(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 523 300**

(51) Int. CI.:

C11B 3/00 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2008 E 08728362 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.08.2014 EP 2118248**

(54) Título: **Desgomado enzimático utilizando una mezcla de fosfolipasas PLA y PLC**

(30) Prioridad:

30.01.2007 US 668921
11.09.2007 US 853339

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.11.2014

(73) Titular/es:

BUNGE OILS, INC (100.0%)
11720 BORMAN DRIVE
ST. LOUIS, MO 63146, US

(72) Inventor/es:

DAYTON, CHRISTOPHER, L.G.;
ROSSWURM, ERIN, MARIE y
GALHARDO, FLAVIO, DA SILVA

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

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

Desgomado enzimático utilizando una mezcla de fosfolipasas PLA y PLC

Campo de la invención

Esta solicitud se refiere a un método enzimático para separar varios fosfolípidos y lecitinas (colectivamente conocidos como “gomas”) de aceites vegetales para producir un producto, aceite o grasa desgomada que puede usarse para la producción de alimentos y/o aplicaciones no alimentarias. Más particularmente, esta solicitud se refiere a un método para el tratamiento enzimático y la separación de varios fosfolípidos y lecitinas, método que puede practicarse con aceites brutos o aceites desgomados con agua. En una realización, la reacción enzimática o el período de tratamiento enzimático puede ser menor que aproximadamente una hora.

Antecedentes de la invención

Los aceites vegetales brutos obtenidos por métodos de prensado o de extracción con disolventes son una mezcla compleja de triacilgliceroles, fosfolípidos, esteroles, tocoferoles, ácidos grasos libres, metales traza y otros compuestos minoritarios. Es deseable separar los fosfolípidos, los ácidos grasos libres y los metales traza con el fin de producir un aceite de calidad para ensaladas con un gusto suave, color claro y una larga vida durante el almacenamiento.

La separación de los fosfolípidos genera casi todas las pérdidas asociadas con el refinado de los aceites vegetales. Como se ilustra en la Fig. 1, los fosfolípidos contienen un grupo fosfato sobre uno de los dos extremos de la cadena de glicerol, mientras que un triacilglicerol contiene al menos un ácido graso.

El grupo fosfato del fosfolípido es “hidrófilo” o “amante del agua”, lo que significa que el grupo funcional X se siente atraído por el agua. Las cadenas R1 y R2 de ácido graso de los fosfolípidos son “lipófilas” o “amantes de los lípidos”, lo que significa que se sienten atraídas por los lípidos. Puesto que la molécula de fosfolípido posee tanto un grupo funcional hidrófilo como cadenas lipófilas de ácidos grasos es un excelente emulsionante natural.

El grupo funcional del fosfolípido que contiene el grupo fosfato denotado en la Fig. 1 como “X” determina el grado de su naturaleza hidrófila. El grupo funcional X en la Fig. 1 puede ser cualquiera de varios de una diversidad de tipos conocidos, unos pocos de los cuales se ilustran en la Fig. 2.

Los fosfolípidos que contienen los grupos funcionales colina y etanolamina tienen la mayor afinidad por el agua, mientras que los ácidos, las sales de ácidos (de calcio, magnesio y hierro) y el inositol tienen una afinidad por el agua mucho menor. El ácido fosfatídico y las sales del ácido fosfatídico son comúnmente conocidos como “Fosfolípidos no Hidratables” o NHPs. Los fosfolípidos son comúnmente medidos en aceite como “contenido de fósforo” en partes por millón. La Tabla 1 contiene las cantidades típicas de fosfolípidos presentes en los principales cultivos de semillas oleaginosas, y la distribución de los diversos grupos funcionales como porcentaje de los fosfolípidos presentes en el aceite.

Composición de fosfolípidos

Tabla 1. Concentraciones típicas y distribuciones de fosfolípidos en semillas oleaginosas comunes

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

Los fosfolípidos pueden separarse parcial o totalmente de los aceites vegetales por medio de diferentes medios conocidos. Los procedimientos más comúnmente usados en la industria son el desgomado con agua, el desgomado ácido, el refinado cáustico y el desgomado enzimático.

Desgomado con agua

Esta técnica se aplica usualmente a aceites brutos que contienen una alta cantidad de fosfolípidos hidratables. Debido a sus suaves características, los fosfolípidos obtenidos pueden ser usados como lecitina (un emulsionante natural). En general, al aceite obtenido mediante esta técnica se le refiere en la industria como que está

"desgomado", a pesar de estar sólo parcialmente desgomado. Puesto que el aceite desgomado con agua aún contiene altas cantidades de fosfolípidos, especialmente fosfolípidos no hidratables, puede requerirse el uso de otras técnicas de procesado, tales como el refinado cáustico o el desgomado con la enzima PLA1, para producir un aceite acabado de alta calidad que tenga alta estabilidad y poco color.

En el procedimiento de desgomado con agua se añade agua (1 a 5% en peso) a un aceite bruto a 60-75ºC con vigoroso mezclado. A continuación, el aceite se mezcla suavemente durante 15 a 60 minutos para ayudar a la hidratación de los fosfolípidos presentes en el aceite. La hidratación de los fosfolípidos o "gomas" provoca que las gomas se hinchen y aglomeren como un floculante. El floculante es una emulsión o mezcla de gomas hidratadas y aceite. La emulsión tiene un peso específico mayor que el del aceite y puede separarse por sedimentación, filtración o la práctica industrial de centrifugación. La centrífuga da dos corrientes, aceite desgomado con agua y gomas húmedas. El procedimiento de desgomado separa predominantemente sólo los fosfolípidos hidratables. Los restantes fosfolípidos (50 a 250 ppm), medidos como las sales del ácido fosfatídico y/o PI, pueden separarse en operaciones subsiguientes de procesado.

Las gomas húmedas separadas son una mezcla del aceite emulsionado que contiene al menos una molécula de triacilglicerol (o aceite) por cada dos moléculas de fosfolípido (o goma). Este aceite emulsionado no puede separarse o recuperarse físicamente de la emulsión y se considera una pérdida de procesado. Las gomas pueden secarse y venderse como lecitina de grado alimentario, pero usualmente se usan como un subproducto en otras aplicaciones tales como alimentación animal o en un procedimiento industrial, con un menor valor económico.

La pérdida de aceite por formación de la emulsión es significativa, con un impacto negativo en el balance económico global sobre el coste de procesado del aceite refinado.

Desgomado ácido

Esta técnica se aplica usualmente a aceites brutos cuando el objetivo es la separación total de los fosfolípidos. El aceite obtenido es usualmente denominado en la industria "super desgomado" o "totalmente desgomado".

El aceite bruto se trata con 250 a 2000 ppm de ácido fosfórico o ácido cítrico a 60-90ºC con vigoroso mezclado. El ácido se deja reaccionar con las sales de los NHPs durante un período de 10 a 90 minutos. El ácido mejora la naturaleza hidrófila de los NHPs, ayudando así a su separación. A continuación, se añade agua (1 a 5% en peso) al aceite bruto tratado con ácido a 60-75ºC con vigoroso mezclado. A continuación, el aceite se mezcla suavemente durante 15 a 60 minutos para ayudar a la hidratación de los fosfolípidos. La hidratación de los fosfolípidos o "gomas" provoca que las gomas se hinchen y aglomeren como un floculante. El floculante es una emulsión o mezcla de gomas hidratadas y aceite. La emulsión tiene un peso específico mayor que el del aceite y puede separarse por sedimentación, filtración o la práctica industrial de centrifugación. La centrífuga da un aceite desgomado con ácido y una goma húmeda. El procedimiento de desgomado con ácido separa la mayoría de los fosfolípidos, pero bastantes aún permanecen (25 - 100 ppm) en el aceite desgomado para requerir un procesado adicional. Para aplicaciones alimentarias, el aceite desgomado con ácido usualmente se envía a un procedimiento de blanqueo y desodorización, procedimiento conocido en la industria como "refinado físico". Las gomas tratadas con ácido no pueden ya usar como lecitina grado alimentario.

Como en el procedimiento de desgomado con agua, las gomas separadas y secas en el procedimiento de desgomado con ácido contienen al menos una molécula de triacilglicerol (o aceite) por cada dos moléculas de fosfolípido (o goma). Este aceite emulsionado no puede separarse o recuperarse físicamente y se considera una pérdida de procesado, con un impacto económico negativo en el balance económico global del coste de procesado del aceite refinado.

Refinado cáustico

Esta técnica se aplica usualmente a aceites brutos o desgomados con agua cuando el objetivo es separar todos los fosfolípidos y los ácidos grasos.

El aceite bruto o desgomado con agua se trata con 200 a 1000 ppm de ácido fosfórico o cítrico a 60-90ºC con vigoroso mezclado. El ácido se deja reaccionar de 10 a 90 minutos con las sales de los NHPs. El ácido mejora la naturaleza hidrófila de los NHPs, ayudando así a su separación. Una disolución de hidróxido de sodio diluida (10 – 18% en peso) se añade al aceite tratado con ácido a 60-75ºC. La cantidad de hidróxido de sodio (sosa cáustica) está basada en la cantidad de ácidos grasos libres presentes en el aceite así como un exceso de entre 0,05 a 0,20% respecto a base seca. La disolución cáustica neutraliza los ácidos grasos libres (que producen jabones de sodio), neutraliza el ácido en exceso y, con los jabones de sodio creados, ayuda a hidratar y emulsionar todos los fosfolípidos restantes.

La disolución de hidróxido de sodio/aceite se mezcla durante aproximadamente 10 minutos, luego se separa por sedimentación, filtración o industrialmente por centrifugación. La centrífuga da un aceite tratado con sosa cáustica y materia grasa para fabricación de jabón. El aceite tratado con sosa cáustica se "lava" a continuación con 10 a 20% de agua ablandada a 90-95ºC y se centrifuga otra vez. El aceite de la centrífuga se conoce como "Una Vez Refinado" y el agua se conoce comúnmente como "Agua de Lavado". Para aplicaciones alimentarias, el aceite "una

vez refinado" se envía usualmente a su blanqueo y desodorización para producir aceite para ensaladas. Una alternativa al lavado con agua es tratar el aceite tratado con sosa cáustica con un gel de sílice absorbente y separar por filtración los jabones residuales y los fosfolípidos no separados en la centrifugación inicial.

Como con los procedimientos de desgomado con agua y con ácido, las gomas separadas y secas del procedimiento de refinado con sosa cáustica contienen al menos una molécula de triacilglicerol (o aceite) por cada dos moléculas de fosfolípido (o goma). Este aceite emulsionado no puede separarse o recuperarse físicamente y se considera una pérdida de procesado. Adicionalmente, el hidróxido de sodio reaccionará con el aceite neutro para formar jabones, reduciendo de este modo el rendimiento global de aceite con un impacto económico negativo en el balance económico global sobre el coste de procesado del aceite refinado.

Tratamiento enzimático

Aún otra técnica de refinado usada en la industria de los aceites vegetales es el "refinado enzimático" o "desgomado enzimático". El desgomado enzimático se usa cuando el objetivo es la separación total de fosfolípidos. En general, los tratamientos de desgomado enzimático de la técnica anterior han sido practicados sobre aceites que han sido desgomados previamente mediante uno de los otros métodos, típicamente el desgomado con agua. Para aplicaciones alimentarias, el aceite desgomado con enzimas se envía secuencialmente a blanqueo y desodorización, un procedimiento conocido en la industria como "refinado físico". El desgomado enzimático proporciona un mejor rendimiento de aceite que los desgomados con agua, con ácido o con sosa cáustica, con mejores resultados económicos.

La reacción enzimática cambia la naturaleza del fosfolípido, escindiendo algunas de las partes del fosfolípido. Esto reduce las propiedades de emulsionamiento del fosfolípido de modo que se pierde menos aceite cuando las gomas son separadas del aceite, ahorrando así aceite. Los enzimas que exhiben actividad con los fosfolípidos son comúnmente denominadas "fosfolipasas". Los tipos de fosfolipasas están basados en la posición de la molécula de fosfolípido en la cual reacciona la enzima, y son conocidos como PLA1, PLA2, PLC y PLD. Las posiciones sobre la molécula de fosfolípido en las cuales reaccionan los diferentes tipos de fosfolipasas se ilustran en la Fig. 3.

Puede verse en la Fig. 3 que diferentes tipos de fosfolipasas darán diferentes compuestos tras reaccionar con los fosfolípidos. Además, cada tipo de fosfolipasa tiene su propia velocidad de reacción y sus condiciones de reacción óptimas en términos de pH, % de agua y temperatura. Cuando se usa sola la PLA requiere en general un tiempo de reacción de al menos aproximadamente 4 horas, mientras que cuando se usa sola la PLC en general requiere un tiempo de reacción de aproximadamente una hora. Se sabe que el tratamiento enzimático debe ocurrir a un pH menor o igual que 8, con el fin de minimizar la saponificación indeseable del aceite, pero la PLA tiene un pH óptimo de reacción de 4,5, mientras que la PLC tiene un pH óptimo de reacción de 7,0. Cada enzima también tiene tolerancias térmicas diferentes. Las enzimas PLA se desnaturalizan a aproximadamente 50ºC mientras que las enzimas PLC se desnaturalizan a aproximadamente 65ºC.

Las secuencias de aminoácidos con actividad de fosfolipasa están extensamente reflejadas en la bibliografía y descritas en patentes, y se ha informado que algunas de ellas tienen actividad sobre los fosfolípidos presentes en aceites vegetales. Todo esto es conocido en la técnica.

Un producto comercial con enzima PLA1 con actividad fosfolipasa es la fosfolipasa A1 Lecitase® Ultra de Novozymes. Se sabe que este producto da liso-fosfolípidos polares y ácidos grasos polares cuando se mezcla con aceite desgomado con una disolución amortiguadora del pH en agua de ácido cítrico al 1% -NaOH al 1,5% a 4,5 < pH < 7,0 y 40ºC < T < 55ºC, como se describe en la Hojas de Solicitud de Novozymes Oils & Fats nºs 2002-185255-01 y 2002-05894-03. La PLA1 hidroliza selectivamente el ácido graso opuesto al grupo funcional fosfato sobre la cadena de glicerol, como se ilustra en la Fig. 4.

La reacción resultante da un liso-fosfolípido y un ácido graso. La molécula de liso-fosfolípido ha perdido un grupo funcional hidrófilo, y el restante grupo alcohol en el sitio de reacción es hidrófilo. Ahora, con dos sitios hidrófilos, la molécula de liso-fosfolípido es soluble en agua, y ha perdido sus propiedades de emulsionamiento. El procedimiento de desgomado con PLA1 reduce así las pérdidas de refinado no separando ya ningún aceite neutro con las gomas, y la única pérdida es la molécula original de fosfolípido.

Aunque el desgomado enzimático ofrece ventajas significativas a los procesadores de aceite también posee ciertas desventajas. Una desventaja es que la reacción de la enzima con los fosfolípidos puede ser lenta y consume tiempo. En particular, la reacción de enzimas tipo fosfolipasa A con fosfolípidos puede durar muchas horas, dependiendo de variables de reacción tales como el pH, la temperatura, las concentraciones relativas y las condiciones de mezcla. Tales tiempos de reacción prolongados pueden tener un impacto negativo significativo sobre el valor económico global de los procedimientos de desgomado enzimático. Debido a la lentitud de la reacción de PLA, el desgomado enzimático se lleva típicamente a cabo en composiciones de aceite que han sido sometidas en primer lugar al desgomado con agua. Así, el aceite tiene que ser desgomado dos veces para obtener un producto que tenga una concentración de fósforo lo bastante baja para sus fines previstos.

Se sabe en la técnica que las enzimas PLC reaccionan con un fosfolípido hidrolizando selectivamente el grupo funcional fosfato, como se muestra en la Fig. 5. La reacción resultante da un diacilglicerol ("DAG") y un grupo

fosfatídico. La molécula de diacilglicerol no tiene ya el grupo funcional fosfato y no necesita separarse. El procedimiento de desgomado con PLC reduce las pérdidas del refinado reteniendo la molécula original de fosfolípido, a la vez que separa sólo el grupo funcional fosfato. Sin embargo, las enzimas PLC no reaccionan con todos los fosfolípidos presentes en el aceite. En general, las enzimas PLC no reaccionan con el ácido fosfatídico (PA) o el inositol fosfatídico (PI), ilustrados en la Fig. 2. Con todo, tanto PA como PI son fosfátidos no hidratables que permanecen en el aceite después del desgomado con agua. Así, el aceite tratado con PLC tiene que tratarse adicionalmente con sosa cáustica para separar las gomas residuales.

Se sabe que ciertas enzimas PLCs reaccionarán sólo con ciertos grupos fosfatídicos. Por ejemplo, es conocida una enzima PLC específica de PI, identificada como PI-PLC.

Es por tanto un aspecto de la invención proporcionar un método para el desgomado enzimático de aceites en el que la velocidad de la reacción enzimática es más rápida que en los procedimientos de desgomado enzimático de la técnica anterior.

Es otro aspecto de la invención proporcionar un método para aumentar la velocidad de reacción de una enzima tipo fosfolipasa A usada en un procedimiento de desgomado enzimático.

Es aún otro aspecto de la presente invención proporcionar un método para desgomar una composición oleosa en la cual pueden ser tratados en un único procedimiento tanto fosfolípidos hidratables como no hidratables.

Es aún otro aspecto de la presente invención proporcionar tales métodos de tratamiento y desgomado enzimático donde la reacción enzimática tiene una duración de menos que aproximadamente una hora.

Las siguientes referencias se relacionan con la técnica de desgomado enzimático de aceites.

El documento US 5.264.367, de Aalrust et al., describe el uso de fosfolipasas A1, A2 o B para tratar un aceite que ha sido refinado en primer lugar hasta una concentración de fósforo de 50 a 250 ppm. La tecnología descrita en esta patente es comercialmente conocida como Enzymax®. Aalrust especifica que puesto que estas enzimas atacan a la lecitina “no tendría ningún sentido usar el método de la invención en aceites que tengan un alto contenido de lecitina, tales como el aceite de soja bruto”. La reacción se lleva a cabo a una temperatura de 20 – 80ºC, con ácido cítrico o una de sus sales a un intervalo de pH de 3-7. Se especifica que la enzima debe distribuirse por todo el aceite, con la disolución de enzima-agua presente como gotitas de un diámetro menor que 10 μm. La forma de medir y los cálculos del promedio en peso no fueron descritos. Para disolver las fosfolipasas obtenidas a partir del páncreas o de productos del páncreas se usa un emulsionante, el cual contiene grasa. Aalrust especifica que debido a que el aceite contiene menos que 5 ppm de fósforo, es adaptable para ser físicamente refinado a un aceite comestible. Posteriormente, detalles de la tecnología descrita por Aalrust fueron descritos en varias publicaciones (Dahlke, K. y Eichelsbacher, M., Enzymax® y Alcon® - *Lurgi´s route to Physical Refining in Proceeding of the World Conference on Oilseed and Edible Oils Processing*, Estambul, Turquía, 1996, ed. Kaseoglu, Rhee y Wilson; Dalke, K. et al., First Experiences with Enzymatic Oil Refining, Inform, vol. 6, N. 12, Dec 1995). Los datos descritos en estas publicaciones para pruebas industriales refuerzan el uso de la tecnología referida en aceites con un contenido de P que varía de 40 a 180 ppm, y no mayor. También se describe que “el procedimiento no requiere ningún equipamiento especial. Todas las bombas, agitadores, mezcladores e intercambiadores de calor así como la centrífuga son de diseño estándar y pueden ser adquiridos de varios proveedores”. Dahlke, K. y Eichelsbacher, M., Enzymax® y Alcon® - Lurgi´s route to Physical Refining in Proceeding of the World Conference on Oilseed and Edible Oils Processing, Estambul, Turquía, 1996, ed. Kaseoglu, Rhee y Wilson, página 56.

El documento U.S. 5.532.163, de Yagi et al., describe un método enzimático que usa al menos 30 partes en peso de agua, y preferiblemente 50-200 partes en peso de agua, por 100 partes en peso de aceite o grasa, para la reacción de las fosfolipasas A1, A2 o B con un aceite que contiene 100 a 10.000 ppm de fósforo. A continuación, el aceite se lava con 30% a 200% partes en peso de agua o de una disolución acuosa ácida por 100 partes en peso de aceite o grasa. La carga total de agua que requiere utilizar el procedimiento varía de 60% a 400% p/p de aceite procesado. La producción de tal gran efluente en una planta industrial hace que este método no sea económico.

El documento U.S. 6.001.640, de Loeffler et al., describe un procedimiento en el que uno o más aceites vegetales que contienen componentes que contienen fósforo se someten a una mezcla de fosfolipasas obtenidas de Aspergillus, mezcla que comprende una enzima que tiene actividad A1, actividad A2, o ambas, y una enzima que tiene actividad de lisofosfolipasa. La patente especifica que, puesto que la fosfolipasa atacaría a la lecitina, no es práctico usar ese método con aceites con un alto contenido de lecitina, tales como el aceite de soja bruto.

Loeffler et al. describen que la reacción enzimática debe ejecutarse a un pH de menos que 4, y con un tamaño de gota en la emulsión que es inferior a 20 μm. La forma de medida y los cálculos del promedio en peso del tamaño de gota de la emulsión no fueron descritas. La patente especifica que el producto resultante tendrá una concentración de P residual de 15 ppm o menos. En la técnica se sabe que el sometimiento el aceite a un pH tan bajo como 4, o menor, provocará que las gomas presentes en el aceite se hidraten y se separen del medio de reacción. Las gomas hidratadas actuarán como agentes emulsionantes tal que cuando se separen llevarán el aceite con ellas, causando así la pérdida de aceite. No se presenta ningún dato sobre la pérdida de aceite en las gomas.

El documento U.S. 6.103.505, de Clausen et al., describe el descubrimiento y actividad de ciertas fosfolipasas (A1, A2 o B) para usar en la separación enzimática de fosfolípidos, y un método para producir las enzimas. El procedimiento de desgomado enzimático utiliza el método descrito en el documento US 5.264.367 sin ninguna etapa de proceso adicional.

El documento U.S. 6.127.137, de Hasida et al., describe el descubrimiento y actividad de ciertas fosfolipasas capaces de separar ambos grupos acilo grasos presentes en una molécula de fosfolípido cuando se mezclan con el aceite desgomado (50 a 250 ppm de fósforo) con un contenido de agua de 0,5 – 5%, pH de 1,5 – 3, temperatura de 30 – 45ºC y un tiempo de 1 a 12 horas.

El documento U.S. 6.143.545, de Clausen et al., describe el descubrimiento y actividad de ciertas fosfolipasas (A1, A2 o B) para usar en la separación enzimática de fosfolípidos, y un método para producir las enzimas. El procedimiento de desgomado enzimático utiliza el método descrito en el documento US 5.264.367 sin ninguna etapa de proceso adicional.

El documento U.S. 6.548.633, de Edwards et al., describe secuencias de proteínas secretadas que codifican cDNA. En la columna 44, la patente especifica que la proteína de esa invención puede usarse en el fosfolípido enzimático de los aceites vegetales que se describen en el documento US 6.001.640, anteriormente citado. La patente especifica además en el mismo párrafo que la proteína de esa invención puede combinarse en un “cóctel” con otras enzimas para mejorar la utilización del pienso en los animales.

La Solicitud de Patente de EE.UU. nº de Serie 10/556.816, de Dayton et al., describe un procedimiento mejorado de desgomado enzimático en el que el pH de la reacción enzimática tamponada es disminuido por debajo de 4,5 después de que la reacción enzimática haya terminado, eliminando de este modo el ensuciamiento del equipo, particularmente de los intercambiadores de calor y de la centrífuga de separación, que se produciría por la precipitación de las sales de calcio y magnesio al pH óptimo requerido para la actividad enzimática.

La Solicitud de Patente de EE.UU. nº de Serie 2004/0005399 A1, de Chakrabarti et al., describe un método enzimático que utiliza una adición simple de enzima y sistema de amortiguación del pH y un tiempo de retención/reacción corto, seguido por blanqueo con una tierra blanqueante al 2-4% y carbón activado al 0-1%, y luego desparafinado para conseguir un aceite con un contenido de fósforo de 5 ppm. Tanto el procedimiento de blanqueo como el procedimiento de desparafinado separarán fósforo residual del aceite. Adicionalmente, Chakrabarti et al. especifican que la pérdida de aceite en las gomas está en el intervalo de 30-40% de las gomas separadas, sugiriendo que la reacción enzimática no llega a terminar, dando lugar a elevadas pérdidas de aceite debido al emulsionamiento del aceite en los fosfolípidos separados.

El documento U.S. 2005/0059130 A1, de Bojsen et al., describe el descubrimiento y actividad de ciertas fosfolipasas para usar en la separación enzimática de fosfolípidos, y un método para producir las enzimas. La publicación se refiere al tratamiento de aceites vegetales para reducir el contenido de fosfolípidos que se describe en el documento US 5.264.367.

El documento U.S. 2005/0108789 A1, de Gramatikova et al., ahora patente de EE.UU. nº 7.226.771, pretende describir fosfolipasas (por ej., enzimas fosfolipasas A, B, C, D con dominios patatina) que escinden eficientemente las uniones glicerolfosfato en aceites, tales como aceites vegetales, para generar una base fosforilada extraíble en agua y un digicérido. En el párrafo 108, la solicitud especifica además que tales fosfolipasas pueden usarse para el desgomado enzimático de aceites vegetales, y que las PLCs de la invención pueden usarse además de o en lugar de las PLA1s y PLA2s en el desgomado comercial de aceites, tal como en el procedimiento ENZYMAX®, en el que los fosfolípidos son hidrolizados por PLA1 y PLA2. En el párrafo 474, la solicitud especifica que la enzima PLC puede usarse sola o con la enzima PLA para separar los fosfolípidos no hidratables del aceite que ha sido previamente desgomado con agua, pero no proporcionan condiciones de reacción para el uso conjunto de las dos enzimas. Como las condiciones de reacción óptimas de la enzima PLA y de la enzima PLC son diferentes, esta declaración en la solicitud sin ningún ejemplo de trabajo no muestra a un experto en la técnica cómo usar simultáneamente las enzimas PLA y PLC. La solicitud además especifica que las fosfolipasas C, D1 y D2 pueden emplearse en el desgomado enzimático de aceites previamente desgomados o no desgomados (brutos) y como ayuda en el refinado con sosa cáustica.

El documento WO 99/53001 A1, de Clausen et al., describe un procedimiento para reducir enzimáticamente el contenido de componentes que contienen fósforo en un aceite comestible. El método comprende el uso de una fosfolipasa y una baja cantidad de agua. El desgomado enzimático del aceite se realiza a un pH de 1,5 a 8 con una disolución acuosa de una fosfolipasa A1, una fosfolipasa A2, o una fosfolipasa B. El documento WO 99/53001 A1 no muestra ni que la reacción de desgomado pueda llevarse a cabo con una combinación de enzimas fosfolipasa A y fosfolipasa C ni da condiciones de reacción para el uso conjunto de las dos enzimas.

El documento DE 4339556 C1, de Buchold et al., describe que un aceite vegetal a desgomar se ajusta a un pH de 3 a 6 y se mezcla con una disolución acuosa de una enzima que contiene una de las enzimas fosfolipasas A1, A2 o B. Se deja que las enzimas actúen en el aceite con agitación a temperaturas de 20 a 90ºC en un reactor de desgomado. Se añade un auxiliar de separación o un agente solubilizante al líquido extraído del reactor de

desgomado a temperaturas de 20 a 90ºC antes o después de separar el aceite desgomado. Se obtiene una disolución en gran parte exenta de lodos que contiene la enzima usada la cual se recicla, al menos parcialmente, antes del reactor de desgomado. La proporción de enzimas reciclados usados en la cantidad total de enzimas dispersada en el aceite es al menos 10%. El documento DE 4339556 C1 no muestra ni que la reacción de desgomado pueda llevarse a cabo con una combinación de enzimas fosfolipasa A y fosfolipasa C ni da condiciones de reacción para el uso conjunto de las dos enzimas.

El documento JP 06306386 A, de Tsuruoka et al., describe el desgomado enzimático de aceite con la enzima fosfolipasa C. El documento JP 06306386 A no da condiciones de reacción para el uso de la combinación de las dos enzimas fosfolipasa A y fosfolipasa C juntas incluyendo la cantidad de enzimas fosfolipasa A y fosfolipasa C.

Sumario de la invención

La invención se refiere a un método para desgomar una composición oleosa, método que comprende:

(a) Proporcionar una composición oleosa que contenga una cantidad de fosfolípidos,

(b) Poner en contacto dicha composición oleosa simultáneamente con una o más enzimas fosfolipasa A en una cantidad de aproximadamente 2 ppm de enzima activa o menos y una o más enzimas fosfolipasa C en una cantidad de aproximadamente 30 ppm de enzima activa o menos, en condiciones suficientes para que las enzimas reaccionen con los fosfolípidos para crear productos de reacción fosfolipídicos, y

(c) Separar los productos de reacción fosfolipídicos de la composición oleosa, siendo la composición oleosa restante después de la separación una composición oleosa desgomada,

Mediante lo cual durante la etapa (b) la reacción de dicha una o más enzimas fosfolipasa A transcurre a una velocidad más rápida que la que se daría en ausencia de dicha una o más enzimas fosfolipasa C, donde la duración de la reacción de las enzimas con los fosfolípidos es menor que una hora, y donde dicha reacción de las enzimas con los fosfolípidos se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 3-7 a una temperatura de aproximadamente 40-80ºC, y la composición oleosa desgomada de la etapa (c) tiene un contenido de fosfolípidos, medido como partes por millón de fósforo, de aproximadamente 20 ppm o menos. En una realización preferida, la duración de la reacción de la etapa (b) continúa durante aproximadamente 30 minutos.

La cantidad de agua necesaria para el procedimiento de la presente invención puede ser menor que aproximadamente 5% y ventajosamente puede reducirse a menos que aproximadamente 3%, y preferiblemente a aproximadamente 1,5-2,0%.

El pH del sistema puede ajustarse antes o después de la adición de una o todas las enzimas a la composición oleosa. El rendimiento de aceite se maximiza sobre la base de la composición de fosfolípidos contenidos en el producto bruto.

Específicamente, esta invención se relaciona con un método en el cual se usan conjuntamente tanto una enzima fosfolipasa C (PLC) como una enzima fosfolipasa A (PLA) en una reacción enzimática para separar fosfolípidos presentes en el aceite. Más específicamente, esta invención se refiere a añadir en combinación una fosfolipasa C (PLC) y/o una fosfolipasa C fosfatidil-inositol específica (PI-PLC) con fosfolipasa A1 (PLA1) y/o fosfolipasa A2 (PLA2) para maximizar el rendimiento de aceite y reducir la cantidad de productos residuales producidos. Sorprendentemente, se ha encontrado que la cinética de las reacciones enzimáticas transcurre mucho más rápidamente que la esperada cuando las dos enzimas se usan conjuntamente que cuando cada una se usa separadamente. Además, se ha encontrado que las reacciones transcurren más rápidamente que lo esperado incluso si las condiciones de reacción no están optimizadas para al menos una de las enzimas. Además, se ha encontrado que la reacción puede transcurrir en menos que aproximadamente una hora, y puede transcurrir tan rápidamente como en aproximadamente treinta minutos.

Ventajosamente, el aceite tratado puede ser un aceite bruto o un aceite desgomado en agua. Las enzimas pueden añadirse al aceite separada o conjuntamente, pero las dos enzimas estarán en contacto simultáneo con el aceite. Según la invención, los parámetros de la reacción enzimática, tales como la concentración de agua, el pH, el tiempo de agitación y la concentración de enzimas, pueden controlarse para optimizar la reacción para una combinación particular de enzimas en un sistema oleoso particular.

Descripción de las figuras

La Fig. 1 ilustra las estructuras químicas de fosfolípidos genéricos y de triacilgliceroles genéricos.

La Fig. 2 ilustra grupos funcionales y estructuras de fosfolípidos comunes.

La Fig. 3 ilustra las posiciones sobre la molécula de fosfolípido en las cuales reaccionan los diferentes tipos de fosfolipasas.

La Fig. 4 ilustra la reacción de un fosfolípido con una enzima PLA1 y los productos resultantes.

La Fig. 5 ilustra la reacción de un fosfolípido con una enzima PLC y los productos resultantes.

La Fig. 6 es un gráfico que sumariza los resultados de los ejemplos 13-30, en el cual se representa el fósforo residual promedio en la muestra desgomada para cada nivel de cada factor experimental que se evalúa.

La Fig. 7 es un gráfico que sumariza los resultados de los ejemplos 31-38, en el cual se representa el fósforo residual promedio en la muestra desgomada para cada nivel de cada factor experimental que se evalúa.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una mejora en un procedimeinto para desgomar enzimáticamente una composición oleosa. Los inventores han encontrado que, sorprendentemente, usando una combinación de enzimas puede mejorarse la cinética de reacción de la escisión de fosfolípidos. En particular, un procedimiento de desgomado enzimático llevado a cabo con una combinación de una enzima fosfolipasa C con una enzima fosfolipasa A proporciona un producto oleoso desgomado con un menor contenido de fósforo en un tiempo de reacción más corto que el que se conseguiría con fosfolipasa A sola. Además, sorprendentemente se ha encontrado que la reacción puede transcurrir en menos que aproximadamente una hora, y pueede transcurrir tan rápidamente como en aproximadamente treinta minutos. Esto es particularmente inesperado porque cuando PLA se usa sola en general requiere un tiempo de reacción de al menos aproximadamente 4 horas, mientras que cuando PLC se usa sola en general requiere un tiempo de reacción de aproximadamente una hora. Por otra parte, PLA tiene un pH de reacción óptima de 4,5, mientras que PLC tiene un pH de reacción óptima de 7,0. Cada enzima también tiene tolerancias térmicas diferentes. La enzima PLA se desnaturaliza a aproximadamente 50ºC mientras que la enzima PLC se desnaturaliza a aproximadamente 65ºC. Además, en la técnica se sabe que la estabilidad térmica de las enzimas puede mejorarse vía mutaciones específicas de sitio. Tales enzimas clonadas pueden ser térmicamente estables a temperaturas tan altas como 80ºC, y el uso de tales enzimas clonadas está contemplado en la presente invención.

La reducción del tiempo de reacción se evidencia mediante la enzima PLA. Ccuando se usa en combinación con la enzima PLC, el tiempo de reacción es drásticamente reducido, y en algunas realizaciones puede ser menor que aproximadamente 1 hora, incluso en condiciones de reacción ácidas que no son óptimas para la enzima PLC. Los inventores han encontrado además que en condicciones apropiadas es posible reducir el tiempo de reacción a uno tan bajo como aproximadamente 30 minutos.

Se ha encontrado que la concentración de agua puede ajustarse para que reúna las necesidades de un entorno de proceso particular. Por tanto, cuando se desea reducir la cantidad de agua residual producida por el procedimiento, la concentración de agua puede disminuirse hasta aproximadamente 1-2%, y particularmente hasta aproximadamente 1,5%. Altrnativamente, cuando se desea aumentar la eficiencia del procedimiento de desgomado, la concentración de agua puede aumentarse hasta aproximadamente 4-5%, y particularmente hasta aproximadamente 4,5%.

Es una ventaja de la presente invención que el aceite a desgomar puede ser un aceite bruto, o previamente desgomarse mediante uno de los métodos de la técnica anterior. Es una ventaja distinta para el procesador de aceites ser capaz de conseguir el desgomado de los aceites en una única etapa. Los aceites que pueden tratarse según la presente invención pueden incluir, pero no se limitan a, los siguientes: aceite de canola, aceite de ricino, aceite de coco, aceite de cilantro, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de avellana, aceite de cáñamo, aceite de linaza, aceite de semilla de mango, aceite de hierba de la pradera, aceite de pata de buey, aceite de oliva, aceite de palma, aceite de palmiste, oleína de palma, aceite de colza, aceite de salvado de arroz, aceite de cártamo, aceite de camelia, aceite de soja, aceite de semilla de girasol, aceite de resina, aceite de tsubaki y aceite vegetal.

La enzima fosfolipasa A usada en el método de la presente invención puede ser una enzima fosfolipasa A1 o una enzima fosfolipasa A2. La enzima fosfolipasa C usada en la presente invención puede ser una fosfolipasa C o una fosfolipasa C inositol específica. Muchas variedades de enzimas de las familias fosfolipasa A y fosfolipasa C están comercialmente disponibles; y está contemplado que tales enzimas y sus equivalentes serán adecuados para usar en la presente invención.

En el método de la invención, las diferentes fosfolipasas usadas conjuntamente en un procedimiento de desgomado enzimático de la presente invención pueden mezclarse conjuntamente antes de añadirse al aceite a ser tratado. Alternativamente, pueden añadirse al aceite separada, o secuencial o simultáneamente. Ya se añadan secuencial o simultáneamente, la reacción enzimática transcurrirá en algún momento con ambas enzimas presentes en la mezcla de reacción.

El procedimiento de desgomado de la presente invención se lleva a cabo a un pH inferior a aproximadamente 8, preferible entre aproximadamente 3-7, y lo más preferiblemente aproximadamente 4-5. El pH del procedimiento de desgomado enzimático puede conseguirse mediante la adición de disoluciones amortiguadoras del pH conocidas. Es bien conocido que el ácido cítrico y el hidróxido de sodio son adecuados para este fin. Cuando se necesite ajustar el pH en condiciones de reacción específicas pueden usarse otras disoluciones amortiguadoras del pH.

La temperatura del procedimiento de desgomado enzimático de la presente invención puede estar en el intervalo de aproximadamente 40-80ºC, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 40-60ºC, y más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 45-55ºC. Sorprendentemente, se ha encontrado que, en los métodos de la presente invención, el desgomado con PLA puede transcurrir a una temperatura por encima de su propia óptima de 45ºC, y más próxima a la temperatura de operación óptima de PLC, sin excesiva desnaturalización.

El método de la presente invención proporciona un procedimiento de desgomado de una única etapa en el cual el contenido de fosfolípidos de un aceite, incluso un aceite bruto, puede reducirse a menos que 50 ppm de P, preferiblemente menos que 20 ppm de P, más preferiblemente menos que 10 ppm de P, y lo más preferiblemente menos que 5 ppm de P.

Después de que el desgomado enzimático haya finalizado y el aceite desgomado haya sido separado de las gomas, el aceite desgomado puede someterse a más etapas de procesado conocidas en la técnica tales como blanqueo o desodorización, cuando pueda ser necesario o deseable dependiendo del uso final previsto para el producto de aceite desgomado.

En los ejemplos siguientes se ponen de manifiesto varias realizaciones preferidas de la invención, junto con ejemplos testigo usando condiciones de la técnica anterior. En cada uno de los ejemplos siguientes, el mezclador suspendido fue un mezclador Heidolph modelo Elector KG con una paleta de hoja plana; operado a 90 rpm para una agitación normal y 350 rpm para una agitación vigorosa. La centrífuga fue una de Laval Gyro – Tester instalada con "La Unidad Tazón" para la separación en continuo. El tazón de la centrífuga se cerró con los tornillos de cierre instalados. El mezclado por cizalla se consiguió con un homogeneizador Ultra-Turrax SD-45 con un estator del rotor G450 a 10.000 rpm. La enzima PLA1 fue Lecitase® Ultra (número de lote LYN050070) vendida por Novozymes A/S de Dinamarca, y que tenía una concentración de 11,2 unidades/mg. La enzima PLA2 fue Rohalase® MPL (número de lote Ch: 4738) vendida por AB Enzymes localizada en Alemania, y que tenía una concentración de 2000 unidades/mg. La enzima PLC fue Purifine™ vendida por Diversa Corporation de San Diego, California. Para los ejemplos 1-12, la enzima PLC fue Lot BD16449, que tenía una concentración de 205 unidades/mg. Para los ejemplos 13-38, la enzima PLC fue Lot 90BU002A1, que tenía una concentración de 27,5 unidades/mg. La cantidad de fosfolípidos que permanecían en el aceite tratado se midió como ppm de P según el método de la American Oil Chemists´Society Método Oficial Ca 20-99, "*Analysis of Phosphorous in Oil by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy*".

Ejemplo 1

Testigo: Desgomado con agua – Se calentaron a 70 – 75ºC 1965,4 gramos de aceite de soja bruto que contenía 746 ppm de fósforo, con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Al aceite caliente se añadieron 39,4 gramos de agua desionizada con vigorosa agitación durante 1 minuto. El mezclador se desaceleró a velocidad normal (90 rpm) para dejar que las gomas flocularan durante 30 minutos. A continuación, el aceite se centrifugó, y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. La concentración de fósforo residual en el aceite desgomado fue 80,7 ppm.

Ejemplo 2

Testigo: Desgomado con una única enzima con fosfolipasa A1 (PLA1) – Se calentaron a 75 – 80ºC 1997,9 g de aceite de soja bruto que contenía 746 ppm de fósforo, con agitación utilizando un mezclador suspendido. Se añadieron 2,0 gramos de disolución de ácido cítrico al 50% p/p y la mezcla se sometió a cizalla durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante una hora con un mezclador suspendido. Se dejó que el aceite se enfriara con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite estaba a 40 – 45ºC, luego se añadieron 1,8 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar y la mezcla se mezcló por cizalla durante 10 segundos. El ácido cítrico y la sosa cáustica formaron una disolución amortiguadora del pH débil con un pH de 4,5. Manteniendo la temperatura a 40 – 45ºC, en primer lugar se añadieron 60,0 gramos de agua desionizada y la mezcla se mezcló por cizalla durante 1 minuto, a continuación se añadieron 0,1044 gramos de PLA1 Lecitase® Ultra de Novozymes y la mezcla completa se sometió a cizalla durante 1 minuto. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal con un mezclador suspendido durante 4 horas en un intervalo de temperatura de 41 – 48ºC. A continuación, el aceite tratado con la enzima se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. La concentración de fósforo residual en el aceite desgomado con PLA1 fue 31,7 ppm.

Ejemplo 3

Testigo: Desgomado con una única enzima con fosfolipasa C (PLC) – Se calentaron a 55 – 60ºC 2011,1 gramos de aceite de soja bruto que contenía 746 ppm de fósforo, con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Se añadieron 60,3 gramos de agua desionizada y la mezcla se sometió a cizalla durante 1 minuto. Se añadieron 0,1051 gramos de Purifine™ (lipasa PLC BD16449 que contenía 205 U/mg) de Diversa y la mezcla se sometió a cizalla durante 1 minuto. La mezcla oleosa se sometió a agitación normal durante 1 hora a 50 – 63ºC. A continuación, el aceite tratado con la enzima se centrifugó, y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. La concentración de fósforo residual en el aceite desgomado con PLC fue 70,9 ppm.´

Ejemplo 4

Testigo: Desgomado con PLC seguida por PLA – En este ejemplo testigo, la muestra de aceite se hace reaccionar con cada enzima separadamente en las condiciones de reacción óptimas para esa enzima, según la técnica anterior. Se calentaron a 60ºC 2110,5 gramos de aceite de soja bruto que contenía 560,1 ppm de fósforo con agitación normal. Se añadieron 63 gramos de agua desionizada y se añadieron 0,1123 gramos de Purifine™ (lipasa PLC BD16449 que contenía 205 U/mg) de Diversa y la mezcla se sometió a cizalla durante 1 minuto. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 1 hora a 55 – 56ºC. A continuación, el aceite se centrifugó, y se recogieron el aceite y las gomas húmedas. Para crear una disolución amortiguadora del pH de 4,5, en primer lugar se añadieron 2,0 gramos de disolución de ácido cítrico al 50% p/p al aceite desgomado con PLC, la mezcla se sometió a cizalla durante 1 minuto y, a continuación, se agitó durante una hora a velocidad normal con un mezclador suspendido; a continuación, se añadieron 1,8 mililitros de una disolución de hidróxido de sodio 4 molar, y la mezcla de aceite se mezcló por cizalla durante 10 segundos. Se añadieron 59 gramos de agua desionizada y la mezcla se mezcló por cizalla durante 10 segundos. Con la disolución amortiguadora del pH establecida, se añadieron 0,1061 gramos de PLA1 Lecitase® Ultra de Novozymes y la mezcla completa se sometió a cizalla durante 1 minuto. El aceite se agitó a velocidad normal durante 4 horas en un intervalo de temperatura de aproximadamente 45ºC. A continuación, el aceite se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. La concentración de fósforo residual en el aceite desgomado secuencialmente con PLC y luego PLA1 fue 3,2 ppm.

Ejemplo 5

PLC y PLA1 conjuntamente, pH neutro con un tiempo de reacción de 1 hora a 45ºC – Se calentaron a 45ºC 2004,9 gramos de aceite de soja bruto que contenía 560,1 ppm de fósforo con agitación normal. Con el aceite a un pH neutro, se añadieron al aceite 60 gramos de agua desionizada y se añadieron 0,1037 gramos de Purfine™ (enzima PLC) de Diversa y 0,1076 gramos de Lecitase® Ultra (enzima PLA1) de Novozymes y la mezcla completa se sometió a cizalla durante 1 minuto. La mezcla de aceite y enzimas se agitó a velocidad normal durante 1 hora a una temperatura de aproximadamente 45ºC. A continuación, el aceite se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. El aceite tratado con la mezcla de enzimas PLC y PLA1 combinadas a un pH neutro y 45ºC con un tiempo de reacción de una hora produjo un aceite desgomado con una concentración de fósforo residual de 13,2 ppm.

Este valor de fósforo residual es significativamente menor que el conseguido con PLA sola en sus condiciones óptimas (Ejemplo 2), o PLC sola en sus condiciones óptimas (Ejemplo 3).

Ejemplo 6

PLC y PLA1 conjuntamente, pH neutro con un tiempo de reacción de 4 horas a 45ºC – Se calentaron a 45ºC 2003,7 gramos de aceite de soja bruto que contenía 560,1 ppm de fósforo con agitación normal. Se añadieron 60 gramos de agua desionizada y se añadieron 0,1040 gramos de Purfine™ (enzima PLC) de Diversa y 0,1085 gramos de Lecitase® Ultra (enzima PLA1) de Novozymes y la mezcla completa se sometió a cizalla durante 1 minuto. La mezcla de aceite se agitó a velocidad normal durante 4 horas a una temperatura de aproximadamente 45ºC. A continuación, el aceite se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. El procedimiento que usa la mezcla de enzimas PLC y PLA1 combinadas con un tiempo de reacción de cuatro horas a un pH neutro produjo un aceite desgomado con una concentración de fósforo residual de 10,5 ppm.

Este valor de fósforo residual es sólo una ligera mejora sobre la conseguida en el Ejemplo 5, indicando que un aumento del tiempo de reacción de una hora a cuatro horas no produjo una diferencia significativa en la eficacia del procedimiento de desgomado.

Ejemplo 7

PLC y PLA1 conjuntamente, pH 4,5 con un tiempo de reacción de 1 hora a 45ºC – Se calentaron a 75 - 80ºC 2021,4 gramos de aceite de soja bruto que contenía 547,9 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Se añadieron 2,0 gramos de disolución de ácido cítrico al 50% p/p y se sometió a cizalla durante 1 minuto. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante una hora. Se dejó que el aceite se enfriara hasta que la temperatura alcanzó 40 – 45ºC, luego se añadieron 1,8 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar y la mezcla se mezcló por cizalla durante 10 segundos. Se añadieron 61,0 gramos de agua desionizada, 0,1184 gramos de Purfine™ (enzima PLC) de Diversa y 0,1038 gramos de Lecitase® Ultra (enzima PLA1) de Novozymes y la mezcla completa se sometió a cizalla durante 1 minuto. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 1 hora a una temperatura de aproximadamente 45ºC. A continuación, el aceite se centrifugó, y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. El procedimiento que usa la mezcla de enzimas PLC y PLA1 combinadas con un tiempo de reacción de una hora a un pH de 4,5 y una temperatura de 45ºC produjo un aceite desgomado con una concentración de fósforo residual de 2,4 ppm.

Este valor de fósforo residual es aproximadamente el mismo, e incluso ligeramente mejor, que el conseguido en el Ejemplo 4 en el que cada enzima se hizo reaccionar separadamente y en sus propias condiciones óptimas. Sorprendentemente, la eficacia del desgomado es justo tan buena cuando las dos enzimas se hacen trabajar juntas

a un tiempo de reacción no óptimo para PLA y a un pH y una temperatura no óptimos para PLC, que cuando las dos enzimas se hacen trabajar separadamente, cada una en sus propias condiciones óptimas.

Ejemplo 8

PLC y PLA1 conjuntamente, pH 4,5 con un tiempo de reacción de 4 horas a 45ºC – Se calentaron a 75 - 80ºC 2069,3 gramos de aceite de soja bruto que contenía 547,9 ppm de fósforo con agitación normal. Se añadieron 2,0 gramos de disolución de ácido cítrico al 50% p/p y la mezcla se sometió a cizalla durante 1 minuto, y a continuación se agitó a velocidad normal durante una hora. La mezcla se dejó enfriar a 40 – 45ºC, luego se añadieron 1,8 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar y la mezcla se mezcló por cizalla durante 10 segundos. Se añadieron 63 gramos de agua desionizada, 0,1112 gramos de Purfine™ (enzima PLC) de Diversa y 0,1258 gramos de Lecitase® Ultra (enzima PLA1) de Novozymes y la mezcla completa se sometió a cizalla durante 1 minuto. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 4 horas a una temperatura de aproximadamente 45ºC. A continuación, la mezcla oleosa se centrifugó, y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. El procedimiento que usa la mezcla de enzimas PLC y PLA1 combinadas con un tiempo de reacción de cuatro horas a un pH de 4,5 produjo un aceite desgomado con una concentración de fósforo residual de 2,5 ppm.

Este valor de fósforo residual es aproximadamente el mismo que el conseguido en el Ejemplo 7, indicando que un aumento del tiempo de reacción de una hora a cuatro horas no produjo una diferencia significativa en la eficacia del procedimiento de desgomado.

Ejemplo 9

PLC y PLA1 conjuntamente, pH 4,5 con un tiempo de reacción de 1 hora a 55ºC – Se calentaron a 75 - 80ºC 1985,2 g de aceite de soja bruto que contenía 547,9 ppm de fósforo con agitación normal. Se añadieron 2,0 gramos de disolución de ácido cítrico al 50% p/p y la mezcla se sometió a cizalla durante 1 minuto, a continuación se agitó a velocidad normal durante una hora. La mezcla se dejó enfriar a 40 – 45ºC, luego se añadieron 1,8 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar y la mezcla se mezcló por cizalla durante 10 segundos. Se añadieron 63,0 gramos de agua desionizada, 0,1085 gramos de Purfine™ (enzima PLC) de Diversa y 0,1045 gramos de Lecitase® Ultra (enzima PLA1) de Novozymes y la mezcla completa se sometió a cizalla durante 1 minuto. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 1 hora a una temperatura de 55ºC. A continuación, el aceite se centrifugó; se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. El procedimiento que usa la mezcla de enzimas PLC y PLA1 combinadas con un tiempo de reacción de una hora a un pH de 4,5 y una temperatura de reacción de 55ºC produjo un aceite desgomado con una concentración de fósforo residual de 2,3 ppm.

Este valor de fósforo residual es aproximadamente el mismo que el conseguido en los Ejemplos 7 y 8, indicando que un aumento de la temperatura de reacción de aproximadamente 45ºC a aproximadamente 55ºC no produjo una diferencia significativa en la eficacia del procedimiento de desgomado, incluso aunque sería normalmente de esperar que PLA1 se desnaturalizara a una temperatura superior a 50ºC.

Ejemplo 10

PLC y 2 veces la concentración de PLA1 conjuntamente, pH 4,5 con un tiempo de reacción de 1 hora a 45ºC – Se calentaron a 75 - 80ºC 1992,2 gramos de aceite de soja bruto que contenía 547,9 ppm de fósforo con agitación a velocidad normal. Se añadieron 2,0 gramos de disolución de ácido cítrico al 50% p/p y la mezcla se sometió a cizalla durante 1 minuto, a continuación se agitó durante una hora. La mezcla se dejó enfriar a 40 – 45ºC, luego se añadieron 1,8 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar y la mezcla se mezcló por cizalla durante 10 segundos. Se añadieron a la mezcla 60 gramos de agua desionizada, 0,1319 gramos de Purfine™ (enzima PLC) de Diversa y 0,2139 gramos de Lecitase® Ultra (enzima PLA1) de Novozymes y la mezcla completa se sometió a cizalla durante 1 minuto. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 1 hora en un intervalo de temperatura de 45ºC. A continuación, el aceite se centrifugó, se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. El procedimiento que usa mezcla de enzimas combinadas PLC y dos veces la concentración de PLA1 con un tiempo de reacción de una hora a un pH de 4,5 produjo un aceite desgomado con una concentración de fósforo residual de 7,0 ppm.

Este valor de fósforo residual es aceptable para ciertas aplicaciones pero no tan bueno como el conseguido en los Ejemplos 7-9, indicando que, sorprendentemente, el aumento de la dosificación de PLA1 no da lugar a la mejora de la eficacia del procedimiento de desgomado, incluso en condiciones de reacción óptimas para PLA1.

Ejemplo 11

PLC y PLA2 conjuntamente, pH 4,5 con un tiempo de retención de 1 hora a 45ºC – Se calentaron a 75 - 80ºC 1998,4 gramos de aceite de soja bruto que contenía 341,2 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Se añadieron 2,0 gramos de disolución de ácido cítrico al 50% p/p y se sometió a cizalla durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador suspendido. Se dejó que el aceite se enfriara con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite fue 40ºC, luego se añadieron 1,8 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar y la mezcla se mezcló por cizalla durante 10 segundos. El ácido cítrico y la sosa cáustica formaron una disolución amortiguadora del pH débil con un pH de 4,5. Manteniendo la

temperatura a 40 – 45ºC, se añadieron 0,1112 gramos de Purifine™ (lipasa PLC BD16449 que contenía 205 U/mg) de Diversa y 0,2094 gramos de Rohalase® MPL (número de lote Ch: 4738) vendida por AB Enzymes seguidos por 60 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 60 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 60 minutos a una temperatura de 40 - 45ºC. A continuación, el aceite tratado con las enzimas se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. El fósforo residual en la mezcla de enzimas PLC y PLA2 combinadas a pH neutro produjo un aceite desgomado con una concentración de fósforo residual de 3,3 ppm.

Este ejemplo es similar al Ejemplo 7 anterior, salvo por la sustitución de PLA 1 por PLA 2. La concentración de fósforo residual en el producto acabado demuestra que PLA2 puede funcionar aproximadamente igualmente bien que PLA1 en el método de la presente invención.

Ejemplo 12

PLC y PLA2 conjuntamente, pH 4,5 con un tiempo de retención de 4 horas a 45ºC – Se calentaron a 75 - 80ºC 1998,4 gramos de aceite de soja bruto que contenía 341,2 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Se añadieron 2,0 gramos de disolución de ácido cítrico al 50% p/p y se sometió a cizalla durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador suspendido. Se dejó que el aceite se enfriara con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite fue 40ºC, luego se añadieron 1,8 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar y la mezcla se mezcló por cizalla durante 10 segundos. El ácido cítrico y la sosa cáustica formaron una disolución amortiguadora del pH débil con un pH de 4,5. Manteniendo la temperatura a 40 – 45ºC, se añadieron 0,1038 gramos de Purifine™ (lipasa PLC BD16449 que contenía 205 U/mg) de Diversa y 0,2047 gramos de Rohalase® MPL (número de lote Ch: 4738) vendida por AB Enzymes seguidos por 60 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 60 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 4 horas a una temperatura de 40 - 45ºC. A continuación, el aceite tratado con las enzimas se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. El fósforo residual en la mezcla de enzimas PLC y PLA2 combinadas a pH neutro produjo un aceite desgomado con una concentración de fósforo residual de 5,8 ppm.

Este ejemplo ilustra que el aumento del tiempo de reacción de una a cuatro horas no dio lugar a un mejor desgomado, y de hecho dio lugar a una mayor concentración de fósforo residual.

Los resultados de los ejemplos 1-12 se sumarizan a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2

Ej.	Adición de enzimas	PLC (ppm de enzima activa)	PLA1 (ppm de enzima activa)	PLA2 (ppm de enzima activa)	Tiempo de reacción (min)	Temp. (ºC)	pH	Agua (%)	Fósforo (ppm)
1	Ninguna				30	70-75	7	2,0	80,7
2	Una		0,6		240	41-48	34,5	3,0	31,7
3	Una	10,8			60	50-63	7	3,0	70,9
4	Secuencial	11,5	0,6		20, 240	55, 45	4,5	3,1	3,2
5	Simultánea	10,6	0,6		60	45	7	3,0	13,2
6	Simultánea	10,7	0,6		240	45	7	3,0	10,5
7	Simultánea	12,1	0,6		60	45	4,5	3,0	2,4
8	Simultánea	11,4	0,7		240	45	4,5	3,1	2,5
9	Simultánea	11,1	0,6		60	45	4,5	3,1	2,3
10	Simultánea	13,5	1,2		60	45	4,5	3,0	7,0
11	Simultánea	11,4		209	60	45	4,5	3,0	3,3
12	Simultánea	10,6		205	240	45	4,5	3,1	5,8

Ejemplos 13-30

Se estableció un diseño de experimentos (DOE) para determinar los efectos de ciertas variables de control de procesos para el procedimiento de desgomado enzimático, como se pone de manifiesto en la Tabla 3 siguiente.

Tabla 3

Variable		Niveles		
Adición de enzimas		Secuencial		Simultánea
Cantidad de PLC (ppm de enzima activa)		10	20	30
Cantidad de PLA (ppm de enzima activa)		0,5	1,0	2,0
Tiempo de agitación (s)		45	60	120
pH		4,5	5,0	7,0
Agua (%)		1,5	3,0	4,5
Temperatura (ºC)		40	50	60
Tiempo de reacción (min)		30	60	120

Secuencia – Cada enzima se añadió separadamente, aunque ambas enzimas estuvieron en contacto con la mezcla oleosa durante al menos parte del tiempo de reacción.

Simultánea – Ambas enzimas se añadieron al mismo tiempo.

pH – El pH al cual las enzimas se exponen al aceite.

Temperatura – Temperatura a la cual las enzimas se exponen al aceite.

Tiempo de agitación – El tiempo que la mezcla se agita a alta velocidad después de la adición de cada enzima.

Tiempo de reacción – Tiempo total que al menos una enzima está en contacto con el aceite.

Estas variables de operación se evaluaron en dieciocho pruebas separadas, presentadas en la presente memoria en los ejemplos 13-30. Los valores de cada variable ensayada en cada ejemplo 13-30 se ponen de manifiesto en la Tabla 4 siguiente.

Tabla 4

Ej.	Adición de enzimas	PLC (ppm de enzima activa)	PLA1 (ppm de enzima activa)	Tiempo de reacción (minutos)	Temp. (ºC)	pH	Agua (%)	Tiempo de agitación (segundos)
13	Secuencial	20	1	120	40	5	1,5	120
14	Simultánea	20	1	60	60	7	1,5	45
15	Secuencial	10	1	30	40	7	4,5	60
16	Secuencial	10	2	60	50	4,5	1,5	120
17	Secuencial	20	2	30	50	7	3,0	45
18	Secuencial	10	0,5	120	60	5	3,0	45
19	Simultánea	30	2	30	60	5	1,5	60
20	Simultánea	10	2	120	60	7	4,5	120
21	Simultánea	20	2	120	40	4,5	3,0	60
22	Secuencial	30	2	60	40	5	4,5	45
23	Secuencial	30	1	30	60	4,5	3,0	120
24	Simultánea	30	1	120	50	4,5	4,5	45
25	Simultánea	10	1	60	50	5	3,0	60
26	Secuencial	20	0,5	60	60	4,5	4,5	60
27	Secuencial	30	0,5	120	50	7	1,5	60
28	Simultánea	30	0,5	60	40	7	3,0	120
29	Simultánea	20	0,5	30	50	5	4,5	120
30	Simultánea	10	0,5	30	40	4,5	1,5	45

Ejemplo 13

Se calentaron a 75 - 80ºC 1999,1 gramos de aceite de soja bruto que contenía 769,5 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Se añadieron 2,0 gramos de disolución de ácido cítrico al 50% p/p y se sometió a cizalla durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador suspendido. Se dejó que el aceite se enfriara con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite fue 40ºC, luego se añadieron 2,4 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar, y la mezcla se mezcló por cizalla durante 10 segundos. El ácido cítrico y la sosa cáustica formaron una disolución amortiguadora del pH débil con un pH de 5,0. Manteniendo la temperatura a 40ºC, se añadieron 1,5008 gramos de Purifine™ (lipasa PLC número de lote 90BU002A1) de Diversa seguidos por 30 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 120 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 60 minutos. Manteniendo la temperatura a 40ºC, se añadieron 0,2132 gramos de Lecitase® Ultra (lipasa PLA1 número de lote LYN05007) de Novozymes y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 120 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 60 minutos a una temperatura de 40ºC. A continuación, el aceite tratado con las enzimas se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. La concentración de fósforo residual en el aceite desgomado con adición secuencial de PLC y luego de PLA1 fue 6,5 ppm.

Ejemplo 14

Se enfriaron a 60ºC 2010,5 gramos de aceite de soja bruto que contenía 785,1 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Manteniendo la temperatura a 60ºC, se añadieron 1,5316 gramos de Purifine™ (lipasa PLC número de lote 90BU002A1) de Diversa y 0,2073 gramos de Lecitase® Ultra (lipasa PLA1 número de lote LYN05007) de Novozymes seguidos por 30 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 45 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 60 minutos a una temperatura de 60ºC. A continuación, el aceite tratado con las enzimas se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. El fósforo residual en la mezcla de enzimas PLC y PLA1 combinadas a pH neutro produjo un aceite desgomado con una concentración de fósforo residual de 109,6 ppm.

Ejemplo 15

Se enfriaron a 40ºC 1999,5 gramos de aceite de soja bruto que contenía 785,1 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Manteniendo la temperatura a 40ºC, se añadieron 0,754 gramos de Purifine™ (lipasa PLC número de lote 90BU002A1) de Diversa seguidos por 90 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 60 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 15 minutos. Manteniendo la temperatura a 40ºC, se añadieron 0,2242 gramos de Lecitase® Ultra (lipasa PLA1 número de lote LYN05007) de Novozymes y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 60 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 15 minutos a una temperatura de 40ºC. A continuación, el aceite tratado con las enzimas se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. La concentración de fósforo residual en el aceite desgomado con adición secuencial de PLC y luego de PLA1 fue 27,4 ppm.

Ejemplo 16

Se calentaron a 75 - 80ºC 2002,2 gramos de aceite de soja bruto que contenía 785,1 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Se añadieron 2,0 gramos de disolución de ácido cítrico al 50% p/p y se sometió a cizalla durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador suspendido. Se dejó que el aceite se enfriara con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite fue 50ºC, luego se añadieron 1,8 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar, y la mezcla se mezcló por cizalla durante 10 segundos. El ácido cítrico y la sosa cáustica formaron una disolución amortiguadora del pH débil con un pH de 4,5. Manteniendo la temperatura a 50ºC, se añadieron 0,7498 gramos de Purifine™ (lipasa PLC número de lote 90BU002A1) de Diversa seguidos por 30 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 120 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 30 minutos. Manteniendo la temperatura a 50ºC, se añadieron 0,4064 gramos de Lecitase® Ultra (lipasa PLA1 número de lote LYN05007) de Novozymes y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 120 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 30 minutos a una temperatura de 50ºC. A continuación, el aceite tratado con las enzimas se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. La concentración de fósforo residual en el aceite desgomado con adición secuencial de PLC y luego de PLA1 fue 7,6 ppm.

Ejemplo 17

Se calentaron a 50ºC 2010,7 gramos de aceite de soja bruto que contenía 785,1 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Manteniendo la temperatura a 50ºC, se añadieron 1,4981 gramos de Purifine™ (lipasa PLC número de lote 90BU002A1) de Diversa seguidos por 60 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 45 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 15 minutos. Manteniendo la temperatura a 50ºC, se añadieron 0,4143 gramos de Lecitase® Ultra (lipasa PLA1 número de lote LYN05007) de Novozymes y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 45 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 15 minutos a una temperatura de 50ºC. A continuación, el aceite

tratado con las enzimas se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. La concentración de fósforo residual en el aceite desgomado con adición secuencial de PLC y luego de PLA1 fue 79,3 ppm.

Ejemplo 18

Se calentaron a 75 - 80ºC 2005,3 gramos de aceite de soja bruto que contenía 742,9 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Se añadieron 2,0 gramos de disolución de ácido cítrico al 50% p/p y se sometió a cizalla durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador suspendido. Se dejó que el aceite se enfriara con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite fue 60ºC, luego se añadieron 2,4 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar, y la mezcla se mezcló por cizalla durante 10 segundos. El ácido cítrico y la sosa cáustica formaron una disolución amortiguadora del pH débil con un pH de 5,0. Manteniendo la temperatura a 60ºC, se añadieron 0,7491 gramos de Purifine™ (lipasa PLC número de lote 90BU002A1) de Diversa seguidos por 60 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 45 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 60 minutos. Manteniendo la temperatura a 60ºC, se añadieron 0,1220 gramos de Lecitase® Ultra (lipasa PLA1 número de lote LYN05007) de Novozymes y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 45 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 60 minutos a una temperatura de 60ºC. A continuación, el aceite tratado con las enzimas se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. La concentración de fósforo residual en el aceite desgomado con adición secuencial de PLC y luego de PLA1 fue 2,2 ppm.

Ejemplo 19

Se calentaron a 75 - 80ºC 2000,4 gramos de aceite de soja bruto que contenía 742,9 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Se añadieron 2,0 gramos de disolución de ácido cítrico al 50% p/p y se sometió a cizalla durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador suspendido. Se dejó que el aceite se enfriara con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite fue 60ºC, luego se añadieron 2,4 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar, y la mezcla se mezcló por cizalla durante 10 segundos. El ácido cítrico y la sosa cáustica formaron una disolución amortiguadora del pH débil con un pH de 5,0. Manteniendo la temperatura a 60ºC, se añadieron 2,2270 gramos de Purifine™ (lipasa PLC número de lote 90BU002A1) de Diversa y 0,3937 gramos de Lecitase® Ultra (lipasa PLA1 número de lote LYN05007) de Novozymes seguidos por 30 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 60 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 30 minutos a una temperatura de 60ºC. A continuación, el aceite tratado con las enzimas se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. El fósforo residual en la mezcla de enzimas PLC y PLA1 combinadas a pH 5,0 produjo un aceite desgomado con una concentración de fósforo residual de 7,8 ppm.

Ejemplo 20

Se calentaron a 60ºC 2006,3 gramos de aceite de soja bruto que contenía 719,3 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Manteniendo la temperatura a 60ºC, se añadieron 0,7561 gramos de Purifine™ (lipasa PLC número de lote 90BU002A1) de Diversa y 0,4098 gramos de Lecitase® Ultra (lipasa PLA1 número de lote LYN05007) de Novozymes seguidos por 90 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 120 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 120 minutos a una temperatura de 60ºC. A continuación, el aceite tratado con las enzimas se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. El fósforo residual en la mezcla de enzimas PLC y PLA1 combinadas a pH neutro produjo un aceite desgomado con una concentración de fósforo residual de 64,1 ppm.

Ejemplo 21

Se calentaron a 75 - 80ºC 1998,5 gramos de aceite de soja bruto que contenía 719,3 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Se añadieron 2,0 gramos de disolución de ácido cítrico al 50% p/p y se sometió a cizalla durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador suspendido. Se dejó que el aceite se enfriara con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite fue 40ºC, luego se añadieron 1,8 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar, y la mezcla se mezcló por cizalla durante 10 segundos. El ácido cítrico y la sosa cáustica formaron una disolución amortiguadora del pH débil con un pH de 4,5. Manteniendo la temperatura a 40ºC, se añadieron 1,4798 gramos de Purifine™ (lipasa PLC número de lote 90BU002A1) de Diversa y 0,4018 gramos de Lecitase® Ultra (lipasa PLA1 número de lote LYN05007) de Novozymes seguidos por 60 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 60 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 120 minutos a una temperatura de 40ºC. A continuación, el aceite tratado con las enzimas se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. El fósforo residual en la mezcla de enzimas PLC y PLA1 combinadas a pH 4,5 produjo un aceite desgomado con una concentración de fósforo residual de 5,5 ppm.

Ejemplo 22

Se calentaron a 75 - 80ºC 2001,3 gramos de aceite de soja bruto que contenía 719,3 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Se añadieron 2,0 gramos de disolución de ácido cítrico al 50% p/p y se sometió a cizalla durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador

suspendido. Se dejó que el aceite se enfriara con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite fue 40ºC, luego se añadieron 2,4 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar, y la mezcla se mezcló por cizalla durante 10 segundos. El ácido cítrico y la sosa cáustica formaron una disolución amortiguadora del pH débil con un pH de 5,0. Manteniendo la temperatura a 40ºC, se añadieron 2,2580 gramos de Purifine™ (lipasa PLC número de lote 90BU002A1) de Diversa seguidos por 90 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 45 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 30 minutos. Manteniendo la temperatura a 40ºC se añadieron 0,4126 gramos de Lecitase® Ultra (lipasa PLA1 número de lote LYN05007) de Novozymes y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 45 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 30 minutos a una temperatura de 40ºC. A continuación, el aceite tratado con las enzimas se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. El fósforo residual en el aceite desgomado tratado con adición secuencial de PLC y PLA1 tuvo una concentración de fósforo residual de 2,1 ppm.

Ejemplo 23

Se calentaron a 75 - 80ºC 2002,0 gramos de aceite de soja bruto que contenía 747,3 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Se añadieron 2,0 gramos de disolución de ácido cítrico al 50% p/p y se sometió a cizalla durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador suspendido. Se dejó que el aceite se enfriara con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite fue 60ºC, luego se añadieron 1,8 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar, y la mezcla se mezcló por cizalla durante 10 segundos. El ácido cítrico y la sosa cáustica formaron una disolución amortiguadora del pH débil con un pH de 4,5. Manteniendo la temperatura a 60ºC, se añadieron 2,2194 gramos de Purifine™ (lipasa PLC número de lote 90BU002A1) de Diversa seguidos por 60 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 120 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 15 minutos. Manteniendo la temperatura a 60ºC, se añadieron 0,2198 gramos de Lecitase® Ultra (lipasa PLA1 número de lote LYN05007) de Novozymes y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 120 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 15 minutos a una temperatura de 60ºC. A continuación, el aceite tratado con las enzimas se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. El fósforo residual en el aceite desgomado tratado secuencialmente con las enzimas PLC y PLA1 tuvo una concentración de fósforo residual de 4,6 ppm.

Ejemplo 24

Se calentaron a 75 - 80ºC 2000,8 gramos de aceite de soja bruto que contenía 747,3 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Se añadieron 2,0 gramos de disolución de ácido cítrico al 50% p/p y se sometió a cizalla durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador suspendido. Se dejó que el aceite se enfriara con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite fue 50ºC, luego se añadieron 1,8 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar, y la mezcla se mezcló por cizalla durante 10 segundos. El ácido cítrico y la sosa cáustica formaron una disolución amortiguadora del pH débil con un pH de 4,5. Manteniendo la temperatura a 50ºC, se añadieron 2,2500 gramos de Purifine™ (lipasa PLC número de lote 90BU002A1) de Diversa y 0,2216 gramos de Lecitase® Ultra (lipasa PLA1 número de lote LYN05007) de Novozymes seguidos por 90 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 45 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 120 minutos a una temperatura de 50ºC. A continuación, el aceite tratado con las enzimas se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. El fósforo residual en la mezcla de enzimas PLC y PLA1 combinadas produjo un aceite desgomado con una concentración de fósforo residual de 1,8 ppm.

Ejemplo 25

Se calentaron a 75 - 80ºC 1998,9 gramos de aceite de soja bruto que contenía 747,3 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Se añadieron 2,0 gramos de disolución de ácido cítrico al 50% p/p y se sometió a cizalla durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador suspendido. Se dejó que el aceite se enfriara con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite fue 50ºC, luego se añadieron 2,4 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar, y la mezcla se mezcló por cizalla durante 10 segundos. El ácido cítrico y la sosa cáustica formaron una disolución amortiguadora del pH débil con un pH de 5,0. Manteniendo la temperatura a 50ºC, se añadieron 0,7445 gramos de Purifine™ (lipasa PLC número de lote 90BU002A1) de Diversa y 0,2042 gramos de Lecitase® Ultra (lipasa PLA1 número de lote LYN05007) de Novozymes seguidos por 60 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 60 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 60 minutos a una temperatura de 50ºC. A continuación, el aceite tratado con las enzimas se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. El fósforo residual en la mezcla de enzimas PLC y PLA1 combinadas produjo un aceite desgomado con una concentración de fósforo residual de 7,2 ppm.

Ejemplo 26

Se calentaron a 75 - 80ºC 1997,3 gramos de aceite de soja bruto que contenía 810,8 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Se añadieron 2,0 gramos de disolución de ácido cítrico al 50% p/p y se sometió a cizalla durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador

suspendido. Se dejó que el aceite se enfriara con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite fue 60ºC, luego se añadieron 1,8 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar, y la mezcla se mezcló por cizalla durante 10 segundos. El ácido cítrico y la sosa cáustica formaron una disolución amortiguadora del pH débil con un pH de 4,5. Manteniendo la temperatura a 60ºC, se añadieron 1,5189 gramos de Purifine™ (lipasa PLC número de lote 90BU002A1) de Diversa seguidos por 90 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 60 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 30 minutos. Manteniendo la temperatura a 60ºC, se añadieron 0,1119 gramos de Lecitase® Ultra (lipasa PLA1 número de lote LYN05007) de Novozymes y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 60 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 30 minutos a una temperatura de 60ºC. A continuación, el aceite tratado con las enzimas se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. El fósforo residual en el aceite desgomado tratado secuencialmente con las enzimas PLC y PLA1 tuvo una concentración de fósforo residual de 2,2 ppm.

Ejemplo 27

Se enfriaron a 50ºC 2010,0 gramos de aceite de soja bruto que contenía 810,8 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Manteniendo la temperatura a 50ºC, se añadieron 2,2608 gramos de Purifine™ (lipasa PLC número de lote 90BU002A1) de Diversa seguidos por 30 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 60 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 60 minutos. Manteniendo la temperatura a 50ºC, se añadieron 0,1172 gramos de Lecitase® Ultra (lipasa PLA1 número de lote LYN05007) de Novozymes y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 60 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 60 minutos a una temperatura de 50ºC. A continuación, el aceite tratado con las enzimas se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. El fósforo residual en el aceite desgomado tratado secuencialmente con las enzimas PLC y PLA1 a pH neutro tuvo una concentración de fósforo residual de 72,6 ppm.

Ejemplo 28

Se calentaron a 40ºC 2005,1 gramos de aceite de soja bruto que contenía 810,8 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Manteniendo la temperatura a 40ºC, se añadieron 2,2622 gramos de Purifine™ (lipasa PLC número de lote 90BU002A1) de Diversa y 0,1031 gramos de Lecitase® Ultra (lipasa PLA1 número de lote LYN05007) de Novozymes seguidos por 60 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 120 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 60 minutos a una temperatura de 40ºC. A continuación, el aceite tratado con las enzimas se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. El fósforo residual en la mezcla de enzimas PLC y PLA1 combinadas a pH neutro produjo un aceite desgomado con una concentración de fósforo residual de 61,5 ppm.

Ejemplo 29

Se calentaron a 75 - 80ºC 2006,3 gramos de aceite de soja bruto que contenía 795,3 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Se añadieron 2,0 gramos de disolución de ácido cítrico al 50% p/p y se sometió a cizalla durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador suspendido. Se dejó que el aceite se enfriara con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite fue 50ºC, luego se añadieron 2,4 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar, y la mezcla se mezcló por cizalla durante 10 segundos. El ácido cítrico y la sosa cáustica formaron una disolución amortiguadora del pH débil con un pH de 5,0. Manteniendo la temperatura a 50ºC, se añadieron 1,5373 gramos de Purifine™ (lipasa PLC número de lote 90BU002A1) de Diversa y 0,1168 gramos de Lecitase® Ultra (lipasa PLA1 número de lote LYN05007) de Novozymes seguidos por 90 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 120 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 30 minutos a una temperatura de 50ºC. A continuación, el aceite tratado con las enzimas se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. El fósforo residual en la mezcla de enzimas PLC y PLA1 combinadas a un pH de 5,0 produjo un aceite desgomado con una concentración de fósforo residual de 1,9 ppm.

Ejemplo 30

Se calentaron a 75 - 80ºC 2006,1 gramos de aceite de soja bruto que contenía 795,3 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Se añadieron 2,0 gramos de disolución de ácido cítrico al 50% p/p y se sometió a cizalla durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador suspendido. Se dejó que el aceite se enfriara con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite fue 40ºC, luego se añadieron 1,8 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar, y la mezcla se mezcló por cizalla durante 10 segundos. El ácido cítrico y la sosa cáustica formaron una disolución amortiguadora del pH débil con un pH de 4,5. Manteniendo la temperatura a 40ºC, se añadieron 0,7736 gramos de Purifine™ (lipasa PLC número de lote 90BU002A1) de Diversa y 0,1072 gramos de Lecitase® Ultra (lipasa PLA1 número de lote LYN05007) de Novozymes seguidos por 30 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 45 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 30 minutos a una temperatura de 40ºC. A continuación, el aceite tratado con las enzimas se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas

separados. El fósforo residual en la mezcla de enzimas PLC y PLA1 combinadas a un pH de 4,5 produjo un aceite desgomado con una concentración de fósforo residual de 13,7 ppm.

Los resultados de los ejemplos 13-30 en términos de concentración de fósforo conseguida se ponen de manifiesto en la Tabla 5 siguiente.

Tabla 5

Ej.	Adición de enzimas	PLC (ppm de enzima activa)	PLA1 (ppm de enzima activa)	Tiempo de reacción (min)	Temp. (ºC)	pH	Agua (%)	Tiempo de agitación (segundos)	Fósforo (ppm)
13	Secuencial	20,6	1,2	120	40	5	1,5	120	6,5
14	Simultánea	21,1	1,2	60	60	7	1,5	45	109,6
15	Secuencial	10,4	1,3	30	40	7	4,5	60	27,4
16	Secuencial	10,3	2,3	60	50	4,5	1,5	120	7,6
17	Secuencial	20,6	2,3	30	50	7	3,0	45	79,3
18	Secuencial	10,3	0,7	120	60	5	3,0	45	2,2
19	Simultánea	30,6	2,2	30	60	5	1,5	60	7,8
20	Simultánea	10,4	2,3	120	60	7	4,5	120	64,1
21	Simultánea	20,3	2,3	120	40	4,5	3,0	60	5,5
22	Secuencial	31,0	2,3	60	40	5	4,5	45	2,1
23	Secuencial	30,5	1,2	30	60	4,5	3,0	120	4,6
24	Simultánea	30,9	1,2	120	50	4,5	4,5	45	1,8
25	Simultánea	10,2	1,4	60	50	5	3,0	60	7,2
26	Secuencial	20,9	0,6	60	60	4,5	4,5	60	2,2
27	Secuencial	31,1	0,7	120	50	7	1,5	60	72,6
28	Simultánea	31,1	0,6	60	40	7	3,0	120	61,5
29	Simultánea	21,1	0,7	30	50	5	4,5	120	1,9
30	Simultánea	10,6	0,6	30	40	4,5	1,5	45	13,7

Un sumario de los anteriores experimentos se ilustra en el gráfico mostrado en la Fig. 6, la cual es una representación de la cantidad promedio final de fósforo a cada nivel de cada factor.

A un pH neutro, óptimo para la enzima PLC, la combinación de las dos enzimas fracasó en producir un aceite con concentraciones de fósforo aceptables que permitieran que el aceite fuera refinado físicamente. Sin embargo, a un pH ácido, óptimo para la enzima PLA, la combinación de enzimas añadidos secuencial o conjuntamente produjo concentraciones de fósforo residual aceptables en los aceites permitiendo que fueran refinados físicamente. Cuando se empleó un pH ácido, sólo uno de los experimentos fracasó en producir un aceite con una concentración de fósforo residual de menos que 10 ppm. El Ejemplo 30 tuvo una concentración de fósforo residual mayor que 10 (13,7 ppm) y fue producida con las concentraciones más bajas de ambos enzimas, la temperatura más baja, el porcentaje de agua más bajo, los tiempos de mezclado y de agitación más cortos y el pH más ácido.

Se descubrió un efecto sinérgico entre la combinación de enzimas que permitió que la reacción terminara en menos que 30 minutos, en comparación con 1 hora para las enzimas PLC o 4 horas para las enzimas PLC. Se completaron unos ensayos adicionales para verificar el efecto de un tiempo de reacción muy corto; los resultados se ponen de manifiesto en la Tabla 6 posterior. En estos ensayos adicionales, el pH se mantuvo en 4,5, a la vista del hallazgo anterior de que un menor pH producía resultados significativamente más favorables que un pH neutro. La cantidad de PLA1 también se mantuvo constante en 0,5 ppm, ya que anteriormente se determinó que el aumento de la cantidad de PLA1 por encima de este valor no dio lugar a un desgomado más efectivo. Además, en cada uno de estos ejemplos las enzimas se añadieron simultáneamente más que secuencialmente, a la vista de la determinación anterior de que la adición simultánea de enzimas producía mejores resultados de desgomado que la adición secuencial. Además, en un proceso industrial es ventajoso limitar el tiempo total del proceso, el equipamiento total y los activos dedicados.

Tabla 6

Ejemplo	Adición de enzimas	PLC (ppm de enzima activa)	PLA1 (ppm de enzima activa)	Tiempo de reacción (minutos)	Temp. (ºC)	pH	Agua (%)	Tiempo de agitación (segundos)
31	Simultánea	20	0,5	120	40	4,5	2,0	120
32	Simultánea	10	0,5	120	60	4,5	4,5	45
33	Simultánea	10	0,5	30	40	4,5	4,5	120
34	Simultánea	20	0,5	30	60	4,5	2,0	45
35	Simultánea	20	0,5	120	40	4,5	4,5	45
36	Simultánea	20	0,5	30	60	4,5	4,5	120
37	Simultánea	10	0,5	30	40	4,5	2,0	45
38	Simultánea	10	0,5	120	60	4,5	2,0	120

Ejemplo 31

Se calentaron a 75 - 80ºC 2003,6 gramos de aceite de soja bruto que contenía 784,8 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Se añadieron 2,0 gramos de disolución de ácido cítrico al 50% p/p y se sometió a cizalla durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador suspendido. Se dejó que el aceite se enfriara con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite fue 40ºC, luego se añadieron 1,8 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar, y la mezcla se mezcló por cizalla durante 10 segundos. El ácido cítrico y la sosa cáustica formaron una disolución amortiguadora del pH débil con un pH de 4,5. Manteniendo la temperatura a 40ºC, se añadieron 1,4603 gramos de Purifine™ (lipasa PLC número de lote 90BU002A1) de Diversa y 0,1021 gramos de Lecitase® Ultra (lipasa PLA1 número de lote LYN05007) de Novozymes seguidos por 40 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 120 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 120 minutos a una temperatura de 40ºC. A continuación, el aceite tratado con las enzimas se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. El fósforo residual en la mezcla de enzimas PLC y PLA1 combinadas a un pH de 4,5 produjo un aceite desgomado con una concentración de fósforo residual de 10,7 ppm.

Ejemplo 32

Se calentaron a 75 - 80ºC 2004,8 gramos de aceite de soja bruto que contenía 784,8 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Se añadieron 2,0 gramos de disolución de ácido cítrico al 50% p/p y se sometió a cizalla durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador suspendido. Se dejó que el aceite se enfriara con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite fue 60ºC, luego se añadieron 1,8 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar, y la mezcla se mezcló por cizalla durante 10 segundos. El ácido cítrico y la sosa cáustica formaron una disolución amortiguadora del pH débil con un pH de 4,5. Manteniendo la temperatura a 60ºC, se añadieron 0,7509 gramos de Purifine™ (lipasa PLC número de lote 90BU002A1) de Diversa y 0,1105 gramos de Lecitase® Ultra (lipasa PLA1 número de lote LYN05007) de Novozymes seguidos por 90 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 45 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 120 minutos a una temperatura de 60ºC. A continuación, el aceite tratado con las enzimas se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. El fósforo residual en la mezcla de enzimas PLC y PLA1 combinadas a un pH de 4,5 produjo un aceite desgomado con una concentración de fósforo residual de 6,7 ppm.

Ejemplo 33

Se calentaron a 75 - 80ºC 2000,4 gramos de aceite de soja bruto que contenía 697,7 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Se añadieron 2,0 gramos de disolución de ácido cítrico al 50% p/p y se sometió a cizalla durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador suspendido. Se dejó que el aceite se enfriara con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite fue 40ºC, luego se añadieron 1,8 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar, y la mezcla se mezcló por cizalla durante 10 segundos. El ácido cítrico y la sosa cáustica formaron una disolución amortiguadora del pH débil con un pH de 4,5. Manteniendo la temperatura a 40ºC, se añadieron 0,7530 gramos de Purifine™ (lipasa PLC número de lote 90BU002A1) de Diversa y 0,1022 gramos de Lecitase® Ultra (lipasa PLA1 número de lote LYN05007) de Novozymes seguidos por 90 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 120 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 30 minutos a una temperatura de 40ºC. A continuación, el aceite tratado con las enzimas se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. El fósforo residual en la mezcla de enzimas PLC y PLA1 combinadas a un pH de 4,5 produjo un aceite desgomado con una concentración de fósforo residual de 2,2 ppm.

Ejemplo 34

Se calentaron a 75 - 80ºC 1999,4 gramos de aceite de soja bruto que contenía 714,2 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Se añadieron 2,0 gramos de disolución de ácido cítrico al 50% p/p y se sometió a cizalla durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador suspendido. Se dejó que el aceite se enfriara con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite fue 60ºC, luego se añadieron 1,8 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar, y la mezcla se mezcló por cizalla durante 10 segundos. El ácido cítrico y la sosa cáustica formaron una disolución amortiguadora del pH débil con un pH de 4,5. Manteniendo la temperatura a 60ºC, se añadieron 1,508 gramos de Purifine™ (lipasa PLC número de lote 90BU002A1) de Diversa y 0,1139 gramos de Lecitase® Ultra (lipasa PLA1 número de lote LYN05007) de Novozymes seguidos por 40 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 45 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 30 minutos a una temperatura de 60ºC. A continuación, el aceite tratado con las enzimas se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. El fósforo residual en la mezcla de enzimas PLC y PLA1 combinadas a un pH de 4,5 produjo un aceite desgomado con una concentración de fósforo residual de 16,5 ppm.

Ejemplo 35

Se calentaron a 75 - 80ºC 1999 gramos de aceite de soja bruto que contenía 714,2 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Se añadieron 2,0 gramos de disolución de ácido cítrico al 50% p/p y se sometió a cizalla durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador suspendido. Se dejó que el aceite se enfriara con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite fue 40ºC, luego se añadieron 1,8 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar, y la mezcla se mezcló por cizalla durante 10 segundos. El ácido cítrico y la sosa cáustica formaron una disolución amortiguadora del pH débil con un pH de 4,5. Manteniendo la temperatura a 40ºC, se añadieron 1,5010 gramos de Purifine™ (lipasa PLC número de lote 90BU002A1) de Diversa y 0,1060 gramos de Lecitase® Ultra (lipasa PLA1 número de lote LYN05007) de Novozymes seguidos por 90 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 45 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 120 minutos a una temperatura de 40ºC. A continuación, el aceite tratado con las enzimas se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. El fósforo residual en la mezcla de enzimas PLC y PLA1 combinadas a un pH de 4,5 produjo un aceite desgomado con una concentración de fósforo residual de 1,9 ppm.

Ejemplo 36

Se calentaron a 75 - 80ºC 1999 gramos de aceite de soja bruto que contenía 695,1 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Se añadieron 2,0 gramos de disolución de ácido cítrico al 50% p/p y se sometió a cizalla durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador suspendido. Se dejó que el aceite se enfriara con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite fue 60ºC, luego se añadieron 1,8 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar, y la mezcla se mezcló por cizalla durante 10 segundos. El ácido cítrico y la sosa cáustica formaron una disolución amortiguadora del pH débil con un pH de 4,5. Manteniendo la temperatura a 60ºC, se añadieron 1,5296 gramos de PurifineTM (lipasa PLC número de lote 90BU002A1) de Diversa y 0,1241 gramos de Lecitase® Ultra (lipasa PLA1 número de lote LYN05007) de Novozymes seguidos por 90 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 120 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 30 minutos a una temperatura de 60ºC. A continuación, el aceite tratado con las enzimas se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. El fósforo residual en la mezcla de enzimas PLC y PLA1 combinadas a un pH de 4,5 produjo un aceite desgomado con una concentración de fósforo residual de 5,2 ppm.

Ejemplo 37

Se calentaron a 75 - 80ºC 2005,2 gramos de aceite de soja bruto que contenía 695,1 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Se añadieron 2,0 gramos de disolución de ácido cítrico al 50% p/p y se sometió a cizalla durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador suspendido. Se dejó que el aceite se enfriara con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite fue 40ºC, luego se añadieron 1,8 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar, y la mezcla se mezcló por cizalla durante 10 segundos. El ácido cítrico y la sosa cáustica formaron una disolución amortiguadora del pH débil con un pH de 4,5. Manteniendo la temperatura a 40ºC, se añadieron 0,7422 gramos de Purifine™ (lipasa PLC número de lote 90BU002A1) de Diversa y 0,1195 gramos de Lecitase® Ultra (lipasa PLA1 número de lote LYN05007) de Novozymes seguidos por 40 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 45 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 30 minutos a una temperatura de 40ºC. A continuación, el aceite tratado con las enzimas se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. El fósforo residual en la mezcla de enzimas PLC y PLA1 combinadas a un pH de 4,5 produjo un aceite desgomado con una concentración de fósforo residual de 6,7 ppm.

Ejemplo 38

Se calentaron a 75 - 80ºC 1998 gramos de aceite de soja bruto que contenía 695,1 ppm de fósforo con agitación normal utilizando un mezclador suspendido. Se añadieron 2,0 gramos de disolución de ácido cítrico al 50% p/p y se sometió a cizalla durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador suspendido. Se dejó que el aceite se enfriara con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite fue 60ºC, luego se añadieron 1,8 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar, y la mezcla se mezcló por cizalla durante 10 segundos. El ácido cítrico y la sosa cáustica formaron una disolución amortiguadora del pH débil con un pH de 4,5. Manteniendo la temperatura a 60ºC, se añadieron 0,7429 gramos de Purifine™ (lipasa PLC número de lote 90BU002A1) de Diversa y 0,1041 gramos de Lecitase® Ultra (lipasa PLA1 número de lote LYN05007) de Novozymes seguidos por 40 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalla durante 120 segundos. La mezcla oleosa se agitó a velocidad normal durante 120 minutos a una temperatura de 60ºC. A continuación, el aceite tratado con las enzimas se centrifugó; y se recogieron el aceite y las gomas húmedas separados. El fósforo residual en la mezcla de enzimas PLC y PLA1 combinadas a un pH de 4,5 produjo un aceite desgomado con una concentración de fósforo residual de 4,4 ppm.

Tabla 7

Ej.	Adición de enzimas	PLC (ppm de enzima activa)	PLA1 (ppm de enzima activa)	Tiempo de reacción (minutos)	Temp. (ºC)	pH	Agua (%)	Tiempo de agitación (segundos)	Fósforo (ppm)
31	Simultánea	20,9	0,7	120	40	4,5	2,0	120	10,7
32	Simultánea	10,3	0,7	120	60	4,5	4,5	45	6,7
33	Simultánea	10,4	0,7	30	40	4,5	4,5	120	2,2
34	Simultánea	20,7	0,6	30	60	4,5	2,0	45	16,5
35	Simultánea	20,7	0,6	120	40	4,5	4,5	45	1,9
36	Simultánea	21,0	0,7	30	60	4,5	4,5	120	5,2
37	Simultánea	10,2	0,6	30	40	4,5	2,0	45	6,7
38	Simultánea	10,2	0,6	120	60	4,5	2,0	120	4,4

La Fig. 7 es un gráfico que sumariza los ejemplos 31-38, que representa la cantidad final promedio de fósforo en cada nivel de cada factor manteniendo constantes el pH, la dosificación de PLA y la adición combinada.

Los cinco factores evaluados en estos Ejemplos 31-38 se listan a continuación en el orden de la importancia de sus efectos sobre el procedimiento de desgomado. Los efectos son las diferencias en la concentración promedio de fósforo (en valor absoluto) entre las configuraciones alta y baja de los factores

El aumento de la dosificación de agua disminuye el fósforo residual.

La disminución de la dosificación de PLC disminuye el fósforo residual.

La disminución de la temperatura de reacción disminuye el fósforo residual.

El aumento de la agitación disminuye el fósforo residual.

El aumento del tiempo de reacción disminuye el fósforo residual.

Se ha descrito un nuevo procedimiento para el desgomado de aceites usando simultáneamente una enzima tipo fosfolipasa A y una enzima tipo fosfolipasa C. Sorprendentemente, se ha encontrado que una combinación funciona mejor que cada enzima por separado, incluso cuando por necesidad una u otra enzima se hacen reaccionar en condiciones de reacción que son menos que óptimas para esa enzima. También fue una sorpresa encontrar que pudo conseguirse desgomar con concentraciones de menos que aproximadamente 10 ppm de fósforo, tan bajas como aproximadamente 5 ppm de fósforo, e incluso tan bajas como aproximadamente 3 ppm de fósforo en el producto final, en condiciones apropiadas con tiempos de reacción tan bajos como aproximadamente treinta minutos. Además, sin desear ligarse a la teoría, parece que la enzima PLC o uno de sus productos de reacción de hidrólisis están catalizando la reacción de la enzima PLA, permitiendo que el tiempo de reacción sea significativamente menor que el tiempo de reacción para cualquiera de las enzimas solas. Estos resultados son inesperados sobre la base de los parámetros de reacción óptimos conocidos para las enzimas PLA y PLC.

Los expertos en la técnica reconocerán a partir de la descripción precedente que en la práctica de la presente invención pueden variarse varios parámetros de operación, dependiendo de los objetivos de una situación particular, mientras que aún se permanece dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, en la determinación de las concentraciones a usar de las enzimas PLA y PLC en un experimento particular, la selección dependerá de si el

objetivo es funcionar al coste posible más bajo o con la mayor eficacia posible. Si el objetivo es funcionar al coste posible más bajo, entonces la concentración de PLA puede ser menor que aproximadamente 2,0 ppm, preferiblemente menor que aproximadamente 1,0 ppm, y lo más preferiblemente menor que aproximadamente 0,5 ppm. Tal baja concentración de la enzima PLA puede todavía proporcionar un desgomado efectivo en muchas situaciones. Por el contrario, si se desea maximizar la eficacia, la concentración de PLA es preferiblemente al menos aproximadamente 0,5 ppm, más preferiblemente al menos aproximadamente 1,0 ppm y lo más preferiblemente 2,0 ppm. Los expertos en las técnicas del procesado de aceites entenderán cómo variar las concentraciones de las enzimas en la mezcla de reacción para obtener el equilibrio deseado de eficiencia de costes y rendimiento del producto.

También son posibles variaciones de otras condiciones de procesado. El pH puede ser aproximadamente 7,0, mientras que un pH de aproximadamente 5,0 es preferible y un pH de aproximadamente 4,5 es actualmente preferido. La concentración de agua en el sistema puede en general ser aproximadamente 3,0%, pero puede ser tan baja como aproximadamente 1,5% si se desea reducir las aguas residuales, o tan alta como aproximadamente 4,5% si se desea una mayor eficiencia de desgomado. La temperatura de reacción puede ser tan alta como aproximadamente 60ºC, pero es más preferiblemente menos que aproximadamente 50ºC, y sorprendentemente la más preferible a aproximadamente 40ºC. El tiempo de agitación durante el mezclado inicial puede ser aproximadamente 45 segundos, es más preferiblemente aproximadamente 60 segundos, y es lo más preferiblemente aproximadamente 120 segundos. Finalmente, la duración de la reacción enzimática puede reducirse mucho, en algunas realizaciones es ventajosamente menos que aproximadamente 60 minutos, y preferiblemente aproximadamente 30 minutos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para desgomar una composición oleosa, método que comprende:

(a) Proporcionar una composición oleosa que contenga una cantidad de fosfolípidos,

(b) Poner en contacto dicha composición oleosa simultáneamente con una o más enzimas fosfolipasa A en una cantidad de aproximadamente 2 ppm de enzima activa o menos y una o más enzimas fosfolipasa C en una cantidad de aproximadamente 30 ppm de enzima activa o menos, en condiciones suficientes para que las enzimas reaccionen con los fosfolípidos para crear productos de reacción fosfolipídicos, y

(c) Separar los productos de reacción fosfolipídicos de la composición oleosa, siendo la composición oleosa restante después de la separación una composición oleosa desgomada,

Mediante lo cual durante la etapa (b) la reacción de dicha una o más enzimas fosfolipasa A transcurre a una velocidad más rápida que la que sería en ausencia de dicha una o más enzimas fosfolipasa C, donde la duración de la reacción de las enzimas con los fosfolípidos es menor que una hora, y donde dicha reacción de las enzimas con los fosfolípidos se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 3-7 a una temperatura de aproximadamente 40-80ºC, y la composición oleosa desgomada de la etapa (c) tiene un contenido de fosfolípidos, medido como partes por millón de fósforo, de aproximadamente 20 ppm o menos.

2. El método según la reivindicación 1, donde la duración de la reacción de las enzimas con los fosfolípidos es aproximadamente treinta minutos.

3. El método según la reivindicación 1, donde dicha una o más enzimas fosfolipasa A se seleccionan del grupo que consiste en una enzima fosfolipasa A1 y una enzima fosfolipasa A2.

4. El método según la reivindicación 1, donde dicha una o más enzimas fosfolipasa C se seleccionan del grupo que consiste en una enzima fosfolipasa C y una enzima fosfolipasa C fosfatidil-inositol específica.

5. El método según la reivindicación 1, donde dicha reacción de las enzimas con los fosfolípidos ocurre a un pH de aproximadamente 4-5.

6. El método según la reivindicación 1, donde dicha reacción de las enzimas con los fosfolípidos ocurre a una temperatura de aproximadamente 40-60ºC, o a una temperatura de aproximadamente 45-55ºC.

7. El método según la reivindicación 1, donde dicha composición oleosa comprende un aceite bruto, o un aceite previamente desgomado.

8. El método según la reivindicación 1, donde dicha enzima PLC está presente en una cantidad de aproximadamente 20 ppm de enzima activa o menos, o de aproximadamente 10 ppm de enzima activa o menos.

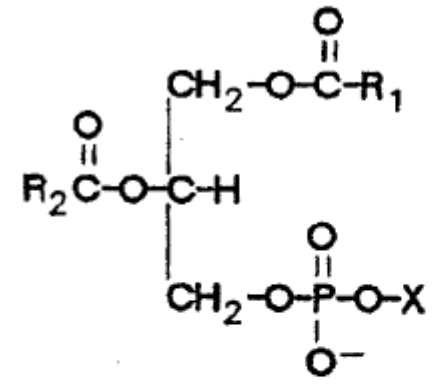
9. El método según la reivindicación 1, donde dicha enzima PLC está presente en una cantidad de aproximadamente 1 ppm de enzima activa o menos, o de aproximadamente 0,5 ppm de enzima activa o menos.

10. El método según la reivindicación 1, donde durante la etapa (b) la mezcla de la composición oleosa y las enzimas se mezcla inicialmente por cizalla, preferiblemente donde dicha mezcla por cizalla continúa durante una duración de al menos aproximadamente 45 segundos.

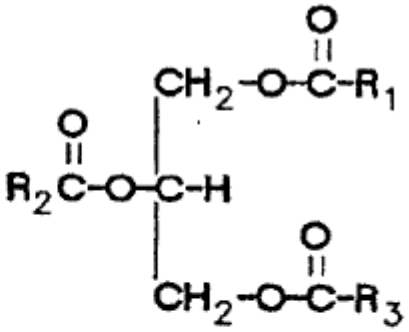
11. El método según la reivindicación 1, donde durante la etapa (b) se añade una cantidad de agua, preferiblemente donde dicha cantidad de agua es al menos aproximadamente 1,5% en peso de la mezcla total, es al menos aproximadamente 3,0% en peso de la mezcla total, o es al menos aproximadamente 4,5% en peso de la mezcla total.

12. El método según la reivindicación 1, donde la composición oleosa desgomada de la etapa (c) tiene un contenido de fosfolípidos, medido como partes por millón de fósforo, de aproximadamente 10 ppm o menos, o es aproximadamente 5 ppm o menos.

13. Un procedimiento para desgomar aceites que comprende la etapa de hacer reaccionar una enzima fosfolipasa A con fosfolípidos en una composición oleosa, método caracterizado porque la composición oleosa se pone simultáneamente en contacto con al menos una enzima fosfolipasa A en una cantidad de aproximadamente 2 ppm de enzima activa o menos y al menos una enzima fosfolipasa C en una cantidad de aproximadamente 30 ppm de enzima activa o menos, para que reaccionen con los fosfolípidos de la composición oleosa, en condiciones de reacción tales que la reacción con la enzima fosfolipasa A transcurra a una velocidad más rápida que la que se daría en ausencia de la enzima fosfolipasa C, donde la duración de la reacción de las enzimas con los fosfolípidos es menor que una hora, y donde dicha reacción de las enzimas con los fosfolípidos se lleva a cabo a un pH de aproximadamente 3-7 a una temperatura de aproximadamente 40-80ºC, y la composición oleosa desgomada tiene un contenido de fosfolípidos, medido como partes por millón de fósforo, de aproximadamente 20 ppm o menos.



FOSFOLÍPIDO

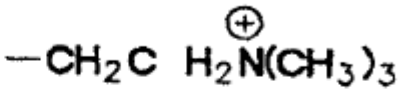


TRIACILGLICEROL

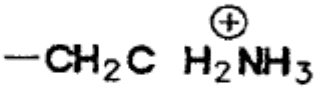
$R_{\#}$ = CADENAS DE ÁCIDO GRASO
X = GRUPO FUNCIONAL

Fig. 1

PC: -COLINA



PE: -ETANOLAMINA



PA: -ÁCIDO

PI: -INOSITOL

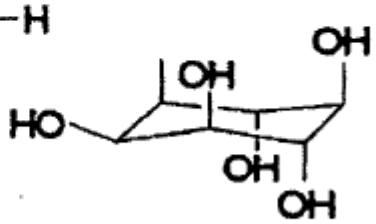


Fig. 2

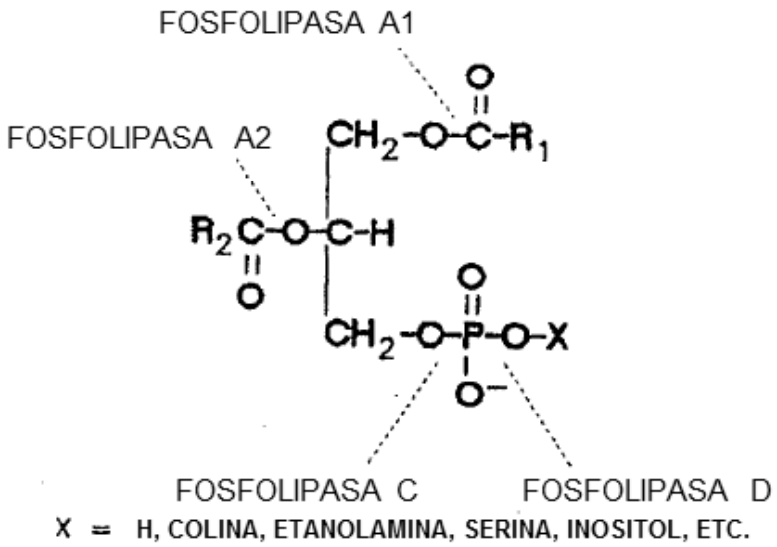

FOSFOLIPASA A1
FOSFOLIPASA A2
FOSFOLIPASA C
FOSFOLIPASA D
X = H, COLINA, ETANOLAMINA, SERINA, INOSITOL, ETC.

Fig. 3

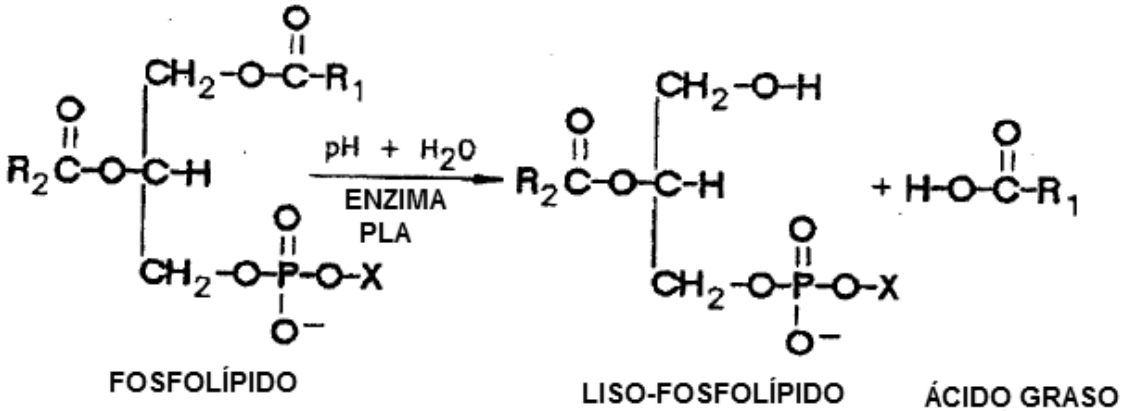

pH + H2O
ENZIMA
PLA
FOSFOLÍPIDO
LISO-FOSFOLÍPIDO
ÁCIDO GRASO

Fig. 4

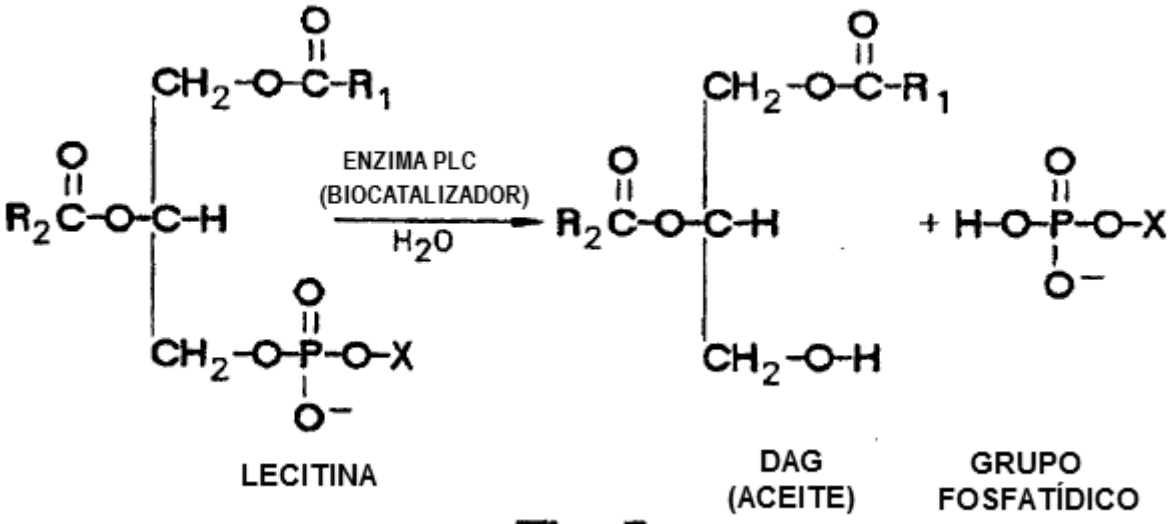

ENZIMA PLC
(BIOCATALIZADOR)
H_2O
LECITINA
DAG
(ACEITE)
GRUPO
FOSFATÍDICO

Fig. 5

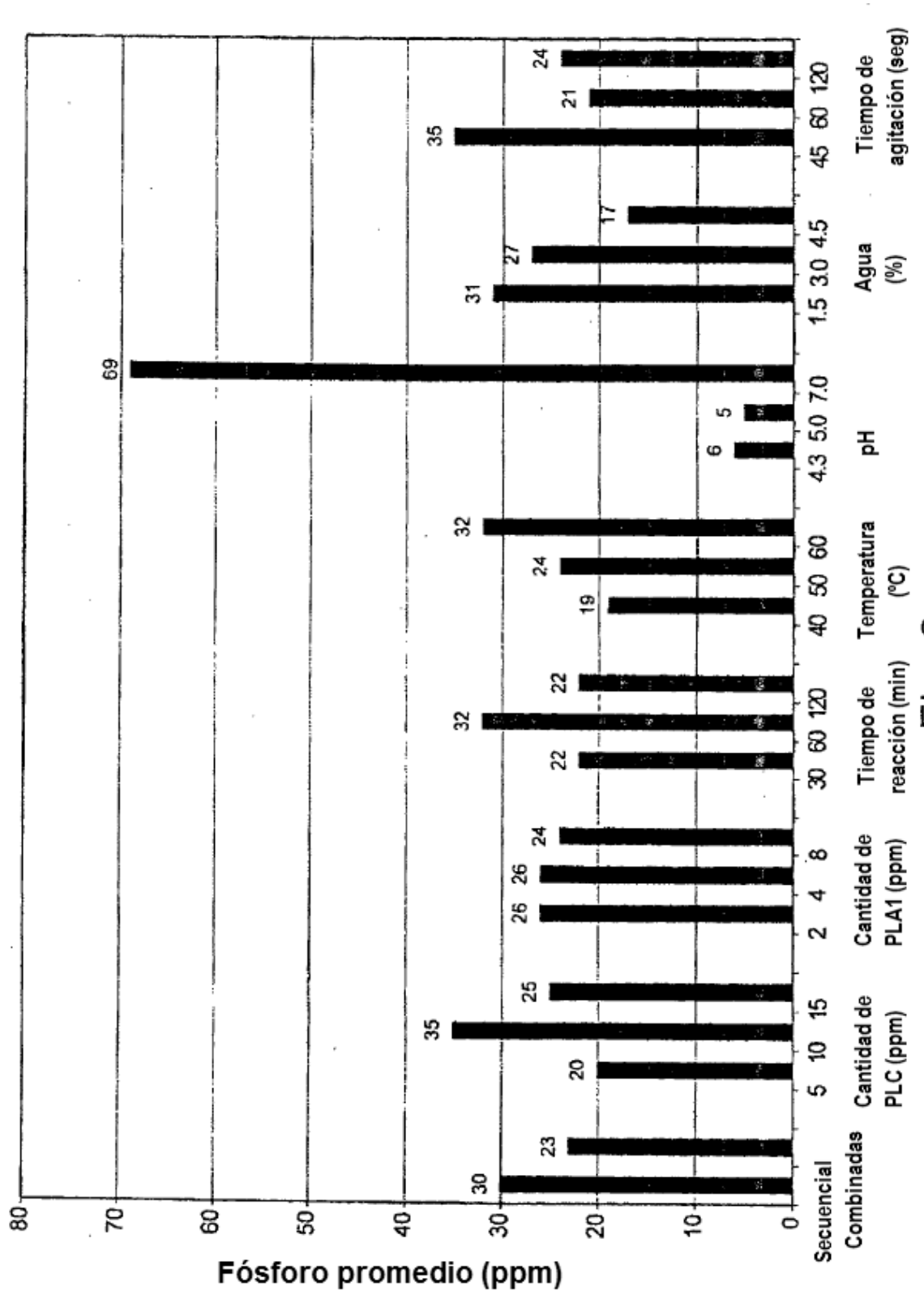

Fósforo promedio (ppm)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Secuencial
Combinadas
Cantidad de PLC (ppm)
5 10 15
Cantidad de PLA1 (ppm)
2 4 8
Tiempo de reacción (min)
30 60 120
Temperatura (°C)
40 50 60
pH
4.3 5.0 7.0
Agua (%)
1.5 3.0 4.5
Tiempo de agitación (seg)
45 60 120
30
23
20
35
25
26
26
24
22
32
22
19
24
32
6
5
69
31
27
17
35
21
24

Fig. 6

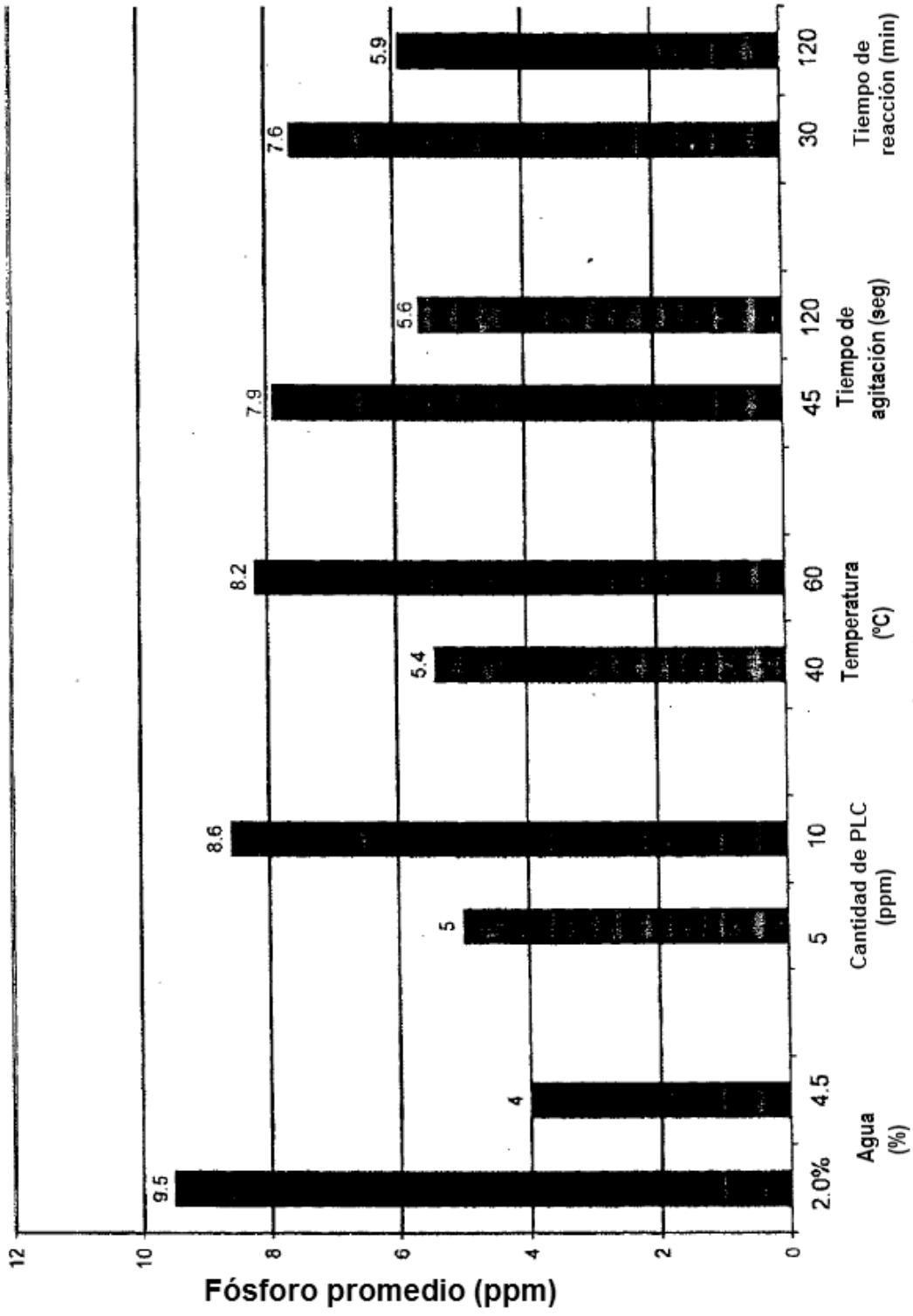

Fósforo promedio (ppm)
12
10
8
6
4
2
0
Agua (%)
2.0%
4.5
Cantidad de PLC (ppm)
5
10
Temperatura (°C)
40
60
Tiempo de agitación (seg)
45
120
Tiempo de reacción (min)
30
120
9.5
4
5
8.6
5.4
8.2
7.9
5.6
7.6
5.9

Fig. 7