de sn-2 (Ra) no está cambiando cuando un catalizador enzimático con alta actividad de partida, de acuerdo con la invención, está como una consecuencia del procedimiento en curso funcionando a una actividad reducida. Esto prueba que la alta actividad de partida del catalizador enzimático, según se define en el texto, es el elemento clave para el establecimiento de la modificación al azar de sn-2 (Ra).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento en el que los residuos de ácidos grasos en un resto glicérido están modificados al azar en las posiciones terminales y medias, en el que el procedimiento se desarrolla a un grado de conversión en las posiciones terminales, Re , variando desde 0,3-0,95 y en el que un grado de conversión en la posición media, Ra , varía de 0,06-0,75 y en el que Ra es mayor de $0,32Re - 0,08$, el procedimiento comprende la exposición de una grasa de triglicéridos a un catalizador que comprende una lipasa **caracterizado porque** la lipasa es una lipasa de *Thermomyces lanuginosa* que tiene una actividad de al menos 250 IUN en el comienzo del procedimiento y el contenido de agua en la mezcla de reacción es desde el 0,001 hasta el 0,1 % en peso.
- 5 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el catalizador tiene una actividad de al menos 300 IUN, más preferentemente al menos 350 IUN.
- 10 3. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** Ra es mayor de $0,32Re - 0,06$, preferentemente mayor de $0,32Re - 0,04$.
- 15 4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, **caracterizado porque** la cantidad de catalizador cuando se usa en un reactor por lotes es del 0,05 - 9 % en peso, preferentemente del 0,05 - 5 % en peso, más preferentemente del 0,05 - 3 %, calculada en la mezcla de reacción.
5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, **caracterizado porque** en la primera hora de dirigir al aceite a través de un reactor de lecho empacado el tiempo de residencia del aceite en el lecho de catalizador es menor de 25 minutos, preferentemente menor de 20 minutos, más preferentemente menor de 15 minutos.
- 20 6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, **caracterizado porque** la grasa de triglicéridos se selecciona de la lista que comprende cualquier mezcla que comprenda un aceite líquido y un aceite hidrogenado, cualquier grasa de triglicéridos que no se haya sometido a hidrogenación y una mezcla de grasa de palma o de fracción de grasa de palma y una grasa láurica o una fracción de grasa láurica.
- 25 7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, **caracterizado porque** el grado de conversión Re es menor de 0,9, preferentemente menor de 0,85.
8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, **caracterizado porque** el grado de conversión Re es al menos 0,35, preferentemente al menos 0,4.
- 30 9. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, **caracterizado porque** el contenido de agua en la mezcla de reacción es desde el 0,001 hasta el 0,05 % en peso.
10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 9, **caracterizado porque** la temperatura de la mezcla de reacción es desde 40 hasta 85 °C, preferentemente desde 45 hasta 80 °C, más preferentemente desde 50 hasta 75 °C.

Fig. 1

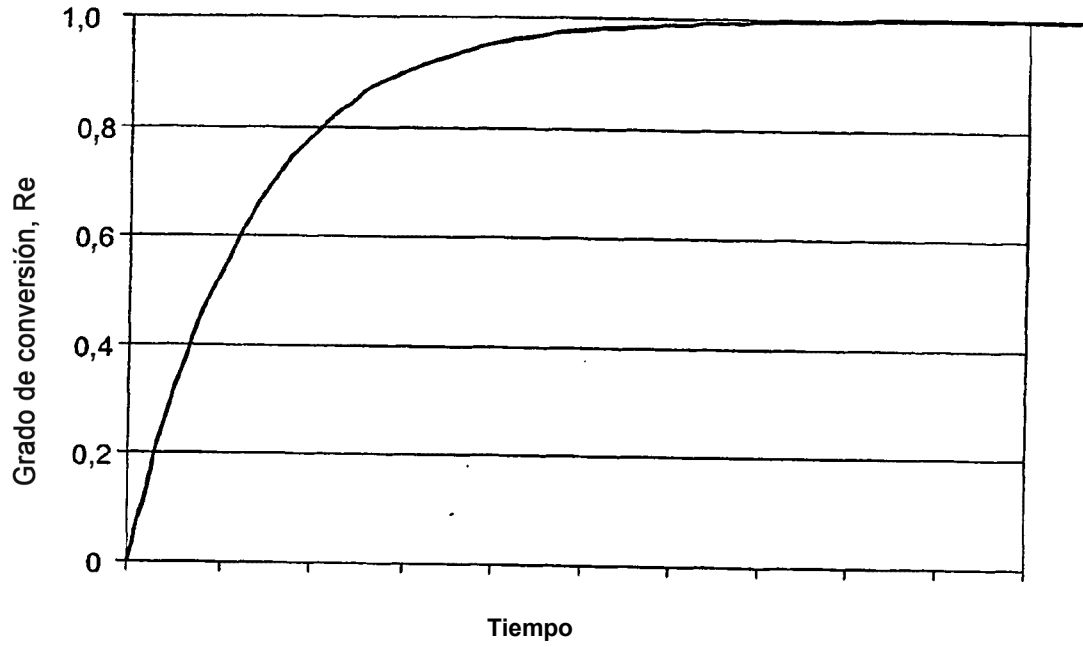


Fig. 2

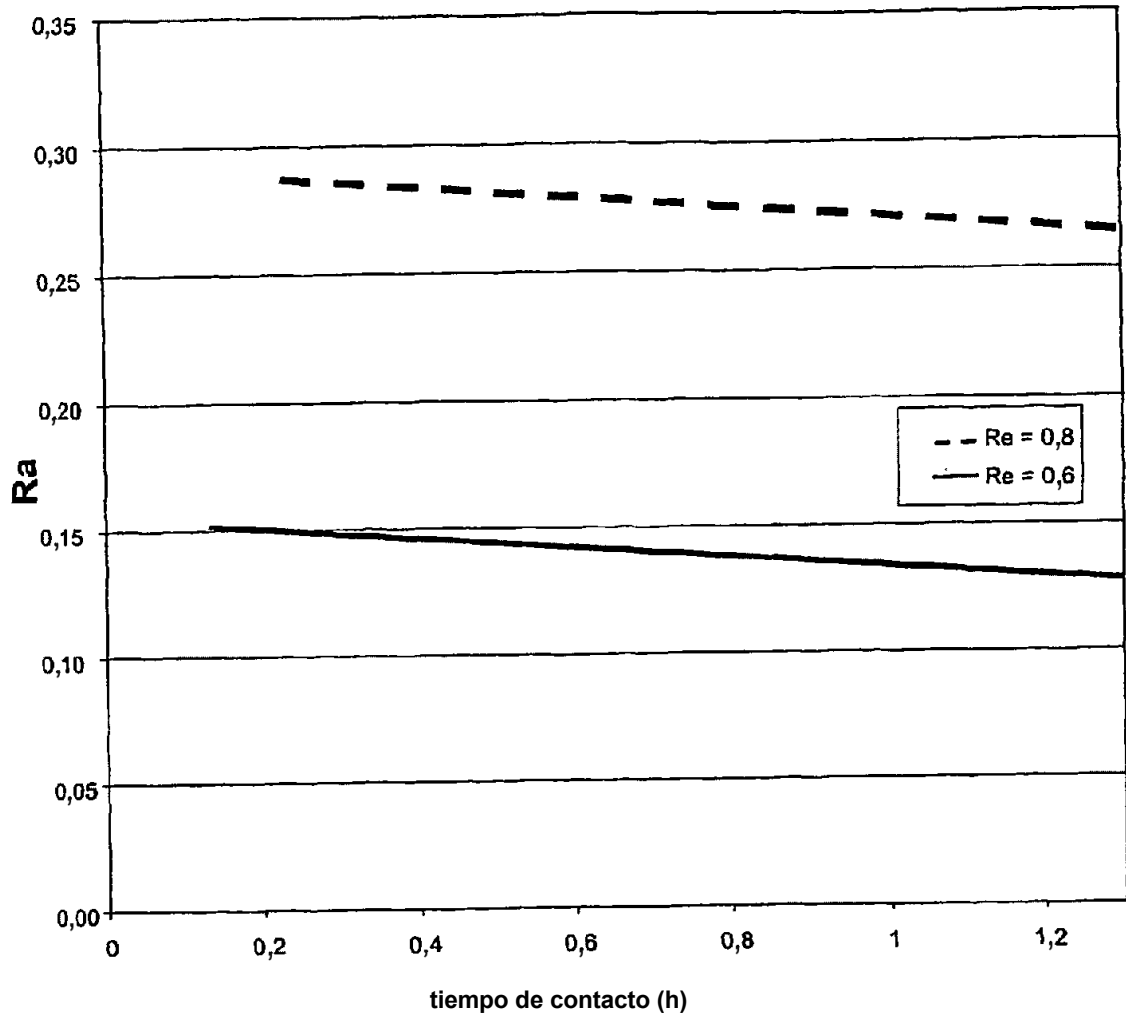


Fig. 3

