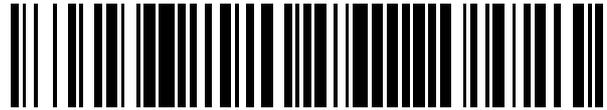


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 459 217**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)

C12P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2005 E 05734274 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014 EP 1740708**

54 Título: **Producción enzimática de productos de lecitina hidrolizados**

30 Prioridad:

09.04.2004 US 822222

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

08.05.2014

73 Titular/es:

**CARGILL INCORPORATED (100.0%)
15407 MCGINTY ROAD WEST
WAYZATA MN 55391, US**

72 Inventor/es:

**SCHMITT, HEIDI;
HEIRMAN, MARC;
BRÜSE, FALK;
SCHNEIDER, MICHAEL y
VAN DER SYPE, JOHN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 459 217 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

Producción enzimática de productos de lecitina hidrolizados

Campo de la invención

5 La invención está relacionada con procesos para la producción enzimática de productos de lecitina hidrolizados en un disolvente orgánico aprótico, tal como hexano.

Referencias

- D. Adlercreutz *et al.*, Synthesis of phosphatidylcholine with different fatty acid in sn-1 position by lipase-catalyzed esterification and transesterification reaction. *Biotechnol. Bioeng.* 78: 403-411 (2002).
- 10 A. Bastida *et al.*, A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnology and Bioengineering* 58 (5): 486-493 (1998).
- V. M. Balcao *et al.*, Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme and Microbial Technology* 18: 391-416 (1995).
- G. F. Bickerstaff, redactor, *Immobilization of Enzymes and Cells*. Humana, Totowa, New Jersey, EE.UU., 1997.
- 15 U. T. Bornscheuer *et al.*, Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends in Biotechnology* 20 (10): 433-437 (2002).
- O. Chmiel *et al.*, Process for the interesterification of phospholipids. Patente de EE.UU. nº 5.989.599 (1999).
- W. Cho *et al.*, Efficient immobilization of phospholipase A2. *Methods in Molecular Biology* 109: 303-307 (1999).
- R. Fernandez-Lafuente *et al.*, Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chemistry and Physics of Lipids* 93 (1-2): 185-97 (junio de 1998).
- 20 M. J. Haas *et al.*, The hydrolysis of phosphatidylcholine by an immobilized lipase: optimization of hydrolysis in organic solvents. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 70 (2): 111-17 (1993).
- M. Haas *et al.*, Enzymic phosphatidylcholine hydrolysis in organic solvents: an examination of selected commercially available lipases. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 71 (5): 483-90 (1994).
- 25 M. J. Haas *et al.*, The enzymic hydrolysis of triglyceride-phospholipid mixtures in an organic solvent. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 72 (5): 519-25 (1995).
- F. Hara *et al.*, Comparative study of commercially available lipases in hydrolysis reaction of phosphatidylcholine. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74 (9): 1129-1132 (1997).
- F. D. Gunstone, Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 1535-1549 (1999).
- 30 A. E. Ivanov *et al.*, Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 3: 303-309 (1997).
- B. Jirjis *et al.*, Method for removing phospholipids from vegetable oil miscella, method for conditioning a polymeric microfiltration membrane, and membrane. Patente de EE.UU. nº 6.207.209 (2001).
- 35 B. Jirjis *et al.*, Method and apparatus for processing vegetable oil miscella, method for conditioning a polymeric microfiltration membrane, membrane, and lecithin product. Patente de EE.UU. nº 6.833.149 (2004).
- S. T. Kang *et al.*, Characteristics of immobilized lipase-catalyzed hydrolysis of olive oil of high concentration in reverse phase system. *Biotechnology and Bioengineering* 33 (11):1469-76 (1989).
- F. X. Malcata *et al.*, Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 14 (6): 426-46 (junio de 1992).
- 40 F. X. Malcata *et al.*, Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils - a review. *Journal of the American Oil Chemists Society* 67 (12): 890-910 (1990).
- K. Mosbach, redactor, *Methods in Enzymology*, Vol. 137: Immobilized Enzymes and Cells. Academic Press, San Diego, California, EE.UU., 1988.

- A. Mustranta *et al.*, Comparison of lipases and phospholipases in the hydrolysis of phospholipids. *Process Biochemistry* 30 (5): 393-401 (1995).
- I. C. Omar *et al.*, Hydrolysis of triglycerides by immobilized thermostable lipase from *Humicola lanuginosa*. *Agricultural and Biological Chemistry* 52 (1): 99-105 (1988).
- 5 M. V. Ramachandra *et al.*, Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: A review. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 7 (2): 57-66 (2002).
- B. Sas *et al.*, Improved method for the conversion of lecithin into lysolecithin. Publicación PCT nº WO 00/52190 (2000).
- 10 J. F. Shaw *et al.*, Lipolytic activities of a lipase immobilized on six selected supporting materials. *Biotechnology and Bioengineering* 35 (2): 132-7 (1990).
- D. K. Shen *et al.*, Characterisation and expression of phospholipases B from the opportunistic fungus *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiology Letters* 239 (1): 87-93 (2004).
- S. W. Pearce *et al.*, Lipases for food ingredients. Resumen 94-5, 2002 Annual Meeting and Food Expo, Anaheim, California, EE.UU.
- 15 Las lecitinas y las lecitinas modificadas se emplean mucho en la industria, incluyendo las industrias alimentaria y farmacéutica, como agentes solubilizantes, agentes emulsivos y otros tipos de aditivos. Las lecitinas se obtienen de diversas fuentes animales o vegetales, tales como semillas de soja y yema de huevo, y comprenden una mezcla de fosfolípidos y triglicéridos así como cantidades menores de compuestos tales como glicolípidos, carbohidratos, ácidos grasos y/o esteroides.
- 20 Se ha hallado que la hidrólisis parcial de fosfolípidos en lecitinas mejora las propiedades emulsivas. Esta modificación se efectúa lo más comúnmente mediante el tratamiento de la lecitina con fosfolipasas A1 y/o A2, que hidrolizan selectivamente el primer o segundo gliceril-ácido graso, respectivamente, de los fosfolípidos, produciendo lisofosfolípidos.
- 25 Se ha hallado también que la adición de monoglicéridos y diglicéridos a lecitinas o lecitinas parcialmente hidrolizadas mejora las propiedades de los productos finales, tales como las características de cocción de la harina y las propiedades antisalpicadura de la margarina, especialmente de aquéllas que tienen un menor contenido de grasa, por ejemplo, 60% en peso de grasa o menos (véanse, por ejemplo, la Patente Europea EP nº 253429, la Patente de EE.UU. nº 3.505.074, y la Publicación PCT nº WO 02/49444). Otros ejemplos de productos alimenticios y piensos en que son útiles tales composiciones incluyen masa congelada, productos de panadería, para mejorar las propiedades anti-enranciamiento, productos de carne emulsionados, helados, aderezos, y otros sistemas para emulsión.
- 30 S. W. Pearce *et al.* describen el uso de una fosfolipasa, Lecitase, para hidrolizar lecitina.
- Actualmente, los productos de lecitina que contienen cantidades aumentadas de monoglicéridos y diglicéridos se preparan añadiendo estos componentes a lecitinas. Sería útil preparar directamente dichos productos, de una manera controlada, mediante la hidrólisis enzimática de la lecitina y composiciones relacionadas.
- 35 **Descripción detallada de la invención**
- I. Visión de conjunto
- En un aspecto, la invención proporciona un método para producir un producto de lecitina hidrolizado que comprende fosfolípidos hidrolizados, monoglicéridos y diglicéridos, método que comprende:
- 40 (a) poner un material de lecitina, que comprende un componente de fosfolípidos y un componente de triglicéridos, en contacto con una enzima primera para crear una mezcla de reacción en un medio disolvente orgánico que comprende un disolvente orgánico aprótico y agua suficiente para promover la hidrólisis, en donde la enzima primera comprende una fosfolipasa o lipasa que hidroliza los fosfolípidos;
- (b) poner posteriormente el producto de la operación (a), en un medio disolvente orgánico que contiene agua suficiente para promover la hidrólisis, en contacto con una enzima segunda que comprende una lipasa que hidroliza los triglicéridos y es diferente de la enzima primera; y
- 45 (c) obtener el producto de lecitina hidrolizado.
- En realizaciones seleccionadas, la enzima segunda es una lipasa y la enzima primera es una fosfolipasa, por ejemplo, fosfolipasa A1 y/o A2. En una de dichas realizaciones, la enzima primera es fosfolipasa A2.

En otra realización, la enzima primera es fosfolipasa D. Esta realización puede comprender además, antes de dicha operación (b) de puesta en contacto, hacer reaccionar el producto de la operación (a) con fosfolipasa A1 y/o A2. En aún otra realización, la enzima primera es fosfolipasa C.

5 En este proceso, y en todos los procesos de hidrólisis proporcionados en esta memoria, el material de lecitina de partida procede preferiblemente de una fuente presente en la naturaleza, tal como yema de huevo o un aceite vegetal. Preferiblemente, el material de partida procede directamente de la fuente presente en la naturaleza, es decir, sin la adición de componentes externos de fosfolípidos, triglicéridos, mono/diglicéridos ni ácidos grasos.

10 El material de partida puede ser un material de lecitina que tenga un contenido de materiales insolubles en acetona (A.I.; del inglés, acetone insoluble) de al menos 50%, preferiblemente de al menos 60%, en peso. Las proporciones descritas en esta memoria son porcentajes en peso a menos que se indique otra cosa. Alternativamente, se pueden utilizar materiales de partida que tengan valores de A.I. más pequeños, por ejemplo, de 10%-50% en peso.

15 El producto hidrolizado es preferiblemente un producto de lecitina hidrolizado que tiene al menos un 50%, y más preferiblemente al menos un 56%, de materiales insolubles en acetona. El producto hidrolizado tiene preferiblemente un índice de acidez (AV; del inglés, acid value) inferior a 45 mg de KOH/gramo. En otras realizaciones, el producto hidrolizado comprende al menos un 60% de materiales insolubles en acetona.

El disolvente orgánico aprótico puede comprender un disolvente hidrocarbonado. El material de partida puede ser un producto de retención de un proceso de desgomado de aceites vegetales mediante membrana. En una realización de este aspecto, las operaciones (a) y (b) se llevan a cabo en presencia de una membrana eficaz para separar los fosfolípidos hidrolizados, los monoglicéridos y los diglicéridos de los ácidos grasos liberados.

20 Se puede poner el material de partida simultáneamente en contacto con las enzimas primera y segunda o se pueden emplear las enzimas secuencialmente, en cualquier orden. Es decir, se puede emplear la enzima "primera" antes o después de, o concurrentemente con, la enzima "segunda".

Preferiblemente, la enzima primera (es decir, la enzima eficaz para hidrolizar el fosfolípido) es fosfolipasa A1 y/o A2. En una realización, la enzima primera es fosfolipasa A2.

25 El disolvente orgánico aprótico puede ser un disolvente hidrocarbonado, tal como hexano. En una realización, el material de partida de lecitina es un producto de retención de un proceso de desgomado de aceites vegetales mediante membrana.

30 En una realización, la enzima es una lipasa y el producto hidrolizado comprende fosfolípidos y diglicéridos y, en algunos casos, monoglicéridos. En otra realización, la enzima es fosfolipasa C y el producto hidrolizado comprende fosfolípidos, triglicéridos y diglicéridos. En este caso, el método puede comprender además hacer reaccionar con fosfolipasa A1 y/o A2 el producto hidrolizado.

Cada uno de los procesos descritos en esta memoria comprende preferiblemente las operaciones adicionales de separar o desactivar la(s) enzima(s) y separar el medio disolvente. Estas operaciones pueden ir además seguidas de la formulación del producto hidrolizado en un producto alimenticio.

35 Se describe además un producto de lecitina hidrolizado, en donde el producto contiene fosfolípidos hidrolizados, monoglicéridos y diglicéridos y se produce mediante cualquiera de los procesos anteriormente descritos, donde el material de partida procede directamente de un aceite vegetal, y el proceso incluye las operaciones de separar o desactivar la(s) enzima(s) y separar el medio disolvente. El producto de lecitina hidrolizado consiste esencialmente en componentes del material de partida y sustancias hidrolizadas que se obtienen a partir del material de partida por reacción de la(s) enzima(s). Preferiblemente, el producto de lecitina hidrolizado contiene al menos un 50%, y más preferiblemente al menos un 56%, de materiales insolubles en acetona y tiene un índice de acidez inferior a 45 mg de KOH/gramo. Lo más preferiblemente, el producto contiene al menos un 60% de materiales insolubles en acetona.

45 Se describen también un producto alimenticio que comprende el producto de lecitina hidrolizado, y un método para formular un producto alimenticio al combinar un producto de lecitina hidrolizado con ingredientes comestibles adicionales.

II. Procesos para la modificación enzimática de lecitina o composiciones relacionadas

50 La invención proporciona métodos para producir un producto de lecitina hidrolizado que comprende fosfolípidos y/o fosfolípidos hidrolizados, monoglicéridos y diglicéridos (haciéndose conjuntamente referencia a los dos últimos componentes como mono/diglicéridos). Típicamente, el producto también incluye fosfolípidos no hidrolizados y triglicéridos. Los fosfolípidos hidrolizados son típicamente lisofosfolípidos, y pueden también incluir ácido fosfatídico y/o ácido lisofosfatídico.

De acuerdo con la invención, el producto hidrolizado se produce directamente por tratamiento enzimático de un

material de partida, como se describe más adelante, sin la adición separada de ninguno de los anteriores componentes nombrados. Preferiblemente, el material de lecitina de partida procede directamente de un aceite vegetal; por ejemplo, es un material obtenido a partir de un procesamiento convencional de un aceite vegetal.

5 En realizaciones preferidas, el proceso produce un producto de lecitina hidrolizado que comprende al menos un 50%, preferiblemente al menos un 56%, y más preferiblemente al menos un 60%, de materiales insolubles en acetona (que consisten esencialmente en fosfolípidos y/o fosfolípidos hidrolizados) y tiene un índice de acidez inferior a 45 mg de KOH/gramo.

A. Materiales de partida

10 En los procesos descritos en esta memoria se emplea un material de lecitina de partida que tiene un componente de fosfolípidos (preferiblemente al menos un 10%, y más preferiblemente al menos un 25%, y lo más preferiblemente al menos un 40%, en peso) y un componente de triglicéridos. Cuando el material de partida comprende un nivel de materiales insolubles en acetona (que consisten esencialmente en fosfolípidos) que concuerda con las normas legislativas para "lecitina", al material de partida se puede hacer referencia como material de partida de lecitina. Este nivel de materiales insolubles en acetona es generalmente al menos un 50% en peso; por ejemplo, 56% o más en peso, o 60% o más en peso.

15 El material de partida procede preferiblemente de una fuente presente en la naturaleza, tal como yema de huevo o un aceite vegetal, donde un "aceite vegetal" incluye cualquier aceite extraído de las semillas, el fruto o las nueces de una planta. Los ejemplos comunes incluyen los aceites de girasol, semilla de colza, canola, semilla de algodón y, en particular, semilla de soja. Preferiblemente, el material de partida procede directamente de la fuente presente en la naturaleza, es decir, sin la adición de componentes externos de fosfolípidos, triglicéridos, mono/diglicéridos o ácidos grasos.

20 Convenientemente, el material de partida puede ser producido por medio de un procesamiento convencional de materiales presentes en la naturaleza, típicamente un aceite vegetal, tal como aceite de soja. En realizaciones preferidas, el material de partida es un material obtenido mediante el desgomado de un aceite vegetal mediante agua o una membrana.

25 Por ejemplo, en un procedimiento típico para el procesamiento de aceite de soja crudo, las semillas de soja son descascarilladas y son sometidas a extracción con hexano para producir un líquido de extracción (miscela) que incluye hexano y aceite de soja crudo. El aceite de soja crudo contiene, como un componente principal, aceite de glicéridos, además de fosfolípidos, azúcares, esteroides, glucósidos de esteroides, ácidos grasos, y otros componentes en cantidades menores.

30 Los fosfolípidos se separan de la mayoría del aceite de glicéridos de la miscela en un proceso conocido como "desgomado". En un desgomado convencional mediante agua, esto se realiza generalmente separando el hexano disolvente, hidratando los fosfolípidos con agua caliente o vapor de agua, y centrifugando. La separación de parte de, o toda, el agua proporciona un material de lecitina crudo que típicamente contiene aproximadamente 60-65% de materiales insolubles en acetona, siendo el resto principalmente triglicéridos y cantidades menores de otros componentes, tales como azúcares, glucósidos de esteroides y/o ácidos grasos. Dicho material se puede emplear como un material de partida en los procesos descritos en esta memoria.

35 Más recientemente, se han desarrollado métodos para el desgomado de aceite de soja mediante una membrana, lo que produce generalmente un producto más puro que el desgomado mediante agua. Véase, por ejemplo, Jirjis et al., Patentes de EE.UU. números 6.207.209 y 6.833.149. En una realización preferida de la presente invención, el material de partida se obtiene mediante dicho proceso. En el desgomado mediante membrana, se alimenta una miscela de aceite vegetal en un disolvente hidrocarbonado, típicamente hexano, a una membrana, produciéndose una corriente de filtrado que está desprovista de fosfolípidos y una corriente de producto de retención que está enriquecida en fosfolípidos con respecto al contenido de fosfolípidos de la miscela.

40 El producto de retención, con o sin el hexano disolvente, puede ser utilizado como un material de partida en los presentes procesos. Se puede variar el contenido de fosfolípidos de dicho producto de retención al variar las condiciones de separación, tales como, por ejemplo, la relación de producto de retención-filtrado, el tiempo de separación y/o el número de fases de separación (véase, por ejemplo, Jirjis et al., anteriormente citado). El contenido de fosfolípidos del producto de retención (excluyendo el disolvente) puede ser, por ejemplo, de entre aproximadamente 10% y aproximadamente 85%, y es típicamente de entre aproximadamente 50% y aproximadamente 85%.

B. Condiciones de reacción: En general

La reacción puede ser llevada a cabo en un medio disolvente orgánico. Como se emplea en esta memoria, la expresión "medio disolvente orgánico" se refiere a un disolvente aprótico (es decir, ni un alcohol ni una amina), y

más preferiblemente a un disolvente apolar, por lo que el medio de reacción incluye un contenido de agua suficiente para que se produzca la hidrólisis. Preferiblemente, el contenido de agua está en un nivel eficaz para promover la hidrólisis y minimizar la transesterificación. Esta agua se puede añadir al medio de reacción, por ejemplo, usando un disolvente saturado de agua, o puede ser proporcionada por agua atrapada o residual en el material de partida.

- 5 En realizaciones seleccionadas, los procesos de hidrólisis como los descritos en esta memoria se llevan a cabo bajo unas condiciones eficaces para inhibir la transesterificación de los fosfolípidos hidrolizados con los ácidos grasos liberados. Dichas condiciones pueden incluir la presencia de agua suficiente para inhibir la esterificación, o la presencia de sales para secuestrar los ácidos grasos liberados. Por ejemplo, se puede añadir una sal o una base débil a la mezcla de reacción para secuestrar los ácidos grasos liberados. Dichas al puede ser, por ejemplo, cloruro cálcico en exceso. El cloruro cálcico se incluye rutinariamente como un activador iónico en reacciones en que se emplean fosfolipasas.

10 Alternativamente o además, la reacción puede ser llevada a cabo en presencia de una membrana que tenga una composición y un tamaño de poro eficaces para separar los ácidos grasos de la mezcla de reacción. Esta característica también sirve para aumentar el contenido de materiales insolubles en acetona (A.I.) del producto hidrolizado.

15 Otras condiciones de reacción que se pueden variar en los procesos descritos en esta memoria incluyen, por ejemplo, el estado de la enzima (por ejemplo, si está inmovilizada o no), la temperatura, el pH, la presencia y concentración de otros aditivos, y la concentración del sustrato. Más adelante se describen condiciones ejemplares.

C. Procesos de hidrólisis con dos enzimas

- 20 El material de partida es hidrolizado en un proceso con dos enzimas usando dos enzimas diferentes. Específicamente, se utiliza una enzima primera, típicamente una fosfolipasa (o una lipasa reactiva con fosfolípidos, como se discute más adelante), para hidrolizar los fosfolípidos del material de partida hasta lisofosfolípidos y/o ácidos fosfatídicos, y se utiliza una enzima segunda, una lipasa (o, en algunos casos, una fosfolipasa que tiene actividad lipasa), para hidrolizar los triglicéridos hasta mono/diglicéridos. Preferiblemente, la enzima primera es una fosfolipasa, tal como fosfolipasa A2, para la hidrólisis de los fosfolípidos, y la enzima segunda es una lipasa, para la hidrólisis de los triglicéridos. Adviértase que, en este caso, el uso de "primera" y "segunda" no indica necesariamente el orden cronológico de la reacción.

25 El uso de dos enzimas diferentes puede proporcionar mayor flexibilidad en las variedades de composiciones de producto obtenidas, con respecto a las cantidades relativas de los diferentes componentes hidrolizados presentes, que un proceso con una sola enzima. Las dos enzimas pueden ser empleadas simultánea o secuencialmente, en cualquier orden, como se describe adicionalmente más adelante.

30 Más generalmente, cada una de las dos enzimas diferentes es una fosfolipasa o una lipasa, donde se proporciona una enzima para hidrolizar los fosfolípidos del material de partida, por ejemplo, hasta lisofosfolípidos, y se proporciona la otra para hidrolizar los triglicéridos del material de partida hasta mono/diglicéridos. Típicamente, una enzima es una fosfolipasa que hidroliza selectivamente fosfolípidos, y la otra es una lipasa que hidroliza selectivamente triglicéridos. "Selectiva", como se emplea en esta memoria, indica que la enzima hidroliza en mayor grado un sustrato particular, tal como un fosfolípido, que un sustrato diferente, tal como un triglicérido, bajo condiciones equivalentes. El "grado" de hidrólisis se refiere al porcentaje de sustrato hidrolizado en moles. El grado de hidrólisis de un sustrato con respecto a otro por una enzima selectiva puede diferir en un factor de dos o más, en un factor de aproximadamente 5 o más, o en un factor de aproximadamente 25 o aproximadamente 50 o más.

35 Como se discute más adelante, algunas lipasas son conocidas por hidrolizar fosfolípidos, en algunos casos en un grado mayor que el de la hidrólisis de triglicéridos. Por el contrario, aunque menos comúnmente, algunas fosfolipasas son conocidas por hidrolizar triglicéridos, en algunos casos en un grado mayor que el de la hidrólisis de fosfolípidos. En general, la actividad y la selectividad de dichas enzimas dependen de las condiciones de reacción.

- 40 En consecuencia, la selección de las dos enzimas puede incluir diferentes combinaciones de lipasa(s) y fosfolipasa(s) con tal de que una tenga una actividad lipasa significativa y/o selectiva y la otra tenga una actividad fosfolipasa significativa y/o selectiva, bajo las condiciones de reacción. Actividad "significativa", como se emplea en esta memoria, indica que una enzima hidroliza al menos el 1% en moles, preferiblemente al menos el 5%, y más preferiblemente al menos el 10% o al menos el 25% en moles de un sustrato particular bajo un conjunto dado de condiciones de reacción.

45 Como se describe adicionalmente más adelante, en la reacción con dos enzimas, cuando se lleva a cabo en un disolvente acuoso, se emplea ventajosamente una enzima fosfolipasa (o selectiva para fosfolípidos) en una primera fase y una enzima lipasa (o selectiva para triglicéridos) en una fase posterior. En la reacción en disolvente orgánico se pueden emplear las dos enzimas secuencialmente, en cualquier orden, o simultáneamente. La reacción segunda se lleva preferiblemente a cabo sobre un producto de retención de un proceso de desgomado mediante membrana.

55

C. Reacción con dos enzimas en disolvente orgánico

El proceso con dos enzimas se lleva a cabo en un medio disolvente orgánico aprótico que contiene agua suficiente para que tenga lugar la hidrólisis y, preferiblemente, agua suficiente para promover la hidrólisis e inhibir la transesterificación. El material de partida se proporciona preferiblemente en el disolvente orgánico. En una realización, el proceso se lleva a cabo sobre un producto de retención obtenido en el desgomado de un aceite vegetal, típicamente aceite de soja, mediante membrana. Un producto de retención típico, como se describe en, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. números 6.207.209 y 6.833.149, contiene la mayoría de los fosfolípidos presentes en el aceite preprocesado ya que estos compuestos forman en el disolvente hidrocarbonado grandes agregados que no penetran en los poros de la membrana. Sin embargo, como se indicó anteriormente, se pueden obtener productos de retención que tengan niveles variables de fosfolípidos al variar las condiciones empleadas durante la separación por membrana, por ejemplo, variando la relación de producto de retención-filtrado. El producto de retención también contiene generalmente una fracción significativa de triglicéridos.

El disolvente orgánico aprótico puede ser cualquier disolvente que sea inerte bajo las condiciones de reacción, incluyendo, por ejemplo, ésteres y cetonas de bajo peso molecular, hidrocarburos halogenados y, preferiblemente, hidrocarburos. Los disolventes hidrocarbonados preferidos incluyen alcanos, cicloalcanos e hidrocarburos aromáticos simples tales como, por ejemplo, benceno y sus compuestos homólogos que contienen sustituyentes alquílicos que tienen hasta cuatro átomos de carbono. Los hidrocarburos ejemplares incluyen benceno, tolueno, xilenos, cicloalcanos C₃-C₆, alcanos C₅-C₈, mezclas de los mismos, por ejemplo, éter de petróleo, y alquenos C₅-C₈.

Cuando el proceso con dos enzimas se lleva a cabo en un medio disolvente orgánico, las dos enzimas se pueden emplear simultáneamente. Más adelante, en las Secciones V y VI, se proporcionan ejemplos de reacciones.

El proceso puede ser llevado a cabo en presencia de una membrana eficaz para separar los componentes del producto hidrolizado, por ejemplo, fosfolípidos, fosfolípidos hidrolizados, triglicéridos, monoglicéridos y/o diglicéridos, de los ácidos grasos liberados. Se pueden seleccionar una composición de la membrana, un tamaño de poro y una presión operativa adecuados, de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, para permitir que los ácidos grasos libres atraviesen selectivamente la membrana. Esta característica puede ser eficaz para aumentar el contenido de materiales insolubles en acetona (A.I.) del producto hidrolizado.

Como se discute adicionalmente más adelante, las enzimas pueden estar inmovilizadas, lo que facilita su separación de la mezcla de reacción. Las enzimas no inmovilizadas son desactivadas después de la compleción de la reacción, típicamente por calentamiento.

D. Procesos con una sola enzima

En otra realización de la invención, se emplea un producto de retención de un proceso de desgomado de aceite vegetal por membrana, como se describió anteriormente, como material de partida en un proceso de hidrólisis con una sola enzima, donde la enzima es una fosfolipasa o, preferiblemente, una lipasa. Como se describió anteriormente y se describe adicionalmente más adelante en la Sección III, muchas lipasas tienen una actividad fosfolipasa significativa y son eficaces para hidrolizar tanto triglicéridos (hasta mono/diglicéridos) como fosfolípidos (hasta lisofosfolípidos). La relación de estas actividades en una preparación enzimática varía a menudo con las condiciones de reacción, particularmente con el disolvente y el pH. Preferiblemente, la lipasa es selectiva para triglicéridos, como se define en esta memoria.

Cuando la enzima es una lipasa, el producto hidrolizado, que puede ser un producto de lecitina hidrolizado que tenga un 50% o más de A.I., contiene típicamente mono/diglicéridos, triglicéridos y fosfolípidos y también puede contener fosfolípidos hidrolizados, por ejemplo, lisofosfolípidos. Más adelante, en las Secciones V y VI, se proporcionan ejemplos de dichas reacciones.

También se contemplan reacciones de una sola enzima donde la enzima es una fosfolipasa C. De nuevo, el material de partida puede proceder del procesamiento de un aceite vegetal, especialmente aceite de soja, y preferiblemente procede directamente de dicha fuente. Se espera que la reacción produzca un producto que contenga fosfolípidos, triglicéridos y diglicéridos, sin cantidad significativa alguna de monoglicéridos ni lisofosfolípidos. Este producto podría ser hecho reaccionar adicionalmente, si se deseara, con una fosfolipasa A para producir un producto que contuviera además lisofosfolípidos.

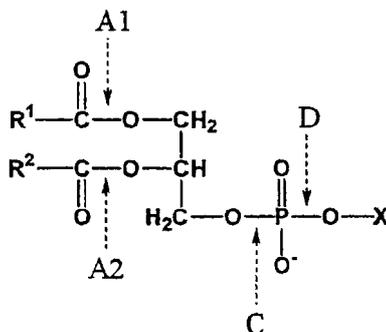
III. Enzimas adecuadas para uso en los procesos de la invención

A. Fosfolipasas

Como se describió anteriormente, en los métodos de la invención se puede emplear una fosfolipasa para hidrolizar fosfolípidos (y, en algunos casos, triglicéridos) en el material de partida. Las enzimas fosfolipasas son fácilmente asequibles en el comercio. Las fosfolipasas comunes se clasifican en A1, A2, C y D basándose en qué enlace de un

fosfolípido es hidrolizado por la enzima, como se indica más adelante [la familia de enzimas fosfolipasa B comparte actividades fosfolipasa, lisofosfolipasa y lisofosfolipasa-transacilasa (Shen et al., 2004) y es generalmente menos preferida a causa de su menor selectividad].

- 5 En los presentes procesos con dos enzimas se emplea típicamente fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32) y/o A2 (EC 3.1.1.4), que produce lisofosfolípidos por eliminación de una cadena lateral acílica. En otras realizaciones, se puede utilizar una fosfolipasa D (EC 3.1.4.4), sola o en combinación con fosfolipasa A1 o A2, para obtener ácidos fosfatídicos y/o ácidos lisofosfatídicos.



- 10 En otra realización, se puede hacer reaccionar fosfolipasa C con el material de partida de fosfolípidos/triglicéridos para producir un producto que contiene fosfolípidos, triglicéridos y diglicéridos, sin cantidad significativa alguna de monoglicéridos ni lisofosfolípidos. Este producto podría ser hecho reaccionar además, si se deseara, con una fosfolipasa A para producir un producto que contuviese además lisofosfolípidos.

- 15 En realizaciones seleccionadas, se emplea fosfolipasa D, sola o en combinación con fosfolipasa A1 o A2, para producir productos de lecitina hidrolizados que tienen un componente de ácido fosfatídico o ácido lisofosfatídico. También se puede utilizar en combinación con un alcohol seleccionado de entre etanolamina, serina e inositol para aumentar, respectivamente, el contenido de PE, PS o PI del producto de lecitina hidrolizado.

- 20 La hidrólisis de lecitinas con fosfolipasa A1 o A2 sola es conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente GB nº 1215868 (1970), que describe un proceso convencional en el que se hace reaccionar lecitina con fosfolipasa A2 en una emulsión acuosa, en presencia de iones de calcio, para obtener lisolecitina. La purificación incluye una extracción con acetona, que separa materiales solubles en acetona tales como ácidos grasos y glicéridos. Hirai et al. (Patente de EE.UU. nº 5.955.327) describen la reacción de lecitina hidratada con fosfolipasa A1 o A2 en un medio acuoso, lo que va seguido de una operación de reparto con acetona para aislar el producto de lisolecitina. Yesair (Patente de EE.UU. nº 5.716.814) describe un proceso en el que se hace reaccionar una mezcla de fosfatidilcolina y un monoglicérido con fosfolipasa A2 para producir una composición de lisofosfolípido-monoglicérido-ácido graso.

- 25 En algunos casos, como se discutió anteriormente, una fosfolipasa puede presentar una actividad lipasa significativa y/o selectiva. Por ejemplo, Mustranta et al., 1995, citado anteriormente, comunicaron que una preparación de fosfolipasa A1 (*A. niger*) tenía una relación de actividades lipasa/fosfolipasa de 2:1 en medio acuoso. Dicha fosfolipasa puede ser utilizada para hidrolizar triglicéridos en los procesos descritos en esta memoria. Sin embargo, más típicamente, se utiliza una lipasa, tal como se describe más adelante, para hidrolizar triglicéridos.

30 B. Lipasas

- 35 Se conocen muchas lipasas diferentes (a las que también se hace referencia como triacilglicerol hidrolasas; EC 3.1.1.3) obtenidas de fuentes animales, vegetales o microbianas y/o se dispone comercialmente de ellas, a menudo en forma inmovilizada. Estas enzimas pueden variar mucho en cuanto a actividad y selectividad; es decir, en los grados de actividad lipasa, actividad fosfolipasa y/o actividad esterasa presentados por una preparación enzimática particular.

- 40 El fabricante proporcionará a menudo información relativa a la actividad y selectividad de una preparación comercial de lipasa. La actividad y la selectividad de una enzima varían a menudo con las condiciones de reacción, tales como, por ejemplo, si la reacción se realiza en un medio orgánico u acuoso, si la enzima está inmovilizada, etcétera, y con la pureza de la preparación particular. Otros parámetros que pueden afectar a la reactividad y selectividad de una enzima incluyen el pH, la concentración de sustrato y la polaridad del disolvente (véase, por ejemplo, Haas et al., 1995, 1994; citados anteriormente).

La actividad de una preparación enzimática particular con respecto a diferentes sustratos, tales como fosfolípidos y triglicéridos, puede ser empíricamente evaluada para un conjunto dado de condiciones de reacción, si se desea, usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, A. Mustranta et al. (anteriormente citado) determinaron el

grado de hidrólisis de fosfatidilcolina de soja (es decir, la actividad fosfolipasa) para cada una de diversas lipasas y fosfolipasas, en una emulsión acuosa, mediante la titulación de los ácidos grasos liberados producidos por una reacción de 30 minutos. Se empleó una reacción similar con aceite de oliva para determinar la actividad lipasa. En este informe, tanto una lipasa de *A. niger* como una lipasa de *P. cyclopium* mostraron actividad fosfolipasa, aunque la actividad lipasa fue mayor, particularmente para la lipasa de *A. niger*. En el informe también se indicó que las preparaciones de fosfolipasa A2 eran mucho más selectivas de fosfolipasa que las preparaciones de fosfolipasa A1.

M. Haas et al. (1995, anteriormente citado) determinaron el grado de hidrólisis de fosfolípidos y triglicéridos por cada una de tres lipasas y una fosfolipasa, cada una comercialmente asequible en forma inmovilizada. Se trataron separadamente los componentes con las enzimas en agua; se trataron mezclas de los componentes en hexano saturado de agua. Se determinó el grado de hidrólisis por titulación de los ácidos grasos liberados y por análisis de las mezclas lipídicas de producto mediante HPLC. Se halló que el medio disolvente ejercía un gran efecto sobre la reactividad y la selectividad en este informe. Por ejemplo, las lipasas de *R. miehei* y *C. rugosa* eran mucho más reactivas hacia triglicéridos que hacia fosfolípidos en ambos medios disolventes, y una tercera lipasa, de *C. antarctica*, mostró una selectividad similar a la de *R. miehei* en agua pero no resultó reactiva en hexano. La fosfolipasa (fosfolipasa B de Amano) sólo hidrolizó los fosfolípidos en hexano y no resultó reactiva en agua.

En otro análisis, F. Hara et al. (anteriormente citado) determinaron el grado de hidrólisis de fosfatidilcolina por diversas lipasas en un sistema micelar inverso durante 24 horas y durante 48 horas. El grado de hidrólisis, determinado mediante un análisis cromatográfico, varió de 0 a 100% para las lipasas examinadas. Por ejemplo, bajo las condiciones de reacción descritas, las lipasas procedentes de *M. javanicus* (Lipase M10, Amano Pharmaceuticals), *M. miehei* (Lipozyme IM20, Novo Nordisk) y páncreas de cerdo (Pancreatin F, Amano) proporcionaron una hidrólisis de fosfatidilcolina del 100%; las lipasas procedentes de *Rhizopus* sp. (Lipase F, Amano) y *R. delemar* (Newlase F, Amano) proporcionaron una hidrólisis de aproximadamente 35-45%; y las lipasas procedentes de *A. niger* (Lipase A6, Amano) y *C. cylindrica* (Lipase AY30, Amano) proporcionaron poca o ninguna hidrólisis.

Como se muestra en los artículos anteriormente citados y en otros de este campo, las lipasas presentan a menudo una actividad fosfolipasa significativa. Dichas enzimas, a las que se puede hacer referencia en esta memoria como lipasas "reactivas con fosfolípidos", pueden ser utilizadas como enzima primera en los procesos con dos enzimas descritos en esta memoria. Una lipasa que es "reactiva con fosfolípidos" puede ser definida como una que, bajo unas condiciones de reacción adecuadas tales como las expuestas en las reacciones ejemplares posteriores, es eficaz para hidrolizar al menos el 1% en moles, preferiblemente al menos el 5%, y más preferiblemente al menos el 10% o al menos el 25% en moles de los fosfolípidos presentes en la mezcla de reacción. Dichas condiciones de reacción pueden incluir la reacción en un medio acuoso, empleándose la enzima en una concentración de 0,001 a 0,2% basándose en un 60% de Al (materiales insolubles en acetona), a aproximadamente 40-60 °C durante un periodo de 4 a 24 horas, o la reacción en un disolvente orgánico, empleándose el mismo nivel de enzima, a aproximadamente 20-60 °C durante un periodo de 1 a 24 horas.

Más típicamente, la enzima primera de la reacción con dos enzimas es una fosfolipasa, y se emplean lipasas como enzima segunda en los procesos con dos enzimas descritos en esta memoria o como enzima única en procesos que se dirigen a la hidrólisis selectiva del componente de triglicéridos del material de partida. Para estos fines, las lipasas preferidas pueden ser definidas como aquéllas que, bajo las condiciones de reacción dadas, son selectivas para actividad lipasa; es decir, el grado de hidrólisis de acil-gliceroles por la lipasa es mayor, preferiblemente en un factor de dos o más, que el grado de hidrólisis de acil-fosfolípidos por la lipasa, bajo las condiciones de reacción [como se indicó anteriormente, las condiciones de reacción incluyen, por ejemplo, el disolvente, el estado de la enzima (por ejemplo, si está inmovilizada o no), la temperatura, el pH, la presencia y concentración de aditivos iónicos, y la concentración de sustrato]. El "grado de hidrólisis" puede ser definido como el porcentaje de sustrato hidrolizado en moles; es decir, el porcentaje de triglicéridos convertidos en mono/diglicéridos o el porcentaje de fosfolípidos convertidos en lisofosfolípidos. Más preferiblemente, el grado es aproximadamente 5 veces mayor, lo más preferiblemente aproximadamente 25 o aproximadamente 50 veces mayor. A estas enzimas también se hace referencia en esta memoria como lipasas "selectivas para triglicéridos" o lipasas eficaces para hidrolizar selectivamente triglicéridos.

50 C. Inmovilización de enzimas

Las enzimas utilizadas en los procesos descritos en esta memoria pueden ser inmovilizadas, para lo cual se conocen diversos materiales y métodos en la técnica; más adelante se describen procedimientos ejemplares. La inmovilización de las enzimas, en general, prolonga la vida útil de las enzimas, simplifica la purificación de los productos y a menudo potencia la actividad catalítica de la enzima. Los materiales sobre los que se han inmovilizado enzimas incluyen sílice, vidrio poroso, Celite[®], diatomita, resinas para intercambio iónico, y otros diversos sustratos polímeros que incluyen poliamidas, polipropileno, polietilenglicol, polisacáridos tales como celulosa, agarosa y agarosa alquílicamente modificada, y quitina o quitosano. Se pueden proporcionar sustratos polímeros, por ejemplo, en forma de membranas, fibras huecas o glóbulos. En una realización, para la inmovilización de enzimas también se

podría utilizar una membrana empleada para la separación de ácidos grasos de la mezcla de reacción. La inmovilización se lleva frecuentemente a cabo por adsorción simple, pero puede incluir la fijación covalente a, por ejemplo, sílice modificada con amino o aldehído.

5 En la bibliografía se dispone de extensas descripciones de la inmovilización de enzimas, incluyendo una descripción particular de la inmovilización de lipasas y fosfolipasas. Una muestra de referencias incluye K. Mosbach, redactor, 1988; F. X. Malcata *et al.*, 1990, 1992; V. M. Balcao *et al.*, 1995; A. E. Ivanov *et al.*, 1997; G. F. Bickerstaff, redactor, 1997; Bastida *et al.*, 1998; R. Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998; W. Cho *et al.*, 1999; U. T. Bornscheuer *et al.*, 2002; M. V. Ramachandra *et al.*, 2002; y D. Adlercreutz *et al.*, 2002; todas anteriormente citadas bajo "Referencias". Frecuentemente, las enzimas se proporcionan comercialmente en forma inmovilizada.

10 IV. Producto hidrolizado

Se describe además un producto hidrolizado, obtenido por medio de una reacción de hidrólisis enzimática descrita en esta memoria, que contiene fosfolípidos y/o fosfolípidos hidrolizados, monoglicéridos y diglicéridos, y que contiene típicamente fosfolípidos y triglicéridos. Los fosfolípidos hidrolizados pueden incluir lisofosfolípidos, ácido fosfatídico y/o ácido lisofosfatídico. Los fosfolípidos hidrolizados son típicamente lisofosfolípidos, tales como los que se producen por reacción de la fosfolipasa A1 o A2.

15 El producto hidrolizado contiene al menos 0,5%, al menos 1%, al menos 2,5%, al menos 5%, al menos 7,5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40% o al menos 45% en peso de mono/diglicéridos. El porcentaje en moles de triglicéridos convertidos en mono/diglicéridos es preferiblemente al menos 25%, más preferiblemente al menos 50%, hasta 75% o más.

20 Los productos de los procesos descritos en esta memoria son denominados "lecitina hidrolizada" o "productos de lecitina hidrolizados" si su composición está de acuerdo con las normas de etiquetado para lecitinas, las cuales pueden variar con los países. Por ejemplo, de acuerdo con la norma de etiquetado E322 en Europa, las "lecitinas" se definen como "mezclas de fracciones de fosfolípidos que se obtienen de productos alimenticios animales o vegetales mediante procesos físicos"; también pueden incluir "sustancias hidrolizadas que se obtienen mediante el uso de enzimas inocuas y adecuadas". De acuerdo con esta norma de etiquetado, una "lecitina" incluye al menos 60% de sustancias insolubles en acetona y tiene un índice de acidez inferior a 35 mg de KOH/gramo, y una "lecitina hidrolizada" incluye al menos 56% de sustancias insolubles en acetona y tiene un índice de acidez inferior a 45 mg de KOH/gramo.

30 El producto de lecitina hidrolizado puede proceder de un material de partida de lecitina que contenga mezclas de fosfolípidos obtenidos de productos alimenticios animales o vegetales mediante procesos físicos. El material de partida de lecitina puede ser obtenido, por ejemplo, a partir del desgomado de aceite de soja crudo mediante agua o mediante membrana.

35 El producto hidrolizado consiste esencialmente en componentes del material de partida, que procede directamente de un aceite vegetal, y sustancias hidrolizadas que se obtienen del material de partida mediante el uso de enzimas inocuas y adecuadas, específicamente una lipasa y, en la mayoría de los casos, una fosfolipasa, como se describe en esta memoria. El material de partida es preferiblemente un material de lecitina, obtenido mediante el desgomado de un aceite vegetal, tal como aceite de soja. Por "consiste esencialmente en" se quiere significar que el producto hidrolizado puede contener, por ejemplo, agua pero no contiene componentes lipídicos distintos de los componentes del material de partida y de las sustancias hidrolizadas derivadas de estos, como se especificó anteriormente. No contiene actividad enzimática residual alguna.

40 V. Procedimientos de reacciones ejemplares

Las reacciones siguientes son sólo ejemplares y con ellas no se pretende limitar la invención. Estos procedimientos se refieren típicamente a un material de partida de "lecitina"; sin embargo, como se indicó anteriormente, se pueden emplear materiales de partida que contengan cantidades variables de fosfolípidos y triglicéridos. Por ejemplo, un producto de retención de un proceso de desgomado mediante membrana puede incluir de aproximadamente 10% a aproximadamente 85% de fosfolípidos, dependiendo de las condiciones de la separación, como se indicó anteriormente.

A. Hidrólisis en disolvente orgánico aprótico: Adición secuencial de dos enzimas

50 Una lecitina fluida obtenida como el producto de retención de un proceso de desgomado mediante membrana, como se describe, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. n° 6.207.209, que tiene un nivel de materiales insolubles en acetona (AI) de 55%-80%, es combinada con fosfolipasa A2, que puede estar inmovilizada, preferiblemente en una cantidad de 0,001 a 0,2%, basándose en un 60% de AI. Si es necesario, se ajusta el pH a un nivel favorable para la enzima y se añade CaCl₂ para activar la enzima. El CaCl₂ en exceso puede ser utilizado para secuestrar eficazmente ácidos grasos liberados. La reacción se lleva a cabo a aproximadamente 20-60 °C durante un periodo

de 1 a 24 horas. Se recupera la enzima inmovilizada, y un secado proporciona un producto que contiene lisolecitina, en una cantidad determinada por el tiempo y la temperatura de reacción y por la concentración de enzima.

5 A este producto se añade una lipasa, que puede estar inmovilizada, preferiblemente en una cantidad de 0,001 a 0,2%, basándose en un 60% de AI. Si es necesario, se ajusta el pH a un nivel favorable para la enzima y se añade CaCl_2 . La reacción se lleva a cabo a aproximadamente 20-60 °C durante un periodo de 1 a 24 horas. Se recupera la enzima inmovilizada, y un secado proporciona un producto de lecitina que contiene lisolecitina y que también contiene mono/diglicéridos, en una cantidad determinada por el tiempo y la temperatura de reacción y por la concentración de enzima.

10 En una realización preferida, la reacción se lleva a cabo en presencia de una membrana que tiene una composición y un tamaño de poro eficaces para separar selectivamente ácidos grasos de la mezcla de reacción.

15 Preferiblemente, la concentración de lipasa y los demás parámetros son eficaces para producir un producto de lecitina hidrolizado que contiene al menos 0,5%, al menos 1%, al menos 2,5%, al menos 5%, al menos 7,5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40% o al menos 45% en peso de mono/diglicéridos. El porcentaje en moles de triglicéridos convertidos en mono/diglicéridos es preferiblemente al menos 25%, más preferiblemente al menos 50%, hasta 75% o más.

B. Hidrólisis en disolvente orgánico aprótico: Adición simultánea de dos enzimas

20 Una lecitina fluida obtenida como el producto de retención de un proceso de desgomado mediante membrana, como se describe, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. nº 6.207.209, que tiene un nivel de materiales insolubles en acetona (AI) de 55%-80%, es combinada con fosfolipasa A2 y una lipasa selectiva para triglicéridos, cada una de las cuales puede estar inmovilizada, cada una preferiblemente en una cantidad de 0,001 a 0,2%, basándose en un 60% de AI. Si es necesario, se ajusta el pH a un nivel favorable para las enzimas y se añade CaCl_2 . La reacción se lleva a cabo a aproximadamente 20-60 °C durante un periodo de 1 a 24 horas. En una realización preferida, la reacción se lleva a cabo en presencia de una membrana que tiene una composición y un tamaño de poro eficaces para separar selectivamente ácidos grasos de la mezcla de reacción.

25 Se recupera la enzima inmovilizada, y un secado proporciona un producto de lecitina que contiene lisolecitina y mono/diglicéridos, cada uno en una cantidad determinada por el tiempo y la temperatura de reacción y por las respectivas concentraciones de enzima. Preferiblemente, la concentración de lipasa y los demás parámetros son eficaces para producir un producto de lecitina hidrolizado que contiene al menos 0,5%, al menos 1%, al menos 2,5%, al menos 5%, al menos 7,5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40% o al menos 45% en peso de mono/diglicéridos. El porcentaje en moles de triglicéridos convertidos en mono/diglicéridos es preferiblemente al menos 25%, más preferiblemente al menos 50%, hasta 75% o más.

C. Hidrólisis en disolvente orgánico aprótico: Una sola enzima

35 Una lecitina fluida obtenida como el producto de retención de un proceso de desgomado mediante membrana, como se describe, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. nº 6.207.209, que tiene un nivel de materiales insolubles en acetona (AI) de 20%-80%, es combinada con una lipasa selectiva para triglicéridos, que puede estar inmovilizada, en una cantidad de aproximadamente 0,1 a 0,2% basada en un 60% de AI. Si es necesario, se ajusta el pH a un nivel favorable para la enzima y se añade CaCl_2 . El CaCl_2 en exceso puede ser utilizado para secuestrar eficazmente ácidos grasos liberados. La reacción se lleva a cabo a aproximadamente 20-60 °C durante un periodo de 1 a 24 horas. En una realización preferida, la reacción se lleva a cabo en presencia de una membrana que tiene una composición y un tamaño de poro eficaces para separar selectivamente ácidos grasos de la mezcla de reacción.

45 Se recupera la enzima inmovilizada, y un secado proporciona un producto de lecitina que contiene mono/diglicéridos, en una cantidad determinada por el tiempo y la temperatura de reacción y por la concentración de enzima. Preferiblemente, la concentración de lipasa y los demás parámetros son eficaces para producir un producto de lecitina hidrolizado que contiene al menos 0,5%, al menos 1%, al menos 2,5%, al menos 5%, al menos 7,5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40% o al menos 45% en peso de mono/diglicéridos. El porcentaje en moles de triglicéridos convertidos en mono/diglicéridos es preferiblemente al menos 25%, más preferiblemente al menos 50%, hasta 75% o más.

VI. Ejemplos prácticos

50 Los ejemplos siguientes se destinan a ilustrar la invención y no a limitarla.

Inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas puede ser llevada a cabo del modo descrito, por ejemplo, por D. Adlercreutz et al.,

2002. En los Ejemplos siguientes se emplearon dos productos de conjugación, preparados del modo descrito a continuación.

Producto de conjugación I: Se inmovilizó Lecitase[®] Ultra sobre MP1000 (Membrana, Accurel Systems, Obernburg, Alemania) del modo siguiente. Se humectó MP1000 (3 g) usando 25 ml de etanol (95%) y se añadieron 2,5 ml de Lecitase[®] Ultra (una fosfolipasa A) en 350 ml de tampón de fosfato 20 mM (pH de 7). Después de 1 hora de agitación a 0 °C, la enzima inmovilizada fue aislada por filtración y fue secada bajo presión reducida.

Producto de conjugación II: Mediante un procedimiento similar, se humectó MP1000 (15 g) usando 100 ml de etanol (95%) y se añadieron 7,5 ml de Lecitase[®] Ultra en 350 ml de tampón de fosfato 20 mM (pH de 7). Después de 1 hora de agitación a 0 °C, la enzima inmovilizada fue aislada por filtración y fue secada bajo presión reducida.

10 Ejemplo I: Hidrólisis de lecitina con fosfolipasa A

Se recreó un producto de retención de lecitina fluida procedente de un proceso de desgomado mediante membrana, como se describe, por ejemplo, en la Patente nº 6.207.209, que tenía un nivel de materiales insolubles en acetona (AI) de 55%-80%, disolviendo 106,4 g de lecitina (AI: 65,13; AV: 17,89 mg de KOH/g), obtenida por secado de dicho producto de retención, y 14,08 g de agua en 564,5 g de hexano.

15 Se combinó esta disolución (60 ml) con 200 mg de Lecitase[®] Ultra inmovilizada (producto de conjugación I, preparado del modo anteriormente descrito). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiental durante 20 horas, y la enzima inmovilizada fue recuperada por filtración. Un secado proporcionó un producto que tenía un índice de acidez de 35,1 mg de KOH/g y la composición siguiente (por índice de acidez, P-NMR y GC): 17,8% de ácidos grasos, 0,1% de monoglicéridos, 0,6% de diglicéridos, 26,2% de triglicéridos, 42,0% de fosfolípidos y 2,5% de lisofosfolípidos.

Ejemplo II: Reacciones secuenciales de dos enzimas

Se recreó un producto de retención de lecitina fluida procedente de un proceso de desgomado mediante membrana, como se describe, por ejemplo, en la Patente nº 6.207.209, que tenía un nivel de materiales insolubles en acetona (AI) de 55%-80%, disolviendo 106,4 g de lecitina (AI: 65,13; AV: 17,89 mg de KOH/g), obtenida por secado de dicho producto de retención, y 14,08 g de agua en 564,5 g de hexano.

Se combinó esta disolución (60 ml) con 200 mg de Lecitase[®] Ultra inmovilizada (producto de conjugación I, preparado del modo anteriormente descrito). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiental durante 20 horas, y la enzima inmovilizada fue recuperada por filtración.

Se añadieron 20 mg de Lipozyme a este filtrado. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiental durante 4 horas, y la enzima inmovilizada fue recuperada por filtración. Un secado proporcionó un producto que tenía un índice de acidez de 62,5 mg de KOH/g y la composición siguiente (por índice de acidez, P-NMR y GC): 31,5% de ácidos grasos, 2,3% de monoglicéridos, 5,7% de diglicéridos, 9,4% de triglicéridos, 30,8% de fosfolípidos y 8,4% de lisofosfolípidos.

Ejemplo III: Reacciones simultáneas de dos enzimas

Se recreó un producto de retención de lecitina fluida procedente de un proceso de desgomado mediante membrana, como se describe, por ejemplo, en la Patente nº 6.207.209, que tenía un nivel de materiales insolubles en acetona (AI) de 55%-80%, disolviendo 106,4 g de lecitina (AI: 65,13; AV: 17,89 mg de KOH/g), obtenida por secado de dicho producto de retención, y 14,08 g de agua en 564,5 g de hexano.

Se combinó esta disolución (60 ml) con 200 mg de Lecitase[®] Ultra inmovilizada (producto de conjugación II, preparado del modo anteriormente descrito) y 10 mg de Lipozyme. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiental durante 8 horas, y la enzima inmovilizada fue recuperada por filtración. Un secado proporcionó un producto que tenía un índice de acidez de 54,3 mg de KOH/g y la composición siguiente (por índice de acidez, P-NMR y GC): 27,3% de ácidos grasos, 3,8% de monoglicéridos, 5,4% de diglicéridos, 3,1% de triglicéridos, 44,6% de fosfolípidos y 1,9% de lisofosfolípidos.

Ejemplo IV: Reacciones simultáneas de dos enzimas

Se repitió el procedimiento del Ejemplo III usando 100 mg de producto de conjugación II en lugar de 200 mg. El secado proporcionó un producto que tenía la composición siguiente (por índice de acidez, P-NMR y GC): 26% de ácidos grasos, 3,6% de monoglicéridos, 5,2% de diglicéridos, 3,1% de triglicéridos, 46% de fosfolípidos y 1,1% de lisofosfolípidos.

Ejemplo V: Reacciones simultáneas de dos enzimas

Se repitió el procedimiento del Ejemplo III usando 400 mg de producto de conjugación II en lugar de 200 mg. El secado proporcionó un producto que tenía la composición siguiente (por índice de acidez, P-NMR y GC): 30,8% de ácidos grasos, 3,9% de monoglicéridos, 4,3% de diglicéridos, 2,4% de triglicéridos, 43,6% de fosfolípidos y 2,6% de lisofosfolípidos.

5 Ejemplo VI: Hidrólisis de lecitina con una lipasa

Se recreó un producto de retención de lecitina fluida procedente de un proceso de desgomado mediante membrana, como se describe, por ejemplo, en la Patente nº 6.207.209, que tenía un nivel de materiales insolubles en acetona (AI) de 55%-80%, disolviendo 106,4 g de lecitina (AI: 65,13; AV: 17,89 mg de KOH/g), obtenida por secado de dicho producto de retención, y 14,08 g de agua en 564,5 g de hexano.

10 Se combinó esta disolución (60 ml) con 10 mg de Lipozyme. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiental durante 20 horas, y la enzima inmovilizada fue recuperada por filtración. Un secado proporcionó un producto que tenía un índice de acidez de 52,1 mg de KOH/g y la composición siguiente (por índice de acidez, P-NMR y GC): 26,2% de ácidos grasos, 4,0% de monoglicéridos, 5,3% de diglicéridos, 3,8% de triglicéridos, 47,4% de fosfolípidos y 0,8% de lisofosfolípidos.

15 En las Tablas I y II siguientes se resumen los resultados de las reacciones anteriormente descritas (FL = fosfolípidos; LFL = lisofosfolípidos; TG = triglicéridos; DG = diglicéridos; MG = monoglicéridos; AG = ácidos grasos). En la Tabla I se muestra la distribución de componentes en el producto hidrolizado, en porcentaje en peso. En la Tabla II se muestra la relación molar aproximada de triglicéridos, diglicéridos y monoglicéridos (basada en el peso molecular de un estearoil-glicérido) en el producto hidrolizado, con respecto a la suma de estos tres componentes.

20 Como se puede ver, el porcentaje molar de triglicéridos convertidos en mono/diglicéridos, en todos los Ejemplos salvo el I, es aproximadamente 60% o más, hasta aproximadamente 85%.

Tabla I

Ejemplo	Enzima(s)	Índice de acidez del producto	Componentes del producto, % en peso					
			FL	LFL	TG	DG	MG	AG
I	200 mg de prep. de Lecitase	35,1	42,0	2,5	26,2	0,6	0,1	17,8
II	200 mg de prep. de Lecitase seguidos de 20 mg de Lipozyme	62,5	30,8	8,4	9,4	5,7	2,3	31,5
VI	10 mg de Lipozyme	52,1	47,4	0,8	3,8	5,3	4,0	26,2
IV	100 mg de prep. de Lecitase + 10 mg de Lipozyme	n.d.	46,0	1,1	3,1	5,2	3,6	26,0
III	200 mg de prep. de Lecitase + 10 mg de Lipozyme	54,3	44,6	1,9	3,1	5,4	3,8	27,3
V	400 mg de prep. de Lecitase + 10 mg de Lipozyme	n.d.	43,6	2,6	2,4	4,3	3,9	30,8

Tabla II

Ejemplo	Enzima(s)	Relación molar de TG/DG/MG		
		% aprox. de TG en moles	% aprox. de DG en moles	% aprox. de MG en moles
I	200 mg de prep. de Lecitase	96%	3%	1%
II	200 mg de prep. de Lecitase seguidos de 20 mg de Lipozyme	40%	35%	25%
VI	10 mg de Lipozyme	18%	36%	46%
IV	100 mg de prep. de Lecitase + 10 mg de Lipozyme	16%	38%	46%
III	200 mg de prep. de Lecitase + 10 mg de Lipozyme	15%	38%	47%
V	400 mg de prep. de Lecitase + 10 mg de Lipozyme	13%	34%	53%

VII. Aplicaciones

5 Los productos de lecitina hidrolizados, preparados de acuerdo con la presente invención, pueden ser empleados en cualquier aplicación en que se haya utilizado lecitina, lecitina hidrolizada, lecitina enriquecida con mono/diglicéridos, o productos relacionados. Los productos hidrolizados de la invención pueden ser formulados en tales productos de acuerdo con métodos conocidos en la técnica para la formulación de lecitina o lecitina hidrolizada.

10 El producto hidrolizado puede ser utilizado, por ejemplo, como un agente emulsivo, un agente tensioactivo, un estabilizante, un agente desmoldeador, un agente humectante, un agente dispersivo, un lubricante, un agente para el control de la viscosidad, un agente de cristalización, un agente suavizante, un emoliente, un agente anti-formación de polvo, o un ingrediente de alto valor nutritivo.

15 Las diversas aplicaciones en que se puede utilizar el producto hidrolizado incluyen aplicaciones alimenticias, para piensos, técnicas, cosméticas y farmacéuticas/nutracéuticas. Las aplicaciones alimenticias ejemplares incluyen chocolate, derivados de chocolate, bollería, golosinas, glaseados, productos lácteos, productos de queso, productos de pasta, margarina, manteca, mezclas de grasas, emulsiones, aceites para pulverización, aderezos, reconstitución de cacao, leche, polvos proteicos no lácteos, agentes desmoldeadores, sopas, salsas, mayonesas, aliños, carnes, jugos de carne, carnes enlatadas, compuestos análogos a carne, agentes mejoradores del pan, bebidas, bebidas energéticas, tentempiés, postres (tales como helados y barritas dulces), agentes mejoradores de la harina, agentes mejoradores de la panificación, chicles, colorantes, mezclas de agentes saboreadores, mezclas de agentes emulsivos, alimento para niños, y antioxidantes.

20 En una realización particular, los productos de lecitina hidrolizados preparados de acuerdo con la invención, que contienen mono/diglicéridos, son útiles para mejorar las propiedades antisalpicadura de productos para cocción tales como la margarina y la manteca. Como se proporciona en esta memoria, dichos productos se forman preferiblemente por hidrólisis de un material de partida de lecitina con una lipasa, sola o en combinación con una fosfolipasa.

25 Las aplicaciones ejemplares para piensos incluyen agentes emulsivos y fuentes de elevado valor nutritivo en el pienso para, por ejemplo, pescados, gambas, terneras (como sustituto de la leche), cerdos, cerdas, lechones, visones, aves de corral y mascotas. Las aplicaciones técnicas ejemplares incluyen el uso como un agente dispersivo en, por ejemplo, pinturas, tintas, revestimientos, cintas magnéticas y discos, como un agente suavizante en, por ejemplo, cuero y tejidos, como un agente emulsivo en, por ejemplo, productos agroquímicos y la protección de cultivos, y en lubricantes, aceites, adhesivos, agentes adsorbentes, agentes floculantes, inhibidores de la corrosión, cerámica, vidrio, detergentes, procesamiento de metales, productos de papel, productos del petróleo, fotocopia,

fotografía, polímeros, cauchos y tejidos. Las aplicaciones cosméticas ejemplares incluyen el uso como un agente dispersivo en lápices labiales y esmaltes de uñas y como un agente emulsivo/estabilizante en champús, cremas y lociones. Las aplicaciones farmacéuticas/nutracéuticas ejemplares incluyen el uso como una fuente natural de fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina y vitamina E.

- 5 Se describen además métodos para formular un producto de lecitina hidrolizado, según se prepara mediante cualquiera de los métodos de la invención descritos en esta memoria, en un producto como el anteriormente descrito y, particularmente, en un producto alimenticio. También se describe un producto, especialmente un producto alimenticio, que contiene un producto de lecitina hidrolizado, según se prepara mediante cualquiera de los métodos de la invención descritos en esta memoria.

10

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un producto de lecitina hidrolizado, que comprende fosfolípidos hidrolizados, monoglicéridos y diglicéridos, método que comprende
 - 5 (a) poner un material de lecitina, que comprende un componente de fosfolípidos y un componente de triglicéridos, en contacto con una enzima primera para crear una mezcla de reacción en un medio disolvente orgánico que comprende un disolvente orgánico aprótico y agua suficiente para promover la hidrólisis, en donde la enzima primera comprende una fosfolipasa o lipasa que hidroliza los fosfolípidos;
 - (b) poner posteriormente el producto de la operación (a), en un medio disolvente orgánico que contiene agua suficiente para promover la hidrólisis, en contacto con una enzima segunda que comprende una lipasa que hidroliza los triglicéridos y es diferente de la enzima primera; y
 - 10 (c) obtener el producto de lecitina hidrolizado.
2. El método de la Reivindicación 1, en donde el disolvente orgánico aprótico comprende un disolvente hidrocarbonado.
3. El método de la Reivindicación 2, en donde el disolvente orgánico aprótico es hexano.
- 15 4. El método de la Reivindicación 1, en donde las operaciones (a) y (b) se llevan a cabo en presencia de una membrana que separa los fosfolípidos hidrolizados, los monoglicéridos y los diglicéridos de los ácidos grasos liberados.
5. El método de la Reivindicación 1, en donde el material de lecitina está compuesto de al menos un 40% del componente de fosfolípidos.
- 20 6. El método de la Reivindicación 1, en donde el material de lecitina comprende al menos un 60% de material insoluble en acetona.
7. El método de la Reivindicación 1, en donde el material de lecitina comprende un producto de retención de un proceso de desgomado de un aceite vegetal mediante membrana.
8. El método de la Reivindicación 1, en donde el producto de lecitina hidrolizado comprende al menos un 56% de materiales insolubles en acetona y tiene un índice de acidez inferior a 45 mg de KOH/gramo.
- 25 9. El método de la Reivindicación 1, en donde el producto de lecitina hidrolizado comprende al menos un 60% de materiales insolubles en acetona.
10. El método de la Reivindicación 1, en donde la enzima primera es fosfolipasa A1, fosfolipasa A2 o una combinación de las mismas.
- 30 11. El método de la Reivindicación 1, en donde la enzima primera es fosfolipasa A2.
12. El método de la Reivindicación 1, en donde la enzima primera es fosfolipasa C.
13. El método de la Reivindicación 1, en donde la enzima primera es fosfolipasa D.
14. El método de la Reivindicación 5, que comprende además, antes de la operación (b) de puesta en contacto, hacer reaccionar el producto de la operación (a) con fosfolipasa A1, fosfolipasa A2 o una combinación de las mismas.
- 35 15. El método de la Reivindicación 1, en donde la enzima segunda hidroliza selectivamente los triglicéridos.
16. El método de la Reivindicación 1, en donde la enzima segunda es una lipasa.
17. El método de la Reivindicación 1, en donde la enzima segunda es Lipozyme.
18. Un método para producir un producto de lecitina hidrolizado que comprende fosfolípidos hidrolizados, monoglicéridos y diglicéridos, método que comprende:
 - poner un material de lecitina, que comprende un componente de fosfolípidos y un componente de triglicéridos, en contacto con unas enzimas primera y segunda en una mezcla de reacción que contiene un disolvente orgánico aprótico y agua suficiente para promover la hidrólisis; en donde la enzima primera comprende una fosfolipasa o lipasa que hidroliza los fosfolípidos, y la enzima segunda comprende una lipasa que hidroliza los triglicéridos y es diferente de la enzima primera; y
 - 45

obtener de la mezcla de reacción el producto de lecitina hidrolizado.

19. El método de la Reivindicación 18, en donde la operación de puesta en contacto se lleva a cabo en presencia de una membrana que separa los fosfolípidos hidrolizados, los monoglicéridos y los diglicéridos de los ácidos grasos liberados.
- 5 20. El método de la Reivindicación 18, en donde el disolvente orgánico aprótico comprende un disolvente hidrocarbonado.
21. El método de la Reivindicación 18, en donde el disolvente orgánico aprótico es hexano.
22. El método de la Reivindicación 18, en donde el material de lecitina está compuesto de al menos un 40% del componente de fosfolípidos.
- 10 23. El método de la Reivindicación 18, en donde el material de lecitina comprende al menos un 60% de material insoluble en acetona.
24. El método de la Reivindicación 18, en donde el material de lecitina comprende un producto de retención de un proceso de desgomado de un aceite vegetal mediante membrana.
- 15 25. El método de la Reivindicación 18, en donde el producto de lecitina hidrolizado comprende al menos un 56% de materiales insolubles en acetona y tiene un índice de acidez inferior a 45 mg de KOH/gramo.
26. El método de la Reivindicación 18, en donde el producto de lecitina hidrolizado comprende al menos un 60% de materiales insolubles en acetona.
27. El método de la Reivindicación 18, en donde la enzima primera es fosfolipasa A1, fosfolipasa A2 o una combinación de las mismas.
- 20 28. El método de la Reivindicación 18, en donde la enzima primera es fosfolipasa A2.
29. El método de la Reivindicación 18, en donde la enzima primera es fosfolipasa C.
30. El método de la Reivindicación 18, en donde la enzima primera es fosfolipasa D.
31. El método de la Reivindicación 18, en donde la enzima segunda hidroliza selectivamente los triglicéridos.
32. El método de la Reivindicación 18, en donde la enzima segunda es una lipasa.
- 25 33. El método de la Reivindicación 18, en donde la enzima segunda es Lipozyme.
34. El método de la Reivindicación 18, en donde el material de lecitina se pone concurrentemente en contacto con las enzimas primera y segunda.
35. Un método para producir mediante hidrólisis enzimática un producto que comprende fosfolípidos, monoglicéridos y diglicéridos, método que comprende:
 - 30 poner un material de lecitina, que comprende un componente de fosfolípidos y un componente de triglicéridos, en contacto con una lipasa en ausencia de una fosfolipasa para crear una mezcla de reacción en un medio disolvente orgánico que comprende un disolvente orgánico aprótico y agua suficiente para promover la hidrólisis, para hidrolizar selectivamente los triglicéridos; y
 - 35 obtener de la mezcla de reacción el producto de lecitina hidrolizado, en donde el material de lecitina es un producto de retención de un proceso de desgomado de un aceite vegetal mediante membrana.
36. El método de la Reivindicación 35, en donde el material de lecitina está compuesto de al menos un 40% del componente de fosfolípidos.
37. El método de la Reivindicación 35, en donde el material de lecitina comprende al menos un 60% de material insoluble en acetona.
- 40 38. El método de la Reivindicación 35, en donde el producto de lecitina hidrolizado comprende al menos un 56% de materiales insolubles en acetona y tiene un índice de acidez inferior a 45 mg de KOH/gramo.
39. El método de la Reivindicación 35, en donde el producto de lecitina hidrolizado comprende al menos un 60% de materiales insolubles en acetona.
40. El método de la Reivindicación 35, en donde la lipasa es Lipozyme.

41. Un método para producir mediante hidrólisis enzimática un producto que comprende fosfolípidos, monoglicéridos y diglicéridos, método que comprende:
- 5 poner un material de lecitina, que comprende un componente de fosfolípidos y un componente de triglicéridos, en contacto con una lipasa en ausencia de una fosfolipasa para crear una mezcla de reacción en un medio disolvente orgánico que comprende un disolvente orgánico aprótico y agua suficiente para promover la hidrólisis, en donde la lipasa hidroliza selectivamente los triglicéridos; y
- obtener de la mezcla de reacción el producto de lecitina hidrolizado, en donde la operación de puesta en contacto se lleva a cabo en presencia de una membrana eficaz para separar los fosfolípidos, los monoglicéridos y los diglicéridos de los ácidos grasos liberados.
- 10 42. El método de la Reivindicación 41, en donde el material de lecitina está compuesto de al menos un 40% del componente de fosfolípidos.
43. El método de la Reivindicación 41, en donde el material de lecitina comprende al menos un 60% de material insoluble en acetona.
- 15 44. El método de la Reivindicación 41, en donde el producto de lecitina hidrolizado comprende al menos un 56% de materiales insolubles en acetona y tiene un índice de acidez inferior a 45 mg de KOH/gramo.
45. El método de la Reivindicación 41, en donde el producto de lecitina hidrolizado comprende al menos un 60% de materiales insolubles en acetona.
46. El método de la Reivindicación 41, en donde la lipasa es Lipozyme.
- 20 47. El método de la Reivindicación 7, en donde el componente de fosfolípidos compone del 50% al 85% del producto de retención.
48. El método de la Reivindicación 24, en donde el componente de fosfolípidos compone del 50% al 85% del producto de retención.
49. El método de la Reivindicación 35, en donde el componente de fosfolípidos compone del 50% al 85% del producto de retención.