

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 402**

51 Int. Cl.:

C11B 1/02 (2006.01)

C11B 3/00 (2006.01)

C11C 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2013 PCT/US2013/045561**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013 WO13188615**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2013 E 13732032 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 2861701**

54 Título: **Procedimiento de producción de aceites de saturación baja**

30 Prioridad:

14.06.2012 US 201261659867 P

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

21.05.2019

73 Titular/es:

**BUNGE GLOBAL INNOVATION, LLC (100.0%)
50 Main Street
White Plains NY 10606, US**

72 Inventor/es:

DAYTON, CHRISTOPHER, L.G.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 713 402 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción de aceites de saturación baja

Referencia cruzada a aplicaciones relacionadas**Campo**

- 5 En la presente memoria se proporciona un procedimiento enzimático de producción de aceites de saturación baja a partir de triacilglicerol. El alcance de la presente invención está definido por el procedimiento de las reivindicaciones. Las enzimas usadas en los procedimientos de la presente memoria son enzimas saturasa. Los aceites producidos por los procedimientos de la presente memoria pueden ser usados en productos alimenticios.

Antecedentes

- 10 Es sabido que las dietas con altos niveles de grasas saturadas elevan el colesterol en sangre y que aumentan el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Por lo tanto, es deseable disminuir la cantidad de grasas saturadas en los productos de consumo. La patente estadounidense nº 8.153.391 y la patente estadounidense nº 8.357.503 describen enzimas saturasa ejemplares que son útiles en la hidrólisis de residuos de ácidos grasos saturados a partir de fuentes de triacilglicerol para obtener aceites de saturación baja.
- 15 En ciertos aspectos, es deseable someter el aceite de saturación baja hidrolizado a un desgomado enzimático para eliminar los fosfolípidos y los metales traza para producir un aceite deseado de larga vida útil. Es importante recuperar los aceites de manera eficiente y rentable; en particular, cuando los procedimientos se llevan a cabo a escala de planta piloto o a escala industrial.
- 20 Ciertos emulsionantes usados para facilitar el procedimiento de hidrólisis pueden interferir en la recuperación del aceite de saturación baja al usar un refinado cáustico al final de los procedimientos de hidrólisis y/o desgomado. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar un procedimiento para la producción rentable de una composición de aceite de saturación baja a partir de una fuente de triacilglicerol.

Compendio de la invención

- 25 En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de producción de una composición de aceite de saturación baja que comprende a) la mezcla de una fuente de triacilglicerol con una solución acuosa de una enzima saturasa en presencia de un emulsionante para obtener una emulsión, comprendiendo el triacilglicerol al menos un residuo de ácido graso saturado y al menos un residuo de ácido graso insaturado, y comprendiendo el emulsionante un sal alcalina de un ácido graso insaturado, b) la mezcla de un ácido acuoso con la emulsión para obtener una mezcla, en la que el ácido se encuentra en una cantidad suficiente para obtener un pH de aproximadamente 1-4 y convertir el emulsionante en un ácido graso insaturado libre y una sal, y c) la separación de la mezcla para obtener un aceite y una fase acuosa, comprendiendo el aceite la composición de aceite de saturación baja.
- 30

- 35 En una realización, el procedimiento comprende, además, entre las etapas b) y c): 1) la mezcla de una solución acuosa de una base con la mezcla de la etapa b) para obtener una mezcla que tiene un pH de aproximadamente 4-9; 2) la mezcla de una enzima fosfolipasa seleccionada entre PLA1, PLA2, PLC y una combinación de las mismas con la mezcla de la etapa c) para obtener una mezcla que comprende un aceite desgomado y una fase acuosa; 3) la separación del aceite desgomado y la fase acuosa para obtener un aceite desgomado separado; y 4) la mezcla del aceite desgomado separado con una solución acuosa de ácido para obtener una mezcla que comprende una fase oleosa y una fase acuosa, encontrándose el ácido en una cantidad suficiente para convertir el emulsionante en un ácido graso insaturado libre y una sal.

- 40 En otra realización, el triacilglicerol comprende al menos un residuo de ácido palmítico.

En otra realización, la enzima saturasa comprende una enzima palmitasa. En otra realización, la enzima saturasa i) está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que comprende la SEC ID N°: 3, o ii) comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:4.

- 45 En otra realización, el aceite que comprende la composición de aceite de saturación baja es sometido a fraccionamiento para separar el ácido graso saturado libre y el aceite de saturación baja. En una realización adicional, el fraccionamiento se realiza i) enfriando el aceite entre -20 y 20°C para solidificar el ácido graso saturado libre, o ii) enfriando el aceite entre -10 y 10°C para solidificar el ácido graso saturado libre.

En otra realización, la cantidad de base en la etapa 1) es suficiente para obtener un pH entre aproximadamente 4,5 y 7.

- 50 En otra realización, la fuente de triacilglicerol comprende un aceite algal, aceite vegetal o un aceite de origen animal, o aceite de soja. En otra realización, el emulsionante comprende oleato de potasio, oleato de sodio o una combinación de los mismos. En una realización, el emulsionante es oleato de potasio.

En otra realización, el ácido es ácido fosfórico, ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido succínico, o una mezcla de los mismos. En otra realización, la base es hidróxido sódico, hidróxido potásico o una mezcla de los mismos.

En otra realización, la mezcla de la enzima saturasa con la fuente de triacilglicerol se realiza a una temperatura entre 20 y 50°C.

5 En la presente memoria se da a conocer un procedimiento de producción de una composición de aceite de saturación baja a partir de una fuente de triacilglicerol que comprende a) la mezcla de una fuente de triacilglicerol con una solución acuosa de una enzima saturasa en presencia de un emulsionante para obtener una emulsión, comprendiendo el triacilglicerol al menos un residuo de ácido graso saturado y al menos un residuo de ácido graso insaturado, y comprendiendo el emulsionante una sal alcalina de un ácido graso insaturado, b) la mezcla de un ácido acuoso con la emulsión, en la que el ácido se encuentra en una cantidad suficiente para convertir el emulsionante en un ácido graso insaturado libre y una sal, c) la separación de la mezcla para obtener un aceite y una fase acuosa. La etapa a) de mezcla se lleva a cabo en condiciones en las que la enzima saturasa está activa. En ciertas realizaciones, el procedimiento comprende, además, el fraccionamiento de la fase oleosa para separar el ácido graso saturado libre y la composición de aceite de saturación baja.

15 En la presente memoria se da a conocer un procedimiento de producción de una composición oleosa baja en palmitato a partir de una fuente de triacilglicerol que comprende a) la mezcla de una fuente de triacilglicerol con una solución acuosa de una enzima palmitasa en presencia de un emulsionante para obtener una emulsión, en la que el triacilglicerol comprende al menos un residuo de ácido graso palmitato y al menos un residuo de ácido graso insaturado, y el emulsionante comprende una sal alcalina de un ácido graso insaturado, b) la mezcla de un ácido acuoso con la emulsión, encontrándose el ácido en una cantidad suficiente para convertir el emulsionante en un ácido graso insaturado libre y una sal, c) la separación de una fase oleosa de una fase acuosa. En ciertas realizaciones, el procedimiento comprende, además, el fraccionamiento de la fase oleosa para separar el ácido graso palmitato libre y la composición de aceite de saturación baja.

25 En ciertas realizaciones, los procedimientos aquí proporcionados comprenden, además, una etapa de desgomado del aceite. En ciertas realizaciones, la etapa de desgomado comprende el desgomado con agua, el desgomado con ácido o el desgomado enzimático. En los procedimientos de la presente memoria puede emplearse cualquier método de desgomado conocido para un experto en la técnica. Se describen métodos ejemplares de desgomado en la patente estadounidense nº 4.049.686, la patente estadounidense nº 4.698.185, la patente estadounidense nº 5.239.096, la patente estadounidense nº 5.264.367, la patente estadounidense nº 5.286.886, la patente estadounidense nº 5.532.163, la patente estadounidense nº 6.001.640, la patente estadounidense nº 6.103.505, la patente estadounidense nº 6.127.137, la patente estadounidense nº 6.143.545, la patente estadounidense nº 6.172.248, la patente estadounidense nº 6.548.633, la patente estadounidense nº 7.226.771, la patente estadounidense nº 7.312.062, la patente estadounidense nº 7.494.676, la patente estadounidense nº 7.713.727, la patente estadounidense nº 8.192.782, la publicación estadounidense nº 2008/0182322, la publicación estadounidense nº 2009/0069587 y la publicación estadounidense nº 2011/0136187.

35 El procedimiento divulgado en la presente memoria de producción de una composición de aceite de saturación baja a partir de un triacilglicerol comprende a) la mezcla de una fuente de triacilglicerol con una solución acuosa de una enzima saturasa en presencia de un emulsionante para obtener una emulsión, comprendiendo el triacilglicerol al menos un residuo de ácido graso saturado and al menos un residuo de ácido graso insaturado, y comprendiendo el emulsionante una sal alcalina de un ácido graso insaturado, b) la mezcla de una solución acuosa de un ácido con la emulsión para obtener una emulsión ácida que tiene un pH menor de aproximadamente 4, c) la mezcla de una solución acuosa de una base para obtener una mezcla que tiene un pH de aproximadamente 4-9, d) la mezcla de una enzima fosfolipasa seleccionada entre PLA1, PLA2, PLC o una combinación de los mismos con la mezcla de la etapa c) para obtener una mezcla que comprende un aceite desgomado y una fase acuosa, e) la separación del aceite desgomado y la fase acuosa para obtener un aceite desgomado separado, f) la mezcla del aceite desgomado separado con una solución acuosa de ácido para obtener una mezcla que comprende una fase oleosa y una fase acuosa, encontrándose el ácido en una cantidad suficiente para convertir el emulsionante en un ácido graso insaturado libre y una sal, y g) la separación de una fase oleosa de la mezcla de la etapa f), comprendiendo el aceite una composición de aceite de saturación baja. La etapa a) de mezclado se lleva a cabo en condiciones en las que la enzima saturasa es activa.

50 En ciertas realizaciones, el aceite separado es fraccionado para separar el ácido graso saturado libre y la composición de aceite de saturación baja.

El procedimiento dado a conocer en la presente memoria para la producción de una composición baja en aceite palmítico comprende a) la mezcla de una fuente de triacilglicerol con una solución acuosa de una enzima palmitasa en presencia de un emulsionante para obtener una emulsión, comprendiendo el triacilglicerol al menos un residuo de ácido graso palmítico y al menos un residuo de ácido graso insaturado, y comprendiendo el emulsionante una sal alcalina de un ácido graso insaturado, b) la mezcla de una solución acuosa de un ácido con la emulsión para obtener una emulsión ácida que tiene un pH menor de aproximadamente 4, c) la mezcla de una solución acuosa de una base para obtener una mezcla que tiene un pH de aproximadamente 4-9, d) la mezcla de una enzima fosfolipasa seleccionada entre PLA1, PLA2, PLC o una combinación de los mismos con la mezcla de la etapa c) para obtener una

mezcla que comprende un aceite desgomado y una fase acuosa, e) la separación del aceite desgomado y la fase acuosa para obtener un aceite desgomado separado, f) la mezcla del aceite desgomado separado con una solución acuosa de ácido para obtener una mezcla que comprende una fase oleosa y una fase acuosa, encontrándose el ácido en una cantidad suficiente para convertir el emulsionante en un ácido graso insaturado libre y una sal, y g) la separación de una fase oleosa de la mezcla de la etapa f), comprendiendo la fase oleosa una composición baja en aceite palmítico. La etapa a) de mezclado se lleva a cabo en condiciones en las que la enzima palmitasa es activa.

En ciertas realizaciones, la fuente de triacilglicerol usada en los procedimientos de la presente memoria es aceite de soja.

Enzimas saturasa ejemplares, que incluyen las enzimas palmitasa, para ser usadas en los procedimientos pueden ser obtenidas mediante métodos conocidos en la técnica; por ejemplo, los métodos descritos en la patente estadounidense nº 8.153.391 y en la patente estadounidense nº 8.357.503.

En ciertas realizaciones, los procedimientos proporcionados en la presente memoria pueden ser adaptados para una producción a escala industrial de aceites de saturación baja.

Los aceites de saturación baja, incluyendo los aceites con bajo contenido palmítico, tales como aceite de soja con bajo contenido palmítico, obtenidos por los procedimientos aquí proporcionados son útiles en productos alimenticios como aceite embotellado, aderezos para ensalada, mayonesa, cremas untables y aceites de cocina.

En ciertas realizaciones, en la presente memoria se proporciona un aceite de soja con bajo contenido palmítico, conteniendo el aceite de soja menos de aproximadamente un 5% de ácido palmítico con respecto al peso total del aceite de soja. En ciertas realizaciones, el aceite de soja con bajo contenido palmítico contiene aproximadamente un 0,5-5% de ácido palmítico con respecto al peso total del aceite de soja.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 ilustra esquemáticamente un procedimiento ejemplar para la producción de aceites de saturación baja.

Descripción detallada

Descripciones

Según se usa en la presente memoria, el término "saturasa" se refiere a una enzima que hidroliza ésteres de ácidos grasos saturados, pudiendo ser los ésteres hidrolizados ésteres de ácidos grasos saturados y glicerol, umbelíferol y otros alcoholes.

Según se usa en la presente memoria, el término "palmitasa" se refiere a una enzima que hidroliza el ácido palmítico, procedente, por ejemplo, de la cadena principal de glicerol. En la patente estadounidense nº 8.153.391 y la patente estadounidense nº 8.357.503 se describen saturasas ejemplares, incluyendo las enzimas palmitasa.

En ciertas realizaciones, las saturasas usadas en la presente memoria hidrolizan selectivamente al menos 45%, 50%, 55%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de los ácidos grasos saturados. En otro aspecto, las palmitasas usadas en la presente memoria hidrolizan selectivamente ácidos grasos de modo que al menos 45%, 50%, 55%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de ácidos grasos hidrolizados sean ácido palmítico. En otro aspecto, las estearatasas usadas en la presente memoria hidrolizan selectivamente los ácidos grasos de modo que al menos 45%, 50%, 55%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de los ácidos grasos hidrolizados sean ácido esteárico.

En ciertas realizaciones, las enzimas saturasa usadas en la presente memoria hidrolizan selectivamente un ácido graso saturado —por ejemplo, un ácido palmítico o un ácido esteárico—, a partir de una posición Sn1, Sn2, y/o Sn3.

Ejemplos de ácidos grasos saturados que pueden ser hidrolizados en los procedimientos descritos en la presente memoria incluyen ácidos grasos saturados que contienen 2-24 átomos de carbono. Ácidos ejemplares incluyen, sin limitación:

Caproico: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$

Caprílico: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$

Cáprico: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$

Undecanoico: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$

Láurico: (ácido dodecanoico): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$

Mirístico: (ácido tetradecanoico): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$

Pentadecanoico: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$

Palmítico: (ácido hexadecanoico): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$

Margárico: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{COOH}$

Esteárico (ácido octadecanoico): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$

Araquídico (ácido eicosanoico): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$

5 Behénico: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$

Según se usa en la presente memoria, "aceite de soja con bajo contenido palmítico" se refiere al aceite de soja obtenido después del tratamiento con una enzima saturasa en los procedimientos descritos en la presente memoria. En ciertas realizaciones, el aceite de soja con bajo contenido palmítico contiene aproximadamente un 0,5-5% de ácido palmítico con respecto al peso total del aceite de soja.

10 Según se usa en la presente memoria, "aceite desgomado" se refiere a un aceite obtenido tras la eliminación de la mayor parte de los fosfolípidos y las lecitinas (denominados colectivamente gomas) del aceite. Los procedimientos usados más comúnmente en la industria para el desgomado de un aceite son el desgomado en agua, el desgomado en ácido, el refinado cáustico y el desgomado enzimático. Se describen procedimientos ejemplares en la patente estadounidense nº 4.049.686, la patente estadounidense nº 4.698.185, la patente estadounidense nº 5.239.096, la
15 patente estadounidense nº 5.264.367, la patente estadounidense nº 5.286.886, la patente estadounidense nº 5.532.163, la patente estadounidense nº 6.001.640, la patente estadounidense nº 6.103.505, la patente estadounidense nº 6.127.137, la patente estadounidense nº 6.143.545, la patente estadounidense nº 6.172.248, la patente estadounidense nº 6.548.633, la patente estadounidense nº 7.226.771, la patente estadounidense nº 7.312.062, la patente estadounidense nº 7.494.676, la patente estadounidense nº 7.713.727 y la patente
20 estadounidense nº 8.192.782, y la publicación estadounidense nº 2008/0182322, la publicación estadounidense nº 2009/0069587; y la publicación estadounidense nº 2011/0136187.

Según se usa en la presente memoria, "aceite de saturación baja" se refiere al aceite obtenido después de la eliminación de uno o más residuos ácidos saturados de un resto de triacilglicerol en el aceite.

25 Según se usa en la presente memoria, "aceite con bajo contenido palmítico" se refiere al aceite obtenido después de la eliminación de uno o más residuos de ácido palmítico de un resto de triacilglicerol en el aceite.

Según se usa en la presente memoria, "fosfolipasas" se refiere a enzimas que presentan actividad con los fosfolípidos. Según se describe, por ejemplo, en la publicación estadounidense nº 2009/0069587, los tipos de fosfolipasas se basan en la posición en la molécula de fosfolípido en la que reacciona la enzima, y son denominadas PLC, PLD y PLA, que incluye PLA1 y PLA2. En ciertas realizaciones, las enzimas PLA incluyen aciltransferasas, incluyendo, sin limitación,
30 las descritas en la patente estadounidense nº 8.192.782 y la publicación estadounidense nº 2011/0136187.

En la presente memoria se da a conocer un procedimiento para la producción de una composición de aceite de saturación baja que comprende a) la mezcla de una fuente de triacilglicerol con una solución acuosa de una enzima saturasa en presencia de un emulsionante para obtener una emulsión, comprendiendo el triacilglicerol al menos un residuo de ácido graso saturado y al menos un residuo de ácido graso insaturado, y comprendiendo el emulsionante una sal alcalina de un ácido graso insaturado, b) la mezcla de un ácido acuoso con la emulsión, encontrándose el ácido en una cantidad suficiente para convertir el emulsionante en un ácido graso insaturado libre y una sal, c) la separación de una fase oleosa y una fase acuosa. En ciertas realizaciones, el procedimiento comprende, además, el fraccionamiento de la fase oleosa para separar el ácido graso saturado libre y la composición de aceite de saturación baja. La etapa a) de mezclado se lleva a cabo en condiciones de reacción en las que la enzima saturasa es activa.
35 Tales condiciones de reacción, incluyendo las condiciones de pH y temperatura, son conocidas para un experto en la técnica.

En la presente memoria se da a conocer un procedimiento para la producción de una composición baja en aceite palmítico que comprende a) la mezcla de una fuente de triacilglicerol con una solución acuosa de una enzima palmitasa en presencia de un emulsionante para obtener una emulsión, comprendiendo el triacilglicerol al menos un residuo de ácido palmítico y al menos un residuo de ácido graso insaturado, y comprendiendo el emulsionante una sal alcalina de un ácido graso insaturado, b) la mezcla de un ácido acuoso con la emulsión, encontrándose el ácido en una cantidad suficiente para convertir el emulsionante en un ácido graso insaturado libre y una sal, c) la separación de una fase oleosa y una fase acuosa. En ciertas realizaciones, el procedimiento comprende, además, el fraccionamiento de la fase oleosa para separar el ácido palmítico y la composición baja en aceite palmítico.
45

50 El procedimiento dado a conocer en la presente memoria para la producción de una composición de aceite de saturación baja comprende a) la mezcla de una fuente de triacilglicerol con una solución acuosa de una enzima saturasa en presencia de un emulsionante para obtener una emulsión, comprendiendo el triacilglicerol al menos un residuo de ácido graso saturado y al menos un residuo de ácido graso insaturado, y comprendiendo el emulsionante una sal alcalina de un ácido graso insaturado, b) la mezcla de una solución acuosa de un ácido con la emulsión para obtener una emulsión ácida que tiene un pH menor de aproximadamente 4, c) la mezcla de una solución acuosa de una base para obtener una mezcla que tiene un pH de aproximadamente 4-9, d) la mezcla de una enzima fosfolipasa seleccionada entre PLA1, PLA2, PLC y una combinación de las mismas con la mezcla de la etapa c) para obtener una mezcla que comprende un aceite desgomado y una fase acuosa, e) la separación del aceite desgomado y la fase acuosa para obtener un aceite desgomado separado, f) la mezcla del aceite desgomado separado con una solución
55

acuosa de ácido para obtener una mezcla que comprende una fase oleosa y una fase acuosa, encontrándose el ácido en una cantidad suficiente para convertir el emulsionante en un ácido graso insaturado libre y una sal, y g) la separación de la fase oleosa de la mezcla de la etapa f), comprendiendo la fase oleosa una composición de aceite de saturación baja.

- 5 El procedimiento dado a conocer en la presente memoria para la producción de una composición baja en aceite palmítico comprende a) la mezcla de una fuente de triacilglicerol con una solución acuosa de una enzima palmitasa en presencia de un emulsionante para obtener una emulsión, comprendiendo el triacilglicerol al menos un residuo de ácido graso palmítico y al menos un residuo de ácido graso insaturado, y comprendiendo el emulsionante una sal alcalina de un ácido graso insaturado, b) la mezcla de una solución acuosa de un ácido con la emulsión para obtener
10 una emulsión ácida que tiene un pH menor de aproximadamente 4, c) la mezcla de una solución acuosa de una base para obtener una mezcla que tiene un pH de aproximadamente 4-9, d) la mezcla de una enzima fosfolipasa seleccionada entre PLA1, PLA2, PLC y una combinación de las mismas con la mezcla de la etapa c) para obtener una mezcla que comprende un aceite desgomado y una fase acuosa, e) la separación del aceite desgomado y la fase acuosa para obtener un aceite desgomado separado, f) la mezcla del aceite desgomado separado con una solución
15 acuosa de ácido para obtener una mezcla que comprende una fase oleosa y una fase acuosa, encontrándose el ácido en una cantidad suficiente para convertir el emulsionante en un ácido graso insaturado libre y una sal, y g) la separación de la fase oleosa de la mezcla de la etapa f), comprendiendo la fase oleosa una composición baja en aceite palmítico. En ciertas realizaciones, la fase oleosa separada es fraccionada para separar el ácido palmítico y la composición baja en aceite palmítico.

- 20 En ciertas realizaciones, los procedimientos proporcionados en la presente memoria pueden ser adaptados para una producción a escala industrial de aceites de saturación baja.

En ciertas realizaciones, la cantidad de ácido en la etapa b) es suficiente para obtener un pH de aproximadamente 1-4, 2-4 o 3-4. En ciertas realizaciones, la cantidad de base en la etapa c) es suficiente para obtener un pH de aproximadamente 4-6,5, 5,5-7, 7-8 u 8-9.

- 25 En ciertas realizaciones, la fase oleosa separada es enfriada entre -20 y 20°C, entre -15 y 15°C, entre -10 y 10°C, entre -5 y 5°C, o entre 0 y 5°C para solidificar el ácido graso saturado, incluyendo ácido palmítico. El ácido graso saturado solidificado es separado mediante métodos conocidos en la técnica para obtener la composición de aceite de saturación baja.

- Las fuentes de triacilglicerol que pueden ser usadas en los métodos proporcionados en la presente memoria incluyen, sin limitación, cualquier aceite algal, aceite vegetal, o una grasa o aceite de origen animal; por ejemplo, aceite de
30 *Neochloris oleoabundans*, aceite de *Scenedesmus dimorphus*, aceite de *Euglena gracilis*, aceite de *Phaeodactylum tricorrmutum*, aceite de *Pleurochrysis carterae*, aceite de *Prymnesium parvum*, aceite de *Tetraselmis chui*, aceite de *Tetraselmis suecica*, aceite de *Isochrysis galbana*, aceite de *Nannochloropsis salina*, aceite de *Botryococcus braunii*,
35 aceite de *Dunaliella tertiolecta*, aceite de la especie *Nannochloris*, aceite de la especie *Spirulina*, aceite de *Chlorophyceae* (algas verdes) y aceite de *Bacilliarophy*, aceite canola, aceite de ricino, aceite de coco, aceite de cilantro, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de avellana, aceite de semilla de cáñamo, aceite de linaza, aceite de *Limnanthes alba*, aceite de oliva, aceite de palma, aceite de palmiste, aceite de cacahuete, aceite de colza, aceite de salvado de arroz, aceite de cártamo, aceite de sasanqua, aceite de soja, aceite de semilla de girasol, *tall oil*, aceite de camelia, variedades de aceites naturales que tienen composiciones de ácidos grasos
40 alteradas a través de organismos modificados genéticamente (GMO) o de reproducción genética tradicional, tales como aceites ricos en ácido oleico, pobres en ácido linolénico o de saturación baja (aceite canola rico en ácido oleico, aceite de soja pobre en ácido linolénico o aceites de girasol ricos en ácido esteárico); grasas animales (sebo, manteca, grasa de mantequilla y grasa de pollo), aceites de pescado (aceite de eulacon, aceite de hígado de bacalao, aceite de reloj anaranjado, aceite de sardina, aceite de arenque y aceite de sábalatlántico), o mezclas de cualesquiera de los
45 anteriores. En una realización, la fuente de triacilglicerol en los procedimientos de la presente memoria es aceite de soja. En otra realización, las fuentes de triacilglicerol en los procedimientos de la presente memoria son aceites en bruto no desgomados o semiprosesados, incluyendo aceites de soja en bruto no desgomados o semiprosesados (desgomados, refinados químicamente, decolorados y/o desodorizados cuando se añade lecitina).

- Los emulsionantes usados en los procedimientos de la presente memoria comprenden sales alcalinas de ácidos grasos insaturados. En los procedimientos descritos en la presente memoria puede usarse cualquier sal alcalina de un ácido graso insaturado conocida para un experto en la técnica. En ciertas realizaciones, el emulsionante es una sal alcalina de un ácido graso insaturado de cadena larga. En ciertas realizaciones, el emulsionante tiene un HLB mayor que 12, 14, 16 o 18. En ciertas realizaciones, el emulsionante tiene un HLB de 12-18, 12-16, 12-14, 14-18, 14-
50 16 o 16-18. En ciertas realizaciones, el emulsionante tiene un HLB de 12, 14, 16 o 18. En ciertas realizaciones, el emulsionante es seleccionado entre oleato de sodio, oleato de potasio, linoleato de sodio, linoleato de potasio, linolenato de sodio, linolenato de potasio o una combinación de los mismos. En una realización, el emulsionante es
55 seleccionado entre oleato de potasio y oleato de sodio.

En ciertas realizaciones, la cantidad de emulsionante usada en los procedimientos de la presente memoria es aproximadamente 1-10%, 2-8%, 2-6%, 2-5% o 3-5% con respecto al peso total del aceite. En una realización, la cantidad de emulsionante usada es aproximadamente 1, 3, 5, 7 o 10% con respecto al peso total del aceite.

5 En ciertas realizaciones, el mezclado de la etapa a) comprende el mezclado por cizallamiento para obtener la emulsión. En ciertas realizaciones, el aceite o grasa se mezcla con el emulsionante antes de la adición de la enzima saturasa. En ciertas realizaciones, la mezcla de aceite/grasa y emulsionante se homogeniza antes y/o después de la adición de la enzima para garantizar una emulsión uniforme.

10 En una realización, el mezclado por cizallamiento se efectúa durante aproximadamente 5-30 minutos, aproximadamente 5-20 minutos, aproximadamente 5-15 minutos, aproximadamente 7-15 minutos, aproximadamente 7-12 minutos o aproximadamente 10 minutos con un mezclador de cizalla, tal como un Ultra Turrax® T-50. En otra realización, el mezclado por cizallamiento se efectúa en un mezclador de cizalla en línea, tal como un DISPAX REACTOR durante menos de aproximadamente 1 minuto.

15 En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de la etapa a) comprende aproximadamente entre un 1 y un 30% de agua con respecto al peso total de los reactivos. En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de la etapa a) comprende aproximadamente del 1 al 20%, 1-15%, 1-10%, 1-5%, 5-25% o 10-25% de agua con respecto al peso total de los reactivos. En una realización, la mezcla de reacción comprende aproximadamente un 1, 3, 5, 7, 10, 15, 17 o 20% de agua con respecto al peso total de los reactivos.

20 En ciertas realizaciones, el procedimiento proporcionado en la presente memoria reduce el contenido saturado, incluyendo el contenido de palmitato del aceite/grasa hasta aproximadamente un 15% o menos, un 10% o menos o un 5% o menos con respecto al peso total del aceite/grasa. En ciertas realizaciones, el contenido saturado, incluyendo el contenido de palmitato del aceite/grasa se reduce hasta aproximadamente un 10, 7, 5, 4, 3, 2, 1% o menos con respecto al peso total del aceite/grasa. En ciertas realizaciones, el procedimiento proporcionado en la presente memoria reduce el contenido saturado, incluyendo el contenido de palmitato del aceite/grasa hasta aproximadamente un 0,5-20%, 3-15%, 3-10%, 3-7%, 3-5%, 2-10%, 2-7%, 2-5%, 1-15%, 1-12%, 1-10%, 1-8%, 1-7% o 1-5%, 1-3%, 0,5-7%, 0,5-5%, 0,5-3% o menos.

En los procedimientos proporcionados en la presente memoria, puede usarse cualquier ácido adecuado para ser usado en un producto alimenticio. Ácidos ejemplares incluyen, sin limitación ácido fosfórico, ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido succínico y una mezcla de los mismos. En una realización, el ácido es ácido cítrico. Bases ejemplares para ser usadas en la presente memoria incluyen, sin limitación, hidróxido sódico e hidróxido potásico.

30 En una realización, la enzima saturasa, incluyendo la enzima palmitasa, es añadida en una sola porción. En una realización, la enzima saturasa, incluyendo la enzima palmitasa, es añadida en múltiples porciones. En una realización, la enzima saturasa, incluyendo la enzima palmitasa, es añadida a la fuente de triacilglicerol a una temperatura entre aproximadamente 15 y 50°C, entre aproximadamente 20 y 40°C, entre aproximadamente 22 y 30°C o entre aproximadamente 22 y 25°C.

35 En ciertas realizaciones, los procedimientos proporcionados en la presente memoria comprenden, además, los procedimientos proporcionados en la presente memoria comprenden, además, una etapa de desgomado del aceite que comprende el desgomado con agua, el desgomado con ácido o el desgomado enzimático. En los procedimientos de la presente memoria puede usarse cualquier método de desgomado conocido para un experto en la técnica. Se describen métodos ejemplares de desgomado are en la patente estadounidense nº 4.049.686, la patente estadounidense nº 4.698.185, la patente estadounidense nº 5.264.367, la patente estadounidense nº 5.532.163, la patente estadounidense nº 6.001.640, la patente estadounidense nº 6.103.505, la patente estadounidense nº 6.127.137, la patente estadounidense nº 6.143.545, la patente estadounidense nº 6.172.248, la patente estadounidense nº 6.548.633, la patente estadounidense nº 7.713.727, la patente estadounidense nº 7.226.771, la patente estadounidense nº 7.312.062, la patente estadounidense nº 7.494.676, la patente estadounidense nº 8.192.782, la publicación estadounidense nº 2008/0188322, la publicación estadounidense nº 2009/0069587, la publicación estadounidense nº 2011/0136187.

50 Las cantidades de enzimas saturasa, palmitasa, PLA y PLC usadas en los procedimientos proporcionados en la presente memoria dependen de las condiciones de reacción, del tipo de aceite y del tipo de enzima usado. En ciertas realizaciones, la cantidad de enzima usada se encuentra en el intervalo entre 10 y 20.000 unidades, entre 20 y 10.000 unidades, entre 50 y 5.000 unidades o entre 100 y 2.000 unidades, por 1 kg de aceite.

55 El procedimiento dado a conocer en la presente memoria para la producción de una composición baja en aceite palmítico comprende a) la mezcla de una fuente de triacilglicerol con una solución acuosa de una enzima palmitasa en presencia de oleato de potasio para obtener una emulsión, comprendiendo el triacilglicerol al menos un residuo de ácido palmítico y al menos un residuo de ácido graso insaturado, b) la mezcla de una solución acuosa de ácido cítrico para ajustar el pH a menos de aproximadamente 4, en una realización a menos de aproximadamente 2, c) la mezcla de una solución acuosa de hidróxido sódico para obtener una mezcla que tiene un pH de aproximadamente 4-9, en una realización aproximadamente 4,5-7, d) la mezcla de una enzima fosfolipasa seleccionada entre PLA1, PLA2, PLC y una combinación de cualquiera de las dos PLA y de PLC para obtener una mezcla que comprende un aceite

desgomado y una fase acuosa, e) la separación del aceite desgomado y la fase acuosa, f) la mezcla del aceite desgomado con una solución acuosa de ácido cítrico para obtener una mezcla que comprende una fase oleosa y una fase acuosa, encontrándose el ácido cítrico en una cantidad suficiente para convertir el oleato de potasio del aceite en un ácido oleico libre y la sal citrato potásico, y g) la separación de la fase oleosa, que comprende una composición baja en aceite palmítico, ácido palmítico y ácido oleico libre. En ciertas realizaciones, la fase oleosa separada es fraccionada para separar el ácido palmítico y la composición baja en aceite palmítico.

En ciertas realizaciones, la fase oleosa separada es enfriada hasta 0-5°C para solidificar el ácido palmítico. El ácido palmítico solidificado es separado para obtener la composición baja en aceite palmítico.

En ciertas realizaciones, la composición de aceite de saturación baja es sometida a etapas adicionales de procesamiento conocidas en la técnica, que incluyen la decoloración o la desodorización, según pueda ser necesario o deseable, dependiendo del uso final para que el que esté prevista la composición oleosa.

Procedimientos ejemplares

En la FIG. 1 se ilustra un procedimiento ejemplar en un diagrama de flujo.

En un procedimiento ejemplar, se usan aproximadamente 1000 kg de aceite de soja en bruto. El aceite es calentado hasta aproximadamente 70°C y mezclado con un agitador de tanque para su homogenización. Si se usa como material de partida aceite no desgomado en bruto, no se añade lecitina alguna al aceite. Si se usan otras fuentes de aceite, incluyendo un aceite desgomado, se añaden hasta aproximadamente 50 kg de lecitina de soja (0 a 5% p/p de aceite) a aproximadamente 70°C y se forma una mezcla uniforme con un agitador de tanque. El aceite es enfriado hasta aproximadamente 20 a 50°C. Se bombean en el aceite aproximadamente 50 kg de enzima formulada con palmitasa a través de un caudalímetro de masas. Se bombean en el aceite aproximadamente 10 a 50 kg de agua (1 a 5% p/p de aceite) a través de un caudalímetro de masas. El aceite es bombeado a través de un mezclador de cizalladura elevada produciendo una emulsión mecánica de agua en aceite en el tanque de reacción 1. El aceite se mezcla durante aproximadamente 24 a 48 horas a una temperatura entre aproximadamente 20 y 50°C. Se añaden y se mezclan aproximadamente 30 a 50 kg de emulsionante de oleato de potasio (3 a 5% p/p de aceite). Se bombean en el aceite aproximadamente 50 kg de enzima formulada con palmitasa a través de un caudalímetro de masas. El aceite será bombeado a través de un segundo mezclador de cizalladura elevada, produciendo una emulsión mecánica de agua en aceite en el tanque de reacción 2.

El aceite se mezcla durante aproximadamente 24 a 72 horas a una temperatura entre aproximadamente 25 y 40°C. Se añaden al aceite aproximadamente 50 partes por millón de Lecitase® Ultra (PLA1) (0,005% p/p de aceite) y/o aproximadamente 200 partes por millón de Purifine® PLC (0,02% p/p de aceite). El aceite se mezcla durante aproximadamente 1 a 4 horas. El aceite es bombeado a través de un intercambiador de calor hasta aproximadamente 85°C, siendo centrifugado a continuación. La fase más ligera de aceite que contiene el ácido palmítico y el oleato de potasio escindidos (1030 a 1050 kg) se separa de la fase pesada, que comprende gomas húmedas y proteína desnaturalizada (130 a 200 kg).

La capa oleosa es enfriada hasta aproximadamente 0 a 5°C y agitada lentamente durante aproximadamente 24 horas. Se deja que el ácido graso palmítico solidifique, permitiendo el fraccionamiento del ácido palmítico. Opcionalmente, se añaden 1 a 10 kg (0,1 a 1% p/p de aceite) de tierra de diatomeas para contribuir al filtrado del aceite tratado. El filtrado, que comprende el aceite con bajo contenido palmítico y el oleato de potasio (857 a 1008 kg), es separado del precipitado, que comprende ácido palmítico y tierra de diatomeas (40 a 160 kg). El precipitado es calentado hasta aproximadamente 100°C y filtrado para obtener un filtrado que comprende ácido palmítico (37 a 137 kg).

Se recoge el material retenido en el filtro que comprende tierra de diatomeas (1,3 a 13 kg).

Procesamiento del aceite tratado con palmitasa

Conversión de jabón en ácido:

El filtrado que comprende el aceite con bajo contenido palmítico y oleato de potasio, descrito anteriormente, es calentado hasta aproximadamente 50 a 70°C en un tanque agitado. Se bombea en el aceite una solución de ácido cítrico a aproximadamente el 50% para convertir los jabones de oleato de potasio en ácido oleico (12 a 20 kg al 50% p/p). En ciertas realizaciones, el tratamiento con ácido para convertir los jabones de potasio en ácido graso puede producirse opcionalmente inmediatamente después de la etapa de centrifugado descrita más arriba, antes del enfriamiento y la separación de los ácidos grasos palmíticos.

Decoloración:

El aceite es calentado hasta aproximadamente 60°C en un tanque agitado, en el que se añaden aproximadamente 1 a 5 kg de tierra decolorante activada con ácido (Tonsil Optimum FF o equivalente) como una suspensión espesa. Se aplica un vacío de aproximadamente 10 kPa (100 mBar) y el aceite es calentado hasta aproximadamente 90 a 120°C durante aproximadamente 30 minutos. El aceite es filtrado para obtener una fracción oleosa que contiene aceite con bajo contenido palmítico y ácidos grasos oleicos (851 a 1007 kg), y una fracción sólida que contiene tierra decolorante

agotada (1,3 a 6,5 kg). En ciertas realizaciones, la extracción del ácido graso palmítico puede producirse después del proceso de decoloración antes de la etapa de desodorización.

Desodorización:

- 5 La fracción oleosa es calentada hasta aproximadamente 250°C a 50 a 300 Pa (0,5 a 3 mBar), añadiéndose aproximadamente 0,1 a 3% (p/p de aceite) de vapor durante aproximadamente 30 a 180 minutos. El aceite es enfriado hasta aproximadamente 100°C, añadiéndose aproximadamente 1 a 25 ppm de ácido cítrico al 50% para quelar cualquier metal traza. El vacío se rompe con nitrógeno para prevenir la exposición del aceite al aire. Tras descargar el aceite del equipo de vacío, el aceite es filtrado a través de una bolsa de 5 micrómetros para eliminar los metales quelados. El aceite es almacenado bajo una capa de nitrógeno.
- 10 Del procedimiento se obtienen el aceite con bajo contenido palmítico refinado, decolorado y desodorizado (786 a 967,7 kg) y un destilado desodorizador que contiene ácido graso oleico (39 a 65 kg). El destilado puede ser tratado con una solución de KOH a aproximadamente el 50% para formar oleato de potasio, que ha de ser reutilizado en el procedimiento (10 a 20 kg).

Enzimas ejemplares usadas en el procedimiento

- 15 En la patente estadounidense nº 8.153.391 y la patente estadounidense nº 8.357.503 se describen una saturasa ejemplar, que incluye enzimas palmitasa, y métodos de obtención de las enzimas.

Las enzimas ejemplares comprenden un polipéptido seleccionado del grupo constituido por polipéptidos sintéticos y recombinantes aislados que tienen una actividad de saturasa, incluyendo palmitasa, en el que el polipéptido

- 20 i) está codificado por un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que tiene una identidad de secuencias de al menos un 85% con respecto a la SEC ID N°: 1 y tiene uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce o más, o la totalidad, de los cambios de residuos de bases enumerados en la Tabla A, la Tabla B o la Tabla C que siguen, codificando el ácido nucleico al menos un polipéptido que tiene una actividad de saturasa, incluyendo palmitasa.

Tabla A

posición del residuo de aminoácido	aminoácido original	aminoácido nuevo	codón original	codón nuevo
7	Y	L	TAC	CTT
15	A	L	GCC	CTG
15	A	M	GCC	ATG
16	D	W	GAT	TGG
31	M	I	ATG	ATT
32	G	E	GGC	GAG
32	G	P	GGC	CCT
34	L	M	CTG	ATG
43	L	I	CTG	ATT
46	F	F	TTC	TTT
48	A	C	GCC	TGT
48	A	M	GCC	ATG
48	A	T	GCC	ACT
49	D	N	GAC	AAT
49	D	R	GAC	CGT
49	D	S	GAC	TCT
52	A	M	GCC	ATG
68	S	F	TCG	TTT
68	S	Y	TCG	TAT
85	R	A	CGG	GCT
85	R	D	CGG	GAT
85	R	Q	CGG	CAG
85	R	S	CGG	TCT
85	R	T	CGG	ACG
85	R	Y	CGG	TAT
95	E	K	GAG	AAG
92	A	V	GCG	GTT
92	A	E	GCG	GAG

ES 2 713 402 T3

posición del residuo de aminoácido	aminoácido original	aminoácido nuevo	codón original	codón nuevo
95	E	D	GAG	GAT
95	E	A	GAG	GCT
96	A	K	GCG	AAG
96	A	R	GCG	AGG
97	A	S	GCC	TCG
101	K	R	AAG	CGT
104	V	L	GTG	TTG
113	Y	L	TAT	CTT
116	E	A	GAG	GCG
116	E	C	GAG	TGT
116	E	D	GAG	GAT
116	E	F	GAG	TTT
116	E	I	GAG	ATT
116	E	I	GAG	ATT
116	E	L	GAG	CTT
116	E	N	GAG	AAT
116	E	Q	GAG	CAG
116	E	S	GAG	AGT
116	E	T	GAG	ACT
116	E	V	GAG	GTT
116	E	W	GAG	TGG
116	E	Y	GAG	TAT
117	L	M	CTG	ATG
120	K	R	AAG	AGG
133	S	A	AGT	GCT
136	A	S	GCG	TCG
137	G	F	GGC	TTT
139	L	M	CTC	ATG
140	H	R	CAC	AGG
142	N	W	AAC	TGG
144	A	I	GCG	ATT
144	A	L	GCG	TTG
144	A	M	GCG	ATG
144	A	V	GCG	GTG
149	E	H	GAG	CAT
150	A	I	GCG	ATT
150	A	M	GCG	ATG
150	A	W	GCG	TGG
153	S	N	AGC	AAT
153	S	G	AGC	GGT
158	N	D	AAC	GAC
162	P	G	CCG	GGT
162	P	K	CCG	AAG
162	P	S	CCG	TCG
162	P	S	CCG	TCG
162	P	S	CCG	TCG
183	V	I	GTG	ATT
166	Q	A	CAG	GCG
166	Q	E	CAG	GAG
166	Q	T	CAG	ACG
167	I	F	ATT	TTT
167	I	K	ATT	AAG
167	I	L	ATT	CTG
167	I	R	ATT	CGT
167	I	Y	ATT	TAT
172	R	H	CGC	CAT
172	R	K	CGC	AAG

ES 2 713 402 T3

posición del residuo de aminoácido	aminoácido original	aminoácido nuevo	codón original	codón nuevo
172	R	L	CGC	CTT
172	R	Y	CGC	TAT
180	L	K	CTC	AAG
180	L	R	CTC	AGG
185	A	C	GCG	TGT
185	A	N	GCG	AAT
190	E	A	GAA	GCG
190	E	K	GAA	AAG
190	E	M	GAA	ATG
190	E	Q	GAA	CAG
190	E	R	GAA	AGG
200	L	I	CTA	ATT
200	L	V	CTA	GTA
200	L	V	CTA	GTT
201	E	Y	GAG	TAT
203	A	H	GCG	CAT
203	A	P	GCG	CCG
203	A	R	GCG	AGG
207	M	L	ATG	CTT
214	T	H	ACC	CAT
214	T	K	ACC	AAG
214	T	R	ACC	AGG
214	T	S	ACC	TCG
214	T	V	ACC	GTT
215	G	A	GGG	GCG
222	L	I	CTG	ATT
225	A	S	GCG	TCT
163	R	Y	CGG	TAT
163	R	M	CGG	ATG
163	R	T	CGG	ACG
163	R	L	CGG	TTG
163	R	C	CGG	TGT
95	E	K		
163	R	F		
183	V	I		

Tabla B

codón viejo	codón nuevo	AA nº	codón viejo	codón nuevo	AA nº	codón viejo	codón nuevo	AA nº	codón viejo	codón nuevo	AA nº	codón viejo	codón nuevo	AA nº	codón viejo	codón nuevo	AA nº
GCG	GCT	35	AGC	AGT	108	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188						
GCG	GCT	35	GTG	GTT	102	AGC	AGT	108	CTG	TTG	124	GTC	GTG	128	AGT	TCT	133
GCG	GCT	35	ACC	ACG	188												
GCG	GCT	35	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188									
GCG	GCT	35	GTG	GTT	102	AGC	AGT	108	GTC	GTG	128						
GCG	GCT	35	GTG	GTT	102	AGC	AGT	108	CTG	TTG	124	GTC	GTG	128	AGT	TCT	133
			GCG	GCT	35	GTG	GTT	102	CTG	TTG	124	GTC	GTG	128			
GCG	GCT	35	GTG	GTT	183												
GCG	GCT	35	GTC	GTG	128	AGT	TCT	133									
GCG	GCT	35	AGT	TCT	133	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188						
GCG	GCT	35	AGC	AGT	108	CTG	TTG	124	AGT	TCT	133	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188
GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	GTG	GTT	102	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	CGG	AGG	126
GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	CTG	CTT	117	CTG	TTG	124				GTG	GTT	183
GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	CGG	AGG	126	ACC	ACG	188
GGC	GGA	45	GTG	GTT	102	CTG	CTT	117	GTC	GTG	128	AGT	TCT	133			
			GGC	GGA	45	GTG	GTT	102	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	CGG	AGG	126
GGC	GGA	45	GTG	GTT	102	CTG	CTT	117									
GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	ACC	ACG	188			
GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	CTG	CTT	117	CTG	TTG	124	GTC	GTG	128	AGT	TCT	133
GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	CTG	TTG	124	AGT	TCT	133

ES 2 713 402 T3

codón viejo	codón nuevo	AA nº	codón viejo	codón nuevo	AA nº	codón viejo	codón nuevo	AA nº	codón viejo	codón nuevo	AA nº	codón viejo	codón nuevo	AA nº	codón viejo	codón nuevo	AA nº
GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	AGT	TCT	133	ACC	ACG	188
GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	GTG	GTT	102	CTG	CTT	117	CTG	TTG	124	CGG	AGG	126
GGC	GGA	45				AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	ACC	ACG	188			
GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	CTG	CTT	117	ACC	ACG	188						
GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	AGC	AGT	108	CGG	AGG	126	GTC	GTG	128	AGT	TCT	133
GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	AGC	AGT	108	AGT	TCT	133						
GCG	GCT	35	GGC	GGA	45												
GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	CTG	TTG	90	GTG	GTT	183						
GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	AGC	AGT	108	GTC	GTG	128	AGT	TCT	133			
GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	GTG	GTT	102	GTC	GTG	128	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188
GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	GTG	GTT	102	ACG	AGT	108	CGG	AGG	126	GTC	GTG	128
GCG	GCT	35	CTG	CTT	117	ACC	ACG	188									
GCG	GCT	35	CTG	CTT	117	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188						
GCG	GCT	35	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	CTG	TTG	124	GTC	GTG	128	AGC	AGT	153
GCG	GCT	35	GTG	GTT	102	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	CGG	AGG	126	AGT	TCT	133
GTG	GTT	102	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	CGG	AGG	126						
GCG	GCT	35	GTG	GTT	102	CTG	CTT	117	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188			
GCG	GCT	35	GTG	GTT	102	CTG	CTT	117	CTG	TTG	124	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188
GCG	GCT	35	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	GTC	GTG	128	AGT	TCT	133	GTG	GTT	183
GCG	GCT	35	CTG	CTT	117	CTG	TTG	124	AGT	TCT	133						
CTG	CTT	117	CGG	AGG	126	AGT	TCT	133	CGC	CAC	172	ACC	ACG	188			
AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188						
AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	CTG	TTG	124	CGG	AGG	126	GTC	GTG	128	GTG	GTT	183
			GCG	GCT	35	CTG	CTT	117	ACC	ACG	188						
GCG	GCT	35	CTG	CTT	117	GTG	GTT	183									
GCG	GCT	35	GTG	GTT	102	CTG	CTT	117	AGT	TCT	133	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188

Tabla B-continuación

codón viejo	codón nuevo	AA nº	codón viejo	codón nuevo	AA nº	codón viejo	codón nuevo	AA nº
			GTG	GTT	183			
GTG	GTT	183						
AGT	TCT	133						
ACC	ACG	188						
ACC	ACG	188						
AGT	TCT	133	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188
ACC	ACG	188						
ACC	ACG	188						

codón viejo	codón nuevo	AA nº	codón viejo	codón nuevo	AA nº	codón viejo	codón nuevo	AA nº
ACC	ACG	188						
ACC	ACG	188						

Tabla C

codón viejo	codón nuevo	AA viejo	AA nuevo	AA nº
CCG	TCG	P	S	162
ACG	ATG	T	M	22
AGC	GGC	S	G	153
GAA	AAA	E	K	190
CGC	CAC	R	H	172
ATG	ATA	M	I	31
GTG	ATG	V	M	83
CTA	ATA	L	I	200
GCA	GTA	A	V	211
ACG	ATG	T	M	22

o

- ii) tiene una identidad de secuencias de al menos un 85% con respecto a la SEC ID N°: 2 en una región de al menos aproximadamente 100 residuos, y que tiene uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce o más, o la totalidad, de los cambios de residuos de aminoácidos enumerados en la Tabla A, la Tabla B o la Tabla C anteriores, o
- iii) comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, pero también comprende al menos una de las modificaciones de residuos de aminoácidos D61A; D61E; R72E; R72K; E116A; E116Q; E116R; E116T; E116V; S133A; I151G; I151A; V163R; D164R, o una combinación de las mismas, o
- iv) comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, pero también comprende al menos una de las modificaciones de residuos de aminoácidos I20L; V62S; G77P; V83C; D88H; Y113G; E116T; E116G; H140K; K146S; I167S; L180E; E194M; A211Q; S212Y; G215C; G215V; G215W; A218H; A218S; V223A; A225M; A225Q, o una combinación de las mismas, o
- v) comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2, pero también comprende las siguientes modificaciones de residuos de aminoácidos D61E; R72K; V83M, R85Y, V163R y R172H.

En ciertas realizaciones, la secuencia de polipéptidos aquí usada es codificada por un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que tiene una identidad de secuencias de al menos 85%, 98%, 90%, 95% con respecto a la SEC ID N°: 1, y tiene uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce o más, o la totalidad, de los cambios de residuos de bases enumerados en la Tabla A, la Tabla B o la Tabla C.

En ciertas realizaciones, la secuencia de polipéptidos aquí usada tiene una identidad de secuencias de al menos 85%, 88%, 90%, 95% con respecto a la SEC ID N°:2, y tiene uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce o más, o la totalidad, de los cambios de residuos de aminoácidos enumerados en la Tabla A, la Tabla B o la Tabla C.

Las secuencias de ácidos nucleicos y polipéptidos a las que se hace referencia anteriormente son las siguientes:

SEC ID N°:1

```
atgctgaaaccgcctccctacggacgcctgctgcgcaactggccgatatcccggccatcgtgacggcaccggttccggggcg
ctgcaaaatgggcaactggcggatggcgagccggtactggtgctgccggcttccctggccgacgacaacgccacctcggg
gctgcgcaagaccttcgatgtcgcgggctttgcctgttcgggctgggaacgcggcttcaacctcggcatcgtggcgacctcgt
ggaccggtggtgcaccggctgcgggctgctggaggcgccgggtggtcagaaggtgatcgtggctcggctggagcctcg
gcgccctctatgcgcgagctgggcccacaaggcgcccgaactgatccggatggtcgtcacgctcggcagtcggctccggttcg
cgacctccacgccaaccatgctggaagatctacgaggcgatcaacagccacacggctcgacaacctcggatcccggctcgatt
tccagattaagccgcccgggtgcaccatcgcgggtgctgctgcgcgctcgaacggggtggtggcgccggagacctcggaaggct
cgcccagcagtcggacgagcggctagagctggcggtgacctacatgggctttgcccgatcgaagaccggggccgaggct
gtggtccggctggtcgcggcgcggtctag
```

SEC ID N°:2 (codificada por la SEC ID N°: 1):

código de 1 letra:

5 MLKPPPYGRLLRELADIPAIVTAPFRGAAKMGKLADGEPVLVLPGLADDNATS
 VLRKTFDVAGFACSGWERGFNLGIRGDLVDRLVDRRLRAVSEAAGGQKVIIVGW
 SLGGLYARELGHKAPELIRMVVTLGSPFAGDLHANHAWKIYEAINSHTVDNLPIP
 VDFQIKPPVRTIAVWSPLDGVVAPETSEGSPEQSDERLELAVTHMGFAASKTGAE
 AVVRLVAARL-

código de 3 letras:

10 Met Leu Lys Pro Pro Pro Tyr Gly Arg Leu Leu Arg Glu Leu Ala Asp
 Ile Pro Ala Ile Val Thr Ala Pro Phe Arg Gly Ala Ala Lys Met Gly
 Lys Leu Ala Asp Gly Glu Pro Val Leu Val Leu Pro Gly Phe Leu Ala
 Asp Asp Asn Ala Tor Ser Val Leu Arg Lys Thr Phe Asp Val Ala Gly
 Phe Ala Cys Ser Gly Trp Glu Arg Gly Phe Asn Leu Gly Ile Arg Gly
 15 Asp Leu Val Asp Arg Leu Val Asp Arg Leu Arg Ala Val Ser Glu Ala
 Ala Gly Gly Gln Lys Val Ile Val Val Gly Trp Ser Leu Gly Gly Leu
 Tyr Ala Arg Glu Leu Gly His Lys Ala Pro Glu Leu Ile Arg Met Val
 Val Thr Leu Gly Ser Pro Phe Ala Gly Asp Leu His Ala Asn His Ala
 Trp Lys Ile Tyr Glu Ala Ile Asn Ser His Thr Val Asp Asn Leu Pro
 20 Ile Pro Val Asp Phe Gln Ile Lys Pro Pro Val Arg Thr Ile Ala Val
 Trp Ser Pro Leu Asp Gly Val Val Ala Pro Glu Tor Ser Glu Gly Ser
 Pro Glu Gln Ser Asp Glu Arg Leu Glu Leu Ala Val Thr His Met Gly
 Phe Ala Ala Ser Lys Thr Gly Ala Glu Ala Val Val Arg Leu Val Ala
 Ala Arg Leu

SEC ID N°:3:

25 ATGCTCAAGCCCCACCTTACGGCCGTCTGCTCCGCGAACTGGCTGATATCCCGG
 CGATCGTGAAGTCTCCGTTCCGCGCGCAGCCAAAATGGGCAAACCTGGCTGATGG
 CGAGCCGGTACTGGTGTGCTGCCCGGCTTCTGGCGGACGACAACGCGACCAGCGT
 GCTGCGGAAGACCTTCGAGGTGCGCCGGCTTTGCGTGCAGCGGCTGGGAAAAGGG
 30 CTTCAACCTCGGCATTCGTGGCGACCTCATGGACTACCTGGTTCGACCGCCTGCGC
 GCCGTGAGCGAGGCCGCGGGGGGCGAAGGTTATCGTGGTGGGCTGGAGTCT
 CGGGCGCTCTACGCCGGGAGCTTGGCCACAAGGCCCGCAACTGATCAGGAT
 GGTCTGACGCTCGGCTCTCCGTTCCGCGCGCAGCTCCACGCGAACCATGCCTG
 GAAGATCTACGAGGCCATCAACTCCCACACGGTTCGACAACCTGCCGATCCCCGCGC
 GATTTCCAGATTAAGCCGCGGTGCATACCATCGCGTGTGGAGCCCGCTCGACG
 35 GGGTGGTGGCCCCGGAGACGAGCGAAGGCAGCCCCGAGCAGAGCGACGAGCGC
 TTGGAGCTGGCCGTGACCCACATGGGCTTTGCGGCTAGCAAGACCGGGGCGGAG
 GCAGTGGTCCGCTGGTGCAGCCCGCCCTCTGA

SEC ID N°:4 (codificada por la SEC ID N°:3):

código de 1 letra:

40 MLKPPPYGRLLRELADIPAIVTAPFRGAAKMGKLADGEPVLVLPGLADDNATS
 VLRKTFEVAGFACSGWEKGFNLGIRGDLMDYLDVDRRLRAVSEAAGGQKVNIVGW
 SLGGLYARELGHKAPELIRMVVTLGSPFAGDLHANHAWKIYEAINSHTVDNLPIP
 RDFQIKPPVHTIAVWSPLDGVVAPETSEGSPEQSDERLELAVTHMGFAASKTGAE
 AVVRLVAARL-

45 código de 3 letras:

50 Met Leu Lys Pro Pro Pro Tyr Gly Arg Leu Leu Arg Glu Leu Ala Asp
 Ile Pro Ala Ile Val Tor Ala Pro Phe Arg Gly Ala Ala Lys Met Gly
 Lys Leu Ala Asp Gly Glu Pro Val Leu Val Leu Pro Gly Phe Leu Ala
 Asp Asp Asn Ala Tor Ser Val Leu Arg Lys Tor Phe Glu Val Ala Gly
 Phe Ala Cys Ser Gly Trp Glu Lys Gly Phe Asn Leu Gly Ile Arg Gly
 Asp Leu Met Asp Tyr Leu Val Asp Arg Leu Arg Ala Val Ser Glu Ala
 Ala Gly Gly Gln Lys Val Ile Val Val Gly Trp Ser Leu Gly Gly Leu
 Tyr Ala Arg Glu Leu Gly His Lys Ala Pro Glu Leu Ile Arg Met Val
 Val Thr Leu Gly Ser Pro Phe Ala Gly Asp Leu His Ala Asn His Ala
 55 Trp Lys Ile Tyr Glu Ala Ile Asn Ser His Thr Val Asp Asn Leu Pro
 Ile Pro Arg Asp Phe Gln Ile Lys Pro Pro Val His Thr Ile Ala Val
 Trp Ser Pro Leu Asp Gly Val Val Ala Pro Glu Thr Ser Glu Gly Ser

Pro Glu Gln Ser Asp Glu Arg Leu Glu Leu Ala Val Thr His Met Gly
 Phe Ala Ala Ser Lys Thr Gly Ala Glu Ala Val Val Arg Leu Val Ala
 Ala Arg Leu

5 En una realización, la enzima palmitasa usada en los procedimientos proporcionados en la presente memoria comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:2 y comprende, además, las siguientes modificaciones de residuos de aminoácidos: D61E; R72K; V83M, R85Y, V163R y R172H.

En una realización, la enzima palmitasa usada en los procedimientos proporcionados en la presente memoria es codificada por un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la SEC ID N°:3.

10 En una realización, la enzima palmitasa usada en los procedimientos proporcionados en la presente memoria comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:4.

En una realización, la enzima palmitasa usada en los procedimientos proporcionados en la presente memoria tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:2 y tiene, además, las siguientes modificaciones de residuos de aminoácidos: D61E; R72K; V83M, R85Y, V163R y R172H.

15 En una realización, la enzima palmitasa usada en los procedimientos proporcionados en la presente memoria es codificada por una secuencia de ácidos nucleicos de la SEC ID N°:3.

En una realización, la enzima palmitasa usada en los procedimientos proporcionados en la presente memoria tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:4.

20 En los ejemplos que siguen se definen diversas realizaciones del procedimiento. En cada uno de los ejemplos que siguen, el mezclador de cizalla usado es un Ultra Turrax® T-50. La enzima PLA1 fue Lecitase® Ultra, y la enzima PLC fue Purifine®.

Ejemplo 1: Procedimiento enzimático

En este ejemplo, se usó aceite de soja en bruto que tenía la siguiente composición:

25 Contenido de ácido palmítico-10,8%
 Fósforo – 567,7 ppm
 Calcio - 48,53 ppm
 Magnesio - 45,14 ppm
 Ácido graso libre 0,43%.

30 Se añadieron a un tanque de acero inoxidable aproximadamente 165,3 kg de aceite de soja en bruto filtrado. El tanque fue agitado a 70 rpm a 22,8°C. Se añadieron aproximadamente 6 kg de palmitasa formulada (número de lote LIP 29241-PK005; se añadieron 2 kg de agua a 3 botellas que contenían 80 gramos de enzima en polvo). El aceite fue mezclado por cizallamiento durante 15 minutos con un Ultra Turrax® T-50. La mezcla se realizó en el tanque a 70 rpm durante 24 horas. Se añadieron al tanque aproximadamente 9 kg de oleato de potasio (obtenidos en Viva Corporation (India)) y fueron mezclados por cizallamiento durante 10 minutos con un Ultra Turrax® T-50. Se añadieron al tanque otros 8 kg de palmitasa formulada (lote 29241-PK005, obtenido en Verenium Corporation) preparada como
 35 anteriormente y fueron mezclados por cizallamiento durante 15 minutos con un Ultra Turrax® T- 50. La mezcla se realizó en el tanque durante 48 horas.

40 Se añadieron aproximadamente 165,3 gramos de ácido cítrico al 50% (p/p) y fueron mezclados durante 1 hora, seguido por la adición de 264 gramos de hidróxido sódico al 10% (p/p). Los contenidos fueron debidamente mezclados. Se añadieron aproximadamente 8,25 gramos de Lecitase® Ultra PLA1 de Novozyme y fueron mezclados durante aproximadamente 2 horas. La mezcla de reacción fue calentada hasta 80°C, y centrifugada. La emulsión mecánica fue separada en capas oleosa y acuosa. No se observó ningún problema de separación en esta etapa (aproximadamente 14 kg de agua presente en el sistema > 10%). El análisis de una muestra de la fracción oleosa mostró la siguiente composición:

45 Contenido de ácido palmítico 2,9%
 Fósforo- 59,43 ppm
 Calcio- 29,09 ppm
 Magnesio - 16,49 ppm
 Hierro - por debajo de la detección

Ejemplo 2: Refinado cáustico

50 Se efectuó un intento de refinado cáustico de la capa oleosa obtenida anteriormente. La capa oleosa tenía un contenido de ácido graso libre (FFA) del 12,4%. En este estudio, únicamente se neutralizó un 2% del FFA. La capa oleosa fue calentada hasta aproximadamente 80°C mientras se mezclaba. Se añadieron aproximadamente 7,52 kg de hidróxido sódico al 10% (p/p) y fueron mezclados lentamente durante 10 minutos, formando inesperadamente una

emulsión. El aceite fue centrifugado. Sin embargo, el aceite que salió de la centrifuga fue una emulsión que tenía una consistencia semejante a la de la mayonesa, y no pudo ser separado en capas oleosa y acuosa. No fue posible refinar cáusticamente el aceite tratado con palmitasa.

5 Se añadieron a la emulsión aproximadamente 20 litros de agua y se dejó que reposaran durante la noche en un intento por separar la emulsión. Se creía que dejar que las moléculas de agua en la emulsión tuvieran tiempo de unirse separaría las capas oleosa y acuosa. No se observó separación alguna.

Sin entrar en consideraciones teóricas, se creía que la adición de hidróxido sódico para reducir los ácidos grasos libres (FFA) formaba una emulsión muy fuerte con el agua y el aceite.

Ejemplo 3: Refinado físico

10 El aceite tratado con palmitasa del Ejemplo 1 fue sometido a un refinado físico después del tratamiento con un ácido. En esta etapa se usaron aproximadamente 120 kg de aceite tratado con palmitasa. Se añadieron al aceite aproximadamente 10 kg de ácido cítrico acuoso al 50% (p/p). La mezcla de reacción fue mezclada durante aproximadamente 30 minutos. Las fases acuosa y oleosa fueron separadas centrifugando el material a 80°C. En esta etapa, la cantidad de ácido graso libre fue aproximadamente un 19%, y los jabones fueron aproximadamente 304 ppm.

15 Ejemplo 4: Decoloración y desodorización

La fase oleosa fue sometida a una etapa de decoloración como sigue: se añadieron 298 gramos de TrySil® S615, 995 gramos de BASF FF 105 y 500 gramos de adyuvante de filtrado. La mezcla fue calentada hasta 105°C a un vacío de 6 kPa (60 mBar) y mezclada durante 30 minutos (blanqueador). El aceite fue filtrado a través de un filtro de placa y tela.

20 El aceite decolorado tenía un contenido de FFA de aproximadamente un 21,15%, jabón = 0 ppm, fósforo = 0 ppm, valor de peróxido (PV) = 0,0 y ácido palmítico= 3,7%.

El aceite decolorado fue desodorizado calentando al vacío hasta 260°C con un 3% de vapor de borboteo por hora durante 5 horas. El aceite fue enfriado hasta 100°C y el vacío fue roto con nitrógeno. El análisis del aceite desodorizado mostró lo siguiente:

25 FFA--0,45%
PV=0,00
Fósforo -- 0 ppm
Ácido palmítico -- 4,2%.

Ejemplo 5: Procedimiento enzimático

30 En este ejemplo, se usó aceite de soja en bruto que tenía la composición siguiente:

Contenido de ácido palmítico - 10,2%
Fósforo-681,4 ppm
Calcio-61,2 ppm
Magnesio - 64,2 ppm
35 Hierro - 0,59 ppm

Se añadieron a un tanque de acero inoxidable aproximadamente 127 kg de aceite de soja en bruto filtrado. El tanque fue agitado a 70 rpm a 31°C. Se añadieron aproximadamente 8 kg de palmitasa formulada (lote número 060512; se añadieron 2 kg de agua a 4 botellas que contenían 80 gramos de enzima en polvo liofilizada). El aceite fue mezclado por cizallamiento durante 15 minutos con un Ultra Turrax® T-50. El tanque fue agitado a 70 rpm y cubierto. Se tomaron 40 muestras del aceite después de 45 horas de reacción.

No había oleato de potasio de calidad reactiva disponible para el ensayo, así que se produjo un lote rápido de jabones de potasio añadiendo 1,62 kg de hidróxido potásico disuelto en 1,47 kg de agua. La solución de hidróxido potásico fue añadida muy lentamente a 8,26 kg de aceite de soja refinado y decolorado. Una vez se hubo añadido al aceite toda la solución cáustica, la mezcla solución cáustica:aceite fue mezclada por cizallamiento con un mezclador Ultra Turrax® 45 T-50 durante 30 minutos. La temperatura aumento de la temperatura ambiente hasta aproximadamente 71°C. Una vez la mezcla hubo enfriado hasta la temperatura ambiente, los jabones de potasio fueron añadidos al aceite, aproximadamente 6 horas después de que se hubiera extraído la muestra a las 45 horas. Se tomaron muestras del aceite antes de la adición de los jabones de potasio.

50 Se añadieron aproximadamente 10 kg de palmitasa formulada (lote número 060512; se añadieron 2 kg de agua a 4 botellas que contenían 80 gramos de enzima en polvo liofilizada). El aceite fue mezclado por cizallamiento durante 15 minutos con un Ultra Turrax® T-50. El tanque fue agitado a 70 rpm y cubierto. Se extrajeron muestras adicionales a las 70 horas y las 95 horas después de la carga inicial de enzima palmitasa.

Se añadieron aproximadamente 9 gramos de Lecitase® Ultra (lote número LYN05035) y aproximadamente 26 gramos de Purifine® PLC (lote número 190AU008A1) y fueron mezclados por cizallamiento durante 15 minutos. Se añadieron aproximadamente 3,81 kg de agua y fueron mezclados por cizallamiento durante 15 minutos. El aceite fue agitado a 45 - 47°C durante dos horas.

5 Se añadieron al aceite aproximadamente 4 kg de ácido cítrico al 50% (p/p) y fueron mezclados por cizallamiento durante 5 minutos. Se añadió ácido para convertir los jabones de potasio de soja en ácidos grasos. A continuación, el aceite fue calentado hasta 85°C y centrifugado. El aceite contenía 304 ppm de jabón, por lo que el aceite se lavó con un 5% de agua caliente (p/p) para eliminar el jabón restante.

10 El aceite caliente (a aproximadamente 85°C) fue enfriado entonces con agitación de 70 rpm en un tanque encamisado de acero inoxidable con agua a 4,5°C. Se dejó que el tanque siguiera enfriándose durante la noche con agitación. Aproximadamente 14 horas más tarde, el aceite en el tanque alcanzó los 8°C.

Se añadieron aproximadamente 1,8 kg de adyuvante de filtrado al tanque agitado y se dejó que se volviera uniforme durante aproximadamente 30 minutos. El aceite enfriado fue filtrado entonces usando un filtro de placa y tela para eliminar el ácido palmítico sólido. Tras el filtrado se recogieron aproximadamente 72 kg de aceite tratado con palmitasa.

15 TABLA 1

Tiempo de reacción (horas)	Ácido palmítico (%)
0	10,2
45	3,7
51	2,6
70	2,8
95	4,0

Está claro, por los datos de la Tabla 1, que los jabones de potasio generados rápidamente no eran neutros y que el exceso de hidróxido potásico desactivó la palmitasa tras su adición.

Ejemplo 6: Procedimiento enzimático

20 Los 72 kg de aceite de soja tratado con palmitasa del Ejemplo 4 fue calentado hasta 70 - 72°C en un tanque. Se añadieron al aceite 6 kg de oleato de potasio (obtenido en Viva Corporation (India), lote número POT/115). Se añadió 1,0 kg de lecitina de soja (3FUB, lote número T180007025 de Bunge) y la mezcla fue enfriada con una agitación de 70 rpm hasta 23°C.

25 Se añadieron al aceite aproximadamente 6,6 kg de palmitasa formulada (lote número LIP 29241PK05; se añadieron 2,2 kg de agua a 3 botellas que contenían 100 gramos de enzima en polvo liofilizada). El aceite fue mezclado por cizallamiento durante 15 minutos con un Ultra Turrax® T-50. El tanque fue agitado a 70 rpm y cubierto.

Se extrajeron muestras tras un tiempo de reacción de 24, 48 y 72 horas y fueron analizadas para encontrar su contenido de ácido palmítico. Los resultados aparecen en la Tabla 2.

TABLA 2

Tiempo de reacción (horas)	Ácido palmítico (%)
0	4,0
24	1,6
48	1,6
72	1,1

30 El aceite fue calentado hasta 40 a 45°C con agitación. Se añadieron al aceite aproximadamente 36 gramos de ácido cítrico al 50% (p/p) y fueron mezclados por cizallamiento durante 10 minutos. Se añadieron al aceite 50,1 ml de hidróxido sodico 4 normal y fueron mezclados por cizallamiento durante 10 minutos. Se añadieron 3 gramos de Lecitase® Ultra (lote número LYN05035), 12 gramos de Purifine® PLC (lote número 190AU015A1) y 1 kg de agua y fueron mezclados por cizallamiento durante 10 minutos. El tanque fue cubierto y agitado durante 4 horas para permitir que las fosfolipasas destruyeran los fosfolípidos. Se añadieron 1,2 kg de ácido cítrico al 50% (p/p) para convertir el oleato de potasio en ácidos grasos. El aceite fue calentado hasta 85°C y centrifugado. La emulsión mecánica fue separada en capas oleosa y acuosa.

35

Ejemplo 7: Procedimiento enzimático

En este ejemplo, se usó aceite de soja en bruto que tenía la composición siguiente:

40 Contenido de ácido palmítico- 10,8%
Fósforo - 767,8 ppm

Calcio-71,2 ppm
 Magnesio - 74,9 ppm
 Hierro – 0,7 ppm
 Ácido graso libre-0,89%

5 Se añadieron a un tanque de acero inoxidable aproximadamente 120 kg de aceite de soja en bruto filtrado. El aceite fue calentado hasta 76°C con una agitación de 70 rpm, y luego enfriado hasta 23°C. Se añadieron al tanque aproximadamente 6 kg de palmitasa formulada (lote número LIP29241-PK05; se añadieron 2 kg de agua a 3 botellas que contenían 100 gramos de enzima en polvo liofilizada). El aceite fue mezclado por cizallamiento durante 15 minutos con un Ultra Turrax® T-50. El tanque fue agitado a 70 rpm y cubierto. El aceite fue muestreado después de 24, 48 y 10 72 horas después de la carga inicial de palmitasa, y fue analizado en busca de su contenido de ácido palmítico.

Se añadieron al aceite 1,0 kg de lecitina de soja (3FUB, lote número T180007025 de Bunge) y 6 kg de oleato de potasio (obtenido en Viva Corporation (India), lote número POT/115). La mezcla fue mezclada por cizallamiento durante 15 minutos con un Ultra Turrax®. Se añadieron aproximadamente 6 kg de palmitasa formulada (lote número LIP 29241PK05; se añadieron 2 kg de agua a 3 botellas que contenían 100 gramos de enzima en polvo liofilizada). El 15 aceite fue mezclado por cizallamiento durante 15 minutos con un Ultra Turrax® T-50. El tanque fue agitado a 70 rpm y cubierto. El aceite fue muestreado 96 y 144 horas después de la carga inicial de palmitasa.

El aceite fue calentado hasta aproximadamente 45°C. Se añadieron al aceite aproximadamente 60 gramos de ácido cítrico al 50% (p/p) y fueron mezclados por cizallamiento durante 10 minutos. Se añadieron al aceite 100,2 ml de hidróxido sódico 4 normal y la mezcla fue mezclada por cizallamiento durante 10 minutos. Se añadieron 6 gramos de 20 Lecitase® Ultra (lote número LYN05035), 24 gramos de Purifine® PLC (lote número 190AU015A1), y 2 kg de agua y fueron mezclados por cizalladura durante 10 minutos. El tanque fue cubierto y agitado durante 4 horas para permitir que las fosfolipasas destruyeran los fosfolípidos. Se añadieron 2,4 kg de ácido cítrico al 50% (p/p) para convertir el oleato de potasio en ácidos grasos. El aceite fue calentado hasta 85°C y centrifugado. La emulsión mecánica fue separada en capas oleosa y acuosa. La capa oleosa fue analizada para encontrar su contenido de ácido palmítico.

25

TABLA 3

Tiempo de reacción (horas)	Ácido palmítico (%)
0	10,8
24	5,7
48	5,1
72	5,1
96	2,5
144	1,9

Experimento 8: Eliminación del ácido graso palmítico

Los aceites tratados con palmitasa de los Experimentos 5 y 6 fueron combinados para la eliminación del ácido palmítico utilizando un fraccionamiento en seco. La mezcla de aceite:ácido graso contenía un total de un 9,1% de ácido palmítico. El aceite fue calentado hasta 80°C con agitación para garantizar que el aceite era completamente líquido. 30 El aceite fue colocado en un MoBulizer™. El aceite fue enfriado isotérmicamente hasta aproximadamente 10°C con agua enfriada a aproximadamente 10°C y mantenido durante 8 horas para permitir la formación de cristales (tiempo total de cristalización de 20,3 horas). A continuación, el aceite fue filtrado usando un filtro de laboratorio L-Frac™. La presión obtenida durante el filtrado fue de 600 kPa (6 bar). La fracción de oleína o el aceite líquido obtenido tenía un contenido residual de ácido palmítico en la mezcla del 3,9% (aproximadamente 1,5% estaba unido a la cadena principal de glicerol y 2,4% estaba como ácido palmítico libre). La fracción de estearina o los sólidos obtenidos tenían un contenido de ácido palmítico de aproximadamente un 33%. A continuación, el aceite podía ser decolorado y 35 refinado físicamente para eliminar los ácidos grasos restantes.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> BUNGE OILS, INC. DAYTON, Christopher L. G.

<120> PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE ACEITES DE SATURACIÓN BAJA

5 <130> 11631-079-228

<150> 61/659,867
<151> 14-06-2012

10 <160> 4

<170> FastSEQ for Windows Versión 4.0

15 <210> 1
<211> 684
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Generado sintéticamente

<400> 1
atgctgaaac cgcctcccta cggacgcctg ctgcgcgaac tggccgatat cccggccatc 60
gtgacggcac cgttccgggg cgctgcgaaa atgggcaaac tggcggatgg cgagccggta 120
ctggtgctgc ccggcttcct ggccgacgac aacgccacct cggtgctgcg caagaccttc 180
gatgtcgcgg gctttgcctg ttcgggctgg gaacgcggct tcaacctcgg cattcgtggc 240
gacctcgtgg accggctggt cgaccggctg cgggcgggtg cggagggcggc cgggtggtcag 300
aaggtgatcg tggtcggctg gacccctcggc ggcctctatg cgcgcgagct gggccacaag 360
gcgcccgaac tgatccggat ggtcgtcacg ctccggcagtc cgttcgcggg cgacctccac 420
gccaaccatg cgtggaagat ctacgaggcg atcaacagcc acacggtcga caacctgccg 480
atcccggctc atttccagat taagccgccc gtgcgcacca tcgcgggtgtg gtcgccgctc 540
gacggggtgg tggcgccgga gacctcggaa ggctcggccc agcagtcgga cgagcggcta 600
gagctggcgg tgaccacat gggctttgcc gcatcgaaga ccggggccga ggctgtggtc 660
cggctggtcg cggcgcggct ctag 684

25 <210> 2
<211> 227
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Generado sintéticamente

<400> 2
Met Leu Lys Pro Pro Pro Tyr Gly Arg Leu Leu Arg Glu Leu Ala Asp
1 5 10 15
Ile Pro Ala Ile Val Thr Ala Pro Phe Arg Gly Ala Ala Lys Met Gly
20 25 30
Lys Leu Ala Asp Gly Glu Pro Val Leu Val Leu Pro Gly Phe Leu Ala
35 40 45
Asp Asp Asn Ala Thr Ser Val Leu Arg Lys Thr Phe Asp Val Ala Gly
50 55 60
Phe Ala Cys Ser Gly Trp Glu Arg Gly Phe Asn Leu Gly Ile Arg Gly
65 70 75 80
Asp Leu Val Asp Arg Leu Val Asp Arg Leu Arg Ala Val Ser Glu Ala
85 90 95
Ala Gly Gly Gln Lys Val Ile Val Val Gly Trp Ser Leu Gly Gly Leu
100 105 110

35

ES 2 713 402 T3

Tyr Ala Arg Glu Leu Gly His Lys Ala Pro Glu Leu Ile Arg Met Val
 115 120 125
 Val Thr Leu Gly Ser Pro Phe Ala Gly Asp Leu His Ala Asn His Ala
 130 135 140
 Trp Lys Ile Tyr Glu Ala Ile Asn Ser His Thr Val Asp Asn Leu Pro
 145 150 155 160
 Ile Pro Val Asp Phe Gln Ile Lys Pro Pro Val Arg Thr Ile Ala Val
 165 170 175
 Trp Ser Pro Leu Asp Gly Val Val Ala Pro Glu Thr Ser Glu Gly Ser
 180 185 190
 Pro Glu Gln Ser Asp Glu Arg Leu Glu Leu Ala Val Thr His Met Gly
 195 200 205
 Phe Ala Ala Ser Lys Thr Gly Ala Glu Ala Val Val Arg Leu Val Ala
 210 215 220
 Ala Arg Leu
 225

5 <210> 3
 <211> 684
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Generado sintéticamente

<400> 3
 atgctcaagc cccacacctta cggccgtctg ctccgcgaac tggctgatat cccggcgatc 60
 gtgactgctc cgttccgcgg cgcagccaaa atgggcaaac tggctgatgg cgagccggta 120
 ctggtgctgc ccggttcct ggcggacgac aacgcgacca gcgtgctgcg gaagaccttc 180
 gaggtcgccg gctttgctg cagcggctgg gaaaagggct tcaacctcgg cattcgtggc 240
 gacctcatgg actacctggt cgaccgcctg cgcgccgtga gcgaggccgc gggggggcag 300
 aaggttatcg tggtcggctg gagtctcggc ggcctctacg cccgggagct tggccacaag 360
 gccccgaac tgatcaggat ggtcgtcacg ctccgctctc cgttcgcggc cgacctccac 420
 gcgaaccatg cctggaagat ctacgaggcc atcaactccc acacggtcga caacctgccg 480
 atcccgcgcg atttccagat taagccgcgg gtgcatacca tcgccgtgtg gagcccgtc 540
 gacgggggtg tggccccgga gacgagcga ggcagccccg agcagagcga cgagcgcttg 600
 gagctggccg tgaccacat gggctttcgc gctagcaaga cgggggcgga ggcagtggtc 660
 cgcctggtcg ccgcccgcct ctga 684

15 <210> 4
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Generado sintéticamente

<400> 4
 Met Leu Lys Pro Pro Pro Tyr Gly Arg Leu Leu Arg Glu Leu Ala Asp
 1 5 10 15
 Ile Pro Ala Ile Val Thr Ala Pro Phe Arg Gly Ala Ala Lys Met Gly
 20 25 30
 Lys Leu Ala Asp Gly Glu Pro Val Leu Val Leu Pro Gly Phe Leu Ala
 35 40 45
 Asp Asp Asn Ala Thr Ser Val Leu Arg Lys Thr Phe Glu Val Ala Gly
 50 55 60
 Phe Ala Cys Ser Gly Trp Glu Lys Gly Phe Asn Leu Gly Ile Arg Gly
 65 70 75 80
 Asp Leu Met Asp Tyr Leu Val Asp Arg Leu Arg Ala Val Ser Glu Ala
 85 90 95
 Ala Gly Gly Gln Lys Val Ile Val Val Gly Trp Ser Leu Gly Gly Leu
 100 105 110

25

ES 2 713 402 T3

Tyr Ala Arg Glu Leu Gly His Lys Ala Pro Glu Leu Ile Arg Met Val
 115 120 125
 Val Thr Leu Gly Ser Pro Phe Ala Gly Asp Leu His Ala Asn His Ala
 130 135 140
 Trp Lys Ile Tyr Glu Ala Ile Asn Ser His Thr Val Asp Asn Leu Pro
 145 150 155 160
 Ile Pro Arg Asp Phe Gln Ile Lys Pro Pro Val His Thr Ile Ala Val
 165 170 175
 Trp Ser Pro Leu Asp Gly Val Val Ala Pro Glu Thr Ser Glu Gly Ser
 180 185 190
 Pro Glu Gln Ser Asp Glu Arg Leu Glu Leu Ala Val Thr His Met Gly
 195 200 205
 Phe Ala Ala Ser Lys Thr Gly Ala Glu Ala Val Val Arg Leu Val Ala
 210 215 220
 Ala Arg Leu
 225

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de una composición de aceite de saturación baja que comprende:
 - a) la mezcla de una fuente de triacilglicerol con una solución acuosa de una enzima saturasa en presencia de un emulsionante para obtener una emulsión, comprendiendo el triacilglicerol al menos un residuo de ácido graso saturado y al menos un residuo de ácido graso insaturado, y comprendiendo el emulsionante una sal alcalina de un ácido graso insaturado,
 - b) la mezcla de un ácido acuoso con la emulsión para obtener una mezcla, en la que el ácido se encuentra en una cantidad suficiente para obtener un pH de aproximadamente 1-4 y convertir el emulsionante en un ácido graso insaturado libre y una sal, y
 - c) la separación de la mezcla para obtener un aceite y una fase acuosa, comprendiendo el aceite la composición de aceite de saturación baja.
2. El procedimiento de la reivindicación 1 que, además, comprende, entre las etapas b) y c):
 - 1) la mezcla de una solución acuosa de una base con la mezcla de la etapa b) para obtener una mezcla que tiene un pH de aproximadamente 4-9,
 - 2) la mezcla de una enzima fosfolipasa seleccionada entre PLA1, PLA2, PLC y una combinación de las mismas con la mezcla de la etapa c) para obtener una mezcla que comprende un aceite desgomado y una fase acuosa,
 - 3) la separación del aceite desgomado y la fase acuosa para obtener un aceite desgomado separado, y
 - 4) la mezcla del aceite desgomado separado con una solución acuosa de ácido para obtener una mezcla que comprende una fase oleosa y una fase acuosa, encontrándose el ácido en una cantidad suficiente para convertir el emulsionante en un ácido graso insaturado libre y una sal.
3. El procedimiento de las reivindicaciones 1 o 2 en el que el triacilglicerol comprende al menos un residuo de ácido palmítico.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en el que la enzima saturasa comprende una enzima palmitasa.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la enzima saturasa i) está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que comprende la SEC ID N°: 3, o ii) comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°:4.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en el que el aceite que comprende la composición de aceite de saturación baja es sometido a fraccionamiento para separar el ácido graso saturado libre y el aceite de saturación baja.
7. El procedimiento de la reivindicación 6 en el que el fraccionamiento se realiza i) enfriando el aceite entre -20 y 20°C para solidificar el ácido graso saturado libre, o ii) enfriando el aceite entre -10 y 10°C para solidificar el ácido graso saturado libre.
8. El procedimiento de la reivindicación 2 en el que la cantidad de base en la etapa 1) es suficiente para obtener un pH entre aproximadamente 4,5 y 7.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en el que la fuente de triacilglicerol comprende i) un aceite algal, aceite vegetal o un aceite de origen animal, o ii) aceite de soja.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en el que el emulsionante comprende oleato de potasio, oleato de sodio o una combinación de los mismos.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 en el que el emulsionante es oleato de potasio.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 en el que el ácido es ácido fosfórico, ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido succínico y una mezcla de los mismos.
13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 en el que la base es hidróxido sódico, hidróxido potásico o una mezcla de los mismos.
14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 en el que la mezcla de la enzima saturasa con la fuente de triacilglicerol se realiza a una temperatura entre 20 y 50°C.

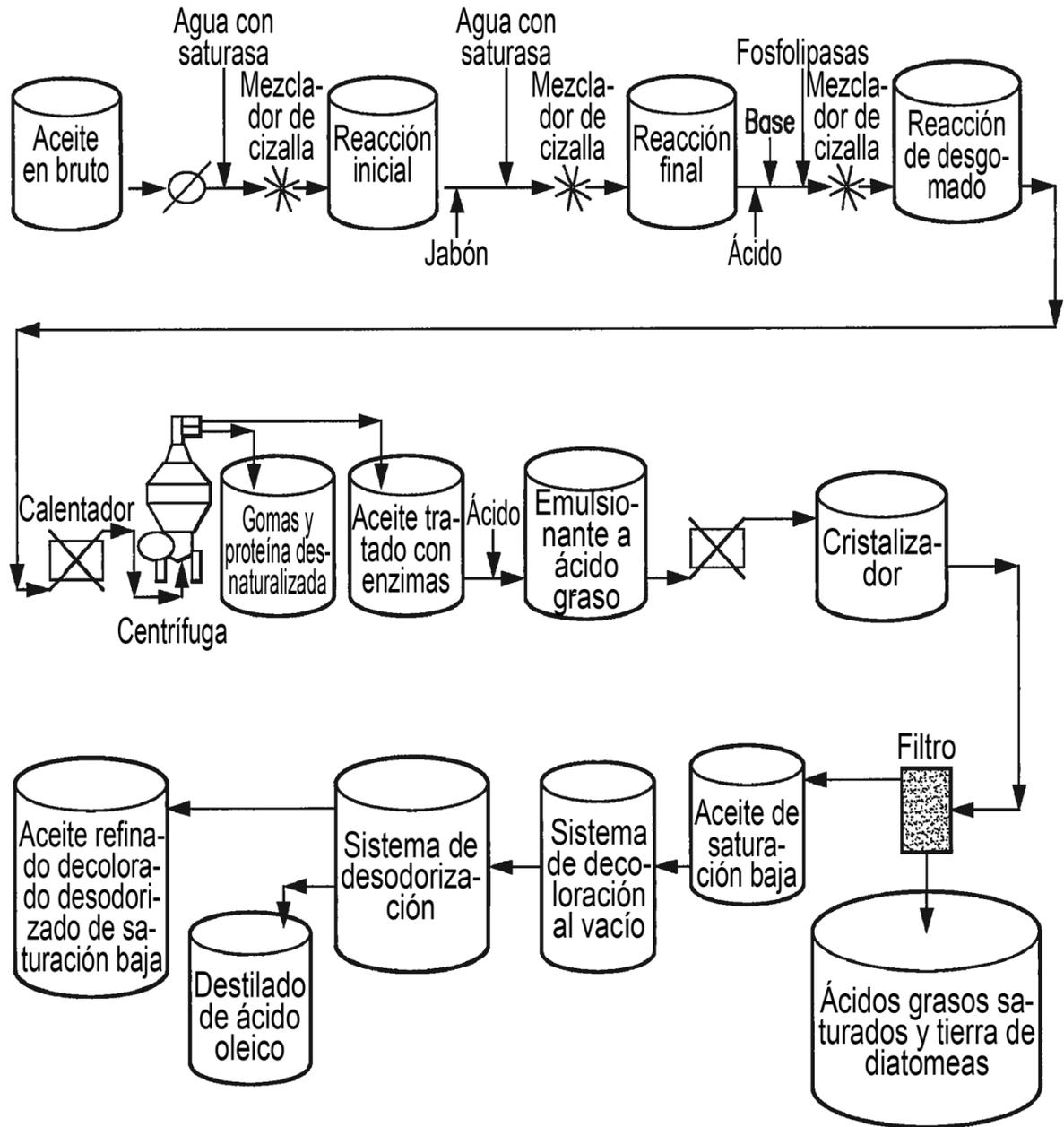


FIG. 1